

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université –Ain Temouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme de Master en : Biologie
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie
Thème

**Recherche et caractérisation d'activités enzymatiques dans les
graines de *Moringa Oleifera*.**

Présenté Par :

- 1) Melle. RABAHI Meryem
- 2) Melle. ZENASNI Meriem

Devant le jury composé de :

Dr. Nassima BRIXI (MCB) UAT.B.B (Ain Temouchent) Présidente
Dr. Ouassila BENHABIB (MCB) UAT.B.B (Ain Temouchent) Examinatrice
Dr. Sofiane Mourad BENYAMINA (MCB) UAT.B.B (Ain Temouchent) Encadrant

Année Universitaire 2020/2021

Remerciement

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, qui nous a donné le courage, la force, la santé et la persistance.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à notre encadreur monsieur Sofiane Mourad BENYAMINA Maître de Conférences à l'Universitaire d'Ain Témouchent, pour ses précieux conseils et son soutien dans toutes les circonstances. Sa gentillesse, sa patience, ses grandes qualités scientifiques et humaines ont contribué au bon déroulement de notre travail.

Nos remerciements s'adressent également au Dr. Nassima BRIXI qui nous a fait l'honneur de présider le jury, ainsi qu'au Dr. Ouassila BENHABIB, qui ont accepté d'examiner notre texte, et tout le temps qu'elles nous ont accordé.

Nous nous excusons de ne pas pouvoir citer tous les noms des enseignants ayant participé à nos formations. Nous les remercions tous.

Nous remercions également les membres de nos laboratoires pour leur aide précieuse.

Je dédie ce travail

A ma très chère mère Mme Latifa DERDEK, ma source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.

Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde gratitude que je te témoigne. J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices. Puisse Dieu tout puissant, te préserve et t'accorde santé, longue vie et Bonheur.

A mon très chers père Mr Mourad RABAHI. De tous les pères, tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance. En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières. Pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et de tous vos efforts. En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves.

Aucun mot ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Que Dieu tout puissant te garde et te procure santé, bonheur et longue vie pour que tu demeureras le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

A mes chère grand parents tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour toutes vos prières, encouragement et vos efforts. Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie.

A mes très chères frères Abdallah et Marwan qui m'ont toujours encouragé et soutenu.

A toutes mes amies pour leur support inestimable ainsi que leur aide et notamment **N. Meriem, K. Rawan et T. Marwa.**

Dédicaces

Je dédie ce mémoire a :

*A la lumière de ma vie, mes très chers Parents, Tous les mots du monde ne sauraient exprimer la profonde gratitude et l'immense amour que je vous porte, c'est les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de convertir pour mon instruction et mon bien-être qui m'a permis de vivre ce jour, j'espère que vous trouverez toujours en moi votre source de fierté. Que le bon Dieu vous bénir et vous prête longue vie et bonne santé, un grand merci **maman** et **papa**.*

*A ma très chère sœur, ma source de tendresse, qui était toujours à mes côtés à tout moment **Sarah***

*A mes très chères frères **IBRAHIM, MOUSSA** et **ISMAIL** qui m'ont toujours encouragé et soutenu.*

Que ce modeste travail soit un témoignage de l'attachement et de l'affection que je porte pour vous, pour votre soutien pendant ces années d'études malgré la distance géographique qui nous sépare.

*A toute la famille **ZENASNI**.*

A toutes mes amies pour leur support inestimable aussi leur aide et notamment.

A tous ceux qui m'ont aidée, soutenue, et encouragée pour la réalisation de ce modeste travail.

A tous qui m'ont nourri de leur amour et de leur tendresse.



MERIEM

Remerciement

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....01

Synthèse bibliographique

1. Les enzymes.....02

1.1. Structure des enzymes.....02

1.2. Classification des enzymes.....05

1.3. Localisation cellulaire des enzymes.....06

1.3.1. Les enzymes intracellulaires.....07

1.3.2. Les enzymes extracellulaires.....07

1.4. Importance des enzymes dans le secteur industriel08

2. *Moringa oleifera*.....12

2.1. Caractéristiques de *Moringa oleifera*.....13

Matériel et méthodes

1. Récolte de matière végétale.....14

2. Caractérisation des graines de *M. oleifera*.....14

3. Préparation de l'extrait bruts enzymatique.....14

4. Recherche et caractérisation de l'activité phytasique et amylasique des graines de *M. oleifera*.....14

4.1. L'influence de la température sur l'activité phytasique et amylasique des graines de *M. oleifera*.....15

4.2. L'influence du pH sur l'activité phytasique et amylasique des graines de *M. oleifera*.....16

4.3. Effet du traitement thermique sur la stabilité des phytases et amylases des graines de *M. oleifera*.....16

4.4. Effet du traitement du pH sur la stabilité des phytases et amylases des graines de *M. oleifera*.....16

5. Préparation des courbes étalons pour dosage des activités des phytases et des amylases des graines de <i>M. oleifera</i>	16
5.1. Préparation de la courbe étalon du phosphate	16
5.2. Préparation de la courbe étalon de l'amidon.....	17

Résultats et discussion

1. Caractérisation des graines de <i>Moringa</i>	18
2. Mesure du pH de l'extrait brut enzymatique de la poudre des graines de <i>M. oleifera</i>	18
3. Recherche et caractérisation de l'activité phytasique et amylasique des graines de <i>M. oleifera</i>	19
3.1. Les courbes d'étalonnages du phosphate et d'amidon.....	19
3.2. Influence de la température sur l'activité phytasique et amylasique des graines de <i>M. oleifera</i>	20
3.3. Influence du pH sur l'activité phytasique et amylasique des graines de <i>M. oleifera</i>	22
3.4. Effet du traitement thermique sur la stabilité des phytases et amylases des graines de <i>M. oleifera</i>	24
3.5. Effet du pH sur la stabilité des phytases et amylases des graines de <i>M. oleifera</i>	26
4. Discussion générale.....	28
Conclusion et perspectives.....	31
Références bibliographiques.....	33

Résumé

LISTE DES ABREVIATIONS

DO : Densité Optique

EC : classe d'enzyme

G : Gramme

h : heure

IKI : iode/potassium iodure

L : Litre

M : Molaire

M. oleifera : *Moringa oleifera*

Mg : Milligramme

Min : Minute

mL : Millilitre

pH : Potentiel d'Hydrogène

rpm : Rotation Par Minute

Mg : microgramme

μL : Microlitre

% : pourcentage

°C : Degré Celsius

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau représentatif des différentes classes des enzymes et leurs réactions catalysées (Combes et Monsan, 2009 ; Tipton et McDonald, 2018 ; Ann Benore, 2019 ; Sanganna Gari et al., 2019).....	06
Tableau 2 : Classification taxonomique de <i>M. oleifera</i> (Paikra, 2017).....	12
Tableau 3 : La gamme étalon des solutions du KH_2PO_4	17
Tableau 4 : La gamme étalon des solutions de l'amidon.....	17
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des résultats de la caractérisation de l'activité et de la stabilité des phytases et des amylases des graines de <i>M. oleifera</i>	30

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation de la liaison du substrat au site actif d'une molécule d'enzyme (Robinson, 2015).....	03
Figure 2 : Modèles d'interaction enzyme-substrat (Berg et al., 2002).....	04
Figure 3 : Activation d'une apoenzyme en holoenzyme (enzyme + cofacteur) (Akhtar et Jones, 2014).....	05
Figure 4 : Réaction catalytique des phytases (Cangussu et al., 2018).....	10
Figure 5 : Les graines (A) et la poudre (B) des graines de <i>Moringa oleifera</i>	18
Figure 6 : Mesure du pH de la solution de poudre des graines de <i>M. oleifera</i>	19
Figure 7 : Les courbes d'étalons du phosphate (A) et de l'amidon (B).....	20
Figure 8 : Etude de l'influence de la température sur l'activité phytasique (A) et amylasique (B) des graines de <i>M. oleifera</i>	20
Figure 9 : Etude de l'influence du pH sur l'activité phytasique (A) et amylasique (B) des graines de <i>M. oleifera</i>	22
Figure 10 : Effet du traitement thermique sur la stabilité des phytases et amylases des graines de <i>M. oleifera</i>	25
Figure 11 : Effet du pH sur la stabilité des phytases (A) et des amylases (B) des graines de <i>M. oleifera</i>	27

***I*ntroduction générale**

La survie des organismes vivants dépend d'une série de réactions chimiques impliquées dans des processus essentiels, cependant, bon nombre de ces réactions se déroulent très lentement (Copeland, 2000). Les enzymes sont des biocatalyseurs très efficaces qui accélèrent les réactions biochimiques afin de permettre la conversion des substrats en produits nécessaires au fonctionnement et à la survie des cellules des différents organismes vivants sans être elles-mêmes consommées ou modifiées (Gurung *et al.*, 2013 ; Robinson, 2015 ; Vingiani *et al.*, 2019). Ces enzymes peuvent également être extraits à partir des cellules et ensuite utilisées pour catalyser un large éventail de processus commercialement importants (Robinson, 2015). Aussi, ces enzymes jouent un rôle important dans divers secteurs industriels comme par exemple, les secteurs de l'agroalimentaire, des produits pharmaceutiques, des détergents, du textile, du cuir, des pâtes, du papier, des biocarburants et des produits cosmétiques (Cabrera et Blamey, 2018 ; Vingiani *et al.*, 2019).

Chez les végétaux, un bon nombre de ces biocatalyseurs ont des activités biologiques puissantes dans de nombreux aspects de la physiologie et du développement des plantes (Noat *et al.*, 1991 ; Fickers *et al.*, 2008). Plus de 75 % des biocatalyseurs utilisés commercialement appartiennent à la famille des hydrolases (Li *et al.*, 2012 ; Rigoldi *et al.*, 2018). Parmi les hydrolases se trouvent les phytases et les amylases qui sont omniprésentes chez un certain nombre d'espèces et d'organismes vivants (Anbu *et al.*, 2017 ; Reddy *et al.*, 2017). Vu l'importance des deux enzymes, les phytases et les amylases, nous nous sommes intéressés à la recherche et la caractérisation de l'activité et la stabilité de ces deux enzymes au niveau des graines de la plante *Moringa oleifera*.

Moringa oleifera est une plante appartenant à la famille des *Moringaceae* et originaire des régions sub-himalayennes de l'Inde, du Pakistan, du Bangladesh et de l'Afghanistan (Arora *et al.*, 2013 ; Paikra, 2017). *Moringa oleifera* est considérée comme l'une des plantes médicinales les plus connues, pour ses nombreuses potentialités nutritives, médicinales et industrielles (Saxena *et al.*, 2013 ; Vergara-Jimenez *et al.*, 2017 ; Meireles *et al.*, 2020). Toutes les parties de cette plante, la racine, l'écorce, la gomme, la feuille, la gousse et les graines possèdent diverses activités biologiques (Agunbiade *et al.*, 2021).

Les résultats de notre étude ont montré que les activités phytasiques et amylasiques ont été détectées dans l'extrait brut enzymatique des graines de *Moringa oleifera*. Les amylases ont présenté une activité et une stabilité plus élevée par rapport aux phytases des graines de *Moringa oleifera*.

Synthèse bibliographique

1. Les enzymes

Les enzymes sont des macromolécules biologiques également appelés biocatalyseurs (Robinson, 2015) produites par les cellules des différents organismes vivants (Cooper, 2000 ; Vingiani *et al.*, 2019 ; Gurung *et al.*, 2013).

Ces enzymes sont des catalyseurs qui permettent l'accélération de nombreuses réactions biologiques et biochimiques, à l'intérieur comme à l'extérieur de la cellule. Ces enzymes interviennent dans plusieurs processus nécessaires au maintien de la vie des différents organismes vivants (Gurung *et al.*, 2013 ; Robinson, 2015 ; Vingiani *et al.*, 2019), comme par exemple la synthèse de l'ADN qui fait intervenir l'ADN polymérase (Robinson, 2015), la protéolyse qui fait intervenir les protéases (López-Otín et Bond, 2008 ; Mótóyán *et al.*, 2013) et la glycolyse qui fait intervenir la phosphofructokinase, l'hexokinase et la pyruvate kinase (Li *et al.*, 2015 ; Sanzey *et al.*, 2015).

1.1. Structure des enzymes

Comme c'est le cas de toutes les protéines, les enzymes sont formées par l'arrangement successif des acides aminés (Lewis et Stone, 2020 ; Gurung *et al.*, 2013). Ces acides aminés liés ensemble dans une ou plusieurs chaînes polypeptidiques, sont pliés et courbés afin de former une structure tridimensionnelle spécifique, qui peut être perturbée et dénaturée, par exemple suite à un chauffage ou un contact avec des dénaturants chimiques, ce qui conduit à son inactivation (Gurung *et al.*, 2013 ; Robinson, 2015). Cette dénaturation peut être réversible ou irréversible (Gurung *et al.*, 2013). La structure des enzymes, incorpore une zone connue sous le nom de site actif (site catalytique), où le substrat se lie pour que la réaction de sa conversion en produit puisse s'effectuer (voir figure1) (Gurung *et al.*, 2013 ; Robinson, 2015 ; Lewis et Stone, 2020), selon la réaction suivante :



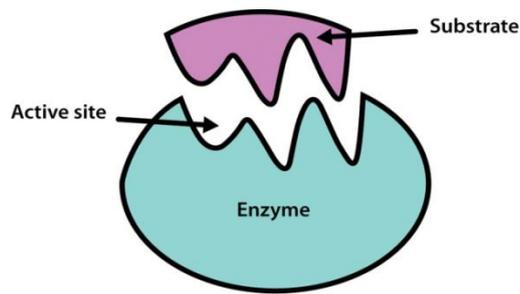


Figure 1: Représentation de la liaison du substrat au site actif d'une molécule d'enzyme (Robinson, 2015).

Les enzymes agissent en très faible concentration et augmentent la vitesse des réactions sans être elles-mêmes consommées ou modifiées pendant la réaction (Cooper, 2000 ; Berg *et al.*, 2002 ; Robinson, 2015 ; Lewis et Stone, 2020). Ces molécules sont hautement spécifiques et ne se lient qu'à certains substrats dû au fait que la conformation du site actif, stabilise la liaison spécifique au substrat (Berg *et al.*, 2002 ; Lewis et Stone, 2020). Il existe deux modèles différents de liaison du substrat au site actif d'une enzyme : le modèle de Fisher, appelé modèle "clé-serrure" qui se base sur une complémentarité de forme entre le substrat et le site actif (Cooper, 2000 ; Berg *et al.*, 2002 ; Robinson, 2015 ; Agarwal, 2018 ; Lewis et Stone, 2020), et le modèle de Koshland, appelé modèle d'ajustement induit qui se base sur l'hypothèse que la structure de l'enzyme se déforme pour s'adapter à son substrat (voir figure 2) (Cooper, 2000 ; Berg *et al.*, 2002 ; Robinson, 2015 ; Agarwal, 2018 ; Lewis et Stone, 2020).

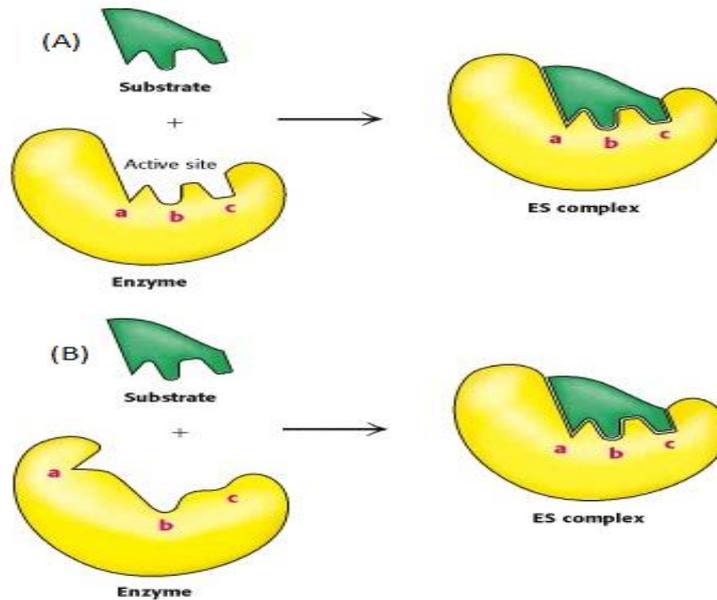


Figure 2 : Modèles d'interaction enzyme-substrat. (A) : le modèle de clé-serrure, (B) : Le modèle d'ajustement induit (Berg *et al.*, 2002).

Les enzymes peuvent également contenir des sites qui se lient aux cofacteurs, nécessaires à la catalyse (Berg *et al.*, 2002 ; Gurung *et al.*, 2013). De telles enzymes, appelées apoenzymes, sont inactives jusqu'à ce qu'elles soient liées à un cofacteur (Berg *et al.*, 2002 ; Akhtar et Jones, 2014 ; Robinson, 2015 ; Lewis et Stone, 2020). Le complexe cofacteur et apoenzyme est appelé holoenzyme (Figure3) (Berg *et al.*, 2002 ; Akhtar et Jones, 2014 ; Robinson, 2015 ; Lewis et Stone, 2020).

Les cofacteurs peuvent être subdivisés en deux groupes soit des ions métalliques comme l'atome de Zinc (Zn^{2+}) nécessaire à l'activité de l'anhydrase carbonique, soit des composés organiques qui se fixent à l'enzyme comme le phosphate de pyridoxal nécessaire à l'activité de la glycogène phosphorylase (Fischer *et al.*, 2010 ; Lewis et Stone, 2020).

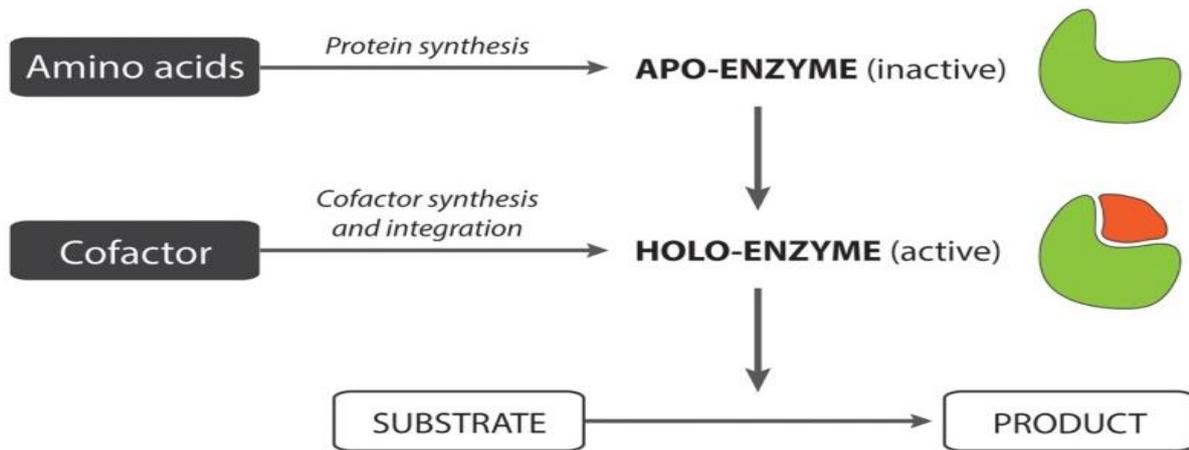


Figure 3 : Activation d'une apoenzyme en holoenzyme (enzyme + cofacteur) (Akhtar et Jones, 2014).

1.2. Classification des enzymes

Selon la réaction qu'elles catalysent, le IUBMB (The International Union of Biochemistry and Molecular Biology), a classé les enzymes en 7 classes différentes (McDonald *et al.*, 2007) (Sorokina *et al.*, 2014 ; Tipton et McDonald, 2018 ; Tao *et al.*, 2020) (Voir Tableau 1).

Cette classification repose sur un système numérique de la Commission des Enzymes (Enzyme Commission, EC) qui permet de classer les enzymes en groupes selon les types de réactions qu'elles catalysent et en attribuant une dénomination systématique qui permet de décrire la réaction chimique impliquée (Boyce *et al.*, 2004 ; Tao *et al.*, 2020), comme par exemple les oxydoréductases, les hydrolases... (Voir Tableau ci-dessous).

Tableau 1 : Tableau représentatif des différentes classes des enzymes et leurs réactions catalysées (Combes et Monsan, 2009 ; Tipton et McDonald, 2018 ; Ann Benore, 2019 ; Sanganna Gari *et al.*, 2019).

Numéro de la classe	Nom de la classe	Réaction catalysée par chaque classe	Exemple d'enzymes
EC 1	Oxydoréductases	$AH_2 + B \rightarrow A + BH_2$ Catalysent le transfert des électrons ou de protons entre des substrats	Alcool déshydrogénase
EC 2	Transférases	$AX + B \rightarrow BX + A$ Catalysent le transfert d'un groupe spécifique d'une molécule à une autre	Hexokinase
EC 3	Hydrolases	$A-B + H_2O \rightarrow AH + BOH$ Catalysent la coupure hydrolytique des liaisons C—O, C—N et C—C	L'α-amylase
EC 4	Lyases	$A \rightleftharpoons B + X-Y \rightleftharpoons A-B$ <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \\ X Y \end{array}$ </div> Catalysent l'addition de groupements chimiques aux doubles liaisons ou la formation de doubles liaisons par élimination groupements chimiques.	Pyruvate décarboxylase
EC 5	Isomérases	$A = B$ Catalysent des changements géométriques ou structuraux dans une molécule, en changeant la position d'un groupement.	La glucose-isomérase
EC 6	Ligases	$A + B + NTP \rightarrow A-B + NDP + P$ Catalysent la formation de liaisons covalentes entre deux molécules.	Pyruvate carboxylase
EC 7	Translocases	$AX + B \parallel \rightleftharpoons A + X + \parallel B$ (Coté 1) (coté 2) Catalysent le mouvement des ions ou des molécules à travers la membrane ou leur séparation à l'intérieure des membranes	Ubiquinone réductase

1.3. Localisation cellulaire des enzymes

Selon leur localisation cellulaire, les enzymes peuvent agir à l'intérieur de la cellule (les enzymes intracellulaire) ou à l'extérieur de la cellule (les enzymes extracellulaires) (Robinson, 2015).

1.3.1. Les enzymes intracellulaires

Les enzymes intracellulaires sont des enzymes qui fonctionnent dans l'environnement interne de la cellule et dans lequel elles sont produites et synthétisées (Poznanski et al., 1965 ; Cottret, 2009 ; Omajali et al., 2015).

Chez les microorganismes les enzymes intracellulaires jouent des rôles essentiels et donnent aux cellules microbiennes la capacité de vivre et de fonctionner, par la catalyse des réactions importantes comme celles impliquées dans la fermentation ou dans la respiration aérobie et anaérobie (Jurtshuk, 1996 ; Shimizu, 2013 ; Wolfe, 2015).

Chez les animaux, les enzymes possèdent une variété de fonctions qui sont essentielles à la survie des organismes (Brooker, 2000), par exemple, elles sont impliquées dans les mécanismes de transduction et de régulation des processus cellulaires (Kapiloff et Chandrasekhar, 2011). Elles sont également impliquées dans la synthèse de l'ATP ou le transport de molécules à travers la cellule (Volker, 1991 ; Bohec, 2012) ou dans la synthèse de l'ADN (Garg et Burgers, 2005 ; Miyabe et al., 2011).

Comme c'est le cas des microorganismes et des animaux, les végétaux ont, aussi, besoin pour leur survie des enzymes qui sont impliquées dans des fonctions intracellulaires majeures, telles que la dégradation des protéines pour empêcher l'accumulation de peptides toxiques par le système protéolytique (Carillo et al., 1995 ; Ferrara et al., 2001 ; Hasan et al., 2017) ou la photosynthèse grâce à l'enzyme la ribulose biphosphate carboxylase (Morot-Gaudry, 2014 ; Long et al., 2015).

1.3.2. Les enzymes extracellulaires

Ces enzymes sont synthétisées à l'intérieur de la cellule, puis sécrétées dans l'espace extracellulaire (Gueguen, 1975 ; Robinson, 2015).

Chez les microorganismes, les enzymes extracellulaires ont un rôle central dans plusieurs procédés, par exemple, elles jouent un rôle important dans le cycle des nutriments et la minéralisation de la matière organique par hydrolyse des substrats pour leur donner des tailles suffisamment petites pour être transportées à l'intérieur des cellules via les membranes cellulaires, ce qui leur permet de produire de la biomasse et obtenir de l'énergie pour sa croissance (Jackson *et al.*, 2013 ; Zimmerman *et al.*, 2013 ; Bullock *et al.*, 2017 ; Gómez *et al.*, 2020). Par exemple, les phosphatases permettent la libération des groupements phosphates inorganiques solubles à partir des organophosphorées, les rendant disponibles pour

l'absorption et l'utilisation par la plupart des organismes (Jackson *et al.*, 2013 in Dalai, 1977 ; Zimmerman *et al.*, 2013).

Comme c'est le cas des microorganismes, les enzymes extracellulaires jouent aussi un rôle important comme par exemple les enzymes extracellulaires digestives qui permettent de digérer les grosses particules alimentaires en petites molécules absorbables (Stumpp *et al.*, 2015 ; He *et al.*, 2018 ; Steinmetz, 2019 ; Hartenstein et Martinez, 2019).

Chez les plantes, les enzymes extracellulaires sont aussi importantes et jouent des rôles importants, (Benhamou et Rey, 2012), Comme par exemple les phosphatases qui sont sécrétées par les racines dans la rhizosphère sont impliquées dans l'hydrolyse des liaisons phosphodiester et la libération du phosphate (P), qui peut être absorbé par les plantes ou les micro-organismes rhizosphériques (Nannipieri *et al.*, 2011 ; Gianfreda, 2015 ; Cabugao *et al.*, 2017). Les racines peuvent également libérer des protéases extracellulaires dans le sol, qui permet l'amélioration et la libération d'éléments nutritifs pour les plantes (Adamczyk *et al.*, 2010 ; Kohli *et al.*, 2012 ; Greenfield *et al.*, 2020).

1.4. Importance des enzymes dans le secteur industriel

Depuis toujours, les nombreux procédés industriels utilisent des composés nocifs pour la nature, une alternative permet de surmonter ce problème fait appel aux enzymes (Ahuja *et al.*, 2004 ; Jegannathan et Nielsen, 2013 ; Cabrera et Blamey, 2018). Ces enzymes sont devenues une molécule importante qui a été largement utilisée à différents secteurs industriels, entre autres, les secteurs de l'agroalimentaire, de l'alimentation animale, des produits pharmaceutiques, des détergents, du textile, du cuir, des pâtes, du papier, des biocarburants et des produits cosmétiques, (Li *et al.*, 2012 ; Gurung *et al.*, 2013 ; Adrio et Demain, 2014 ; Robinson, 2015 ; Cabrera et Blamey, 2018 ; Vingiani *et al.*, 2019). Plus de 500 produits industriels sont fabriqués à l'aide d'enzymes (Adrio et Demain, 2014 in Johannes et Zhao, 2006). La demande globale d'enzymes industrielles sur le marché mondial a été estimée à 3,3 milliards de dollars en 2010 (Gurung *et al.*, 2013 ; Vingiani *et al.*, 2019). Plus de 75 % des enzymes utilisées commercialement appartiennent à la famille des hydrolases.

Ces enzymes qui possèdent une diversité d'applications dans divers secteurs industriels peuvent provenir des différentes sources d'organismes vivants, les microorganismes, les animaux et les végétaux (Gurung *et al.*, 2013 ; Robinson, 2015 ; Rigoldi *et al.*, 2018).

Les enzymes des microorganismes jouent un rôle majeur dans différentes industries en raison de leur stabilité par rapport aux enzymes végétales et animales (Anbu *et al.*, 2015 ; Singh *et al.*, 2016 ; Raveendran *et al.*, 2018). Elles ont la capacité plus tolérante aux conditions extrêmes utilisées dans les processus industriels tels que la température, la salinité, le pH..., etc. (Underkofler *et al.*, 1958 ; Umayaparvathi *et al.*, 2013). Elles sont généralement moins chères à produire (Bhargav *et al.*, 2008 ; Gurung *et al.*, 2013), plus faciles à extraire et à purifier (Gurung *et al.*, 2013 ; Robinson, 2015 ; Singh *et al.*, 2016). Les enzymes des microorganismes jouent un rôle important dans divers secteurs industriels (Gurung *et al.*, 2013), par exemple, les enzymes amylolytiques des microorganismes trouvent des applications dans différentes industries telles que les industries alimentaires, l'industrie des détergents, du papier et du textile (Naidu et Saranraj, 2013 ; Putri et Nakagawa, 2020).

Les enzymes d'origine animale sont aussi largement utilisées dans plusieurs applications industrielles (Li *et al.*, 2012 ; Robinson, 2015), telle que l'industrie des détergents et diverses applications pharmacologiques et alimentaires (Espósito *et al.*, 2009 ; Ferrari *et al.*, 2012 ; Costa *et al.*, 2013 ; Ktari *et al.*, 2014 ; Gong *et al.*, 2015 ; Jesús-de la Cruz *et al.*, 2018). La lipoxigénase est l'enzyme la plus étudiée chez les animaux, elle a des applications en industrie alimentaire telle que, la fabrication du pain et la production d'arômes (Baysal et Demirdöven, 2007).

Les enzymes d'origine végétale ont aussi reçu une attention considérable dans les applications industrielles telle que les détergences et le textile, les produit pharmaceutiques (Zarevúcka et Wimmer, 2008 ; Hood *et al.*, 2012 ; Tusé *et al.*, 2014 ; Kumari *et al.*, 2019). Le système utilisant des plantes pour la production d'enzymes industrielles présente de nombreux avantages tels qu'une production à faible coût et à grande échelle (Ma *et al.*, 2003 ; Hood *et al.*, 2012 ; Kumari *et al.*, 2019). De plus, l'utilisation des plantes comme bio-usines pour la production des enzymes industrielles est une technologie en développement (Hood *et al.*, 2012).

Plus de 75 % des enzymes utilisées commercialement appartiennent à la famille des hydrolases (Li *et al.*, 2012 ; Rigoldi *et al.*, 2018). Les hydrolases (EC 3) sont des enzymes de la classe d'enzymes qui catalysent le clivage du substrat et l'addition d'eau aux molécules résultant afin de diviser une grosse molécule en deux molécules plus petites (Voir Tableau 1) (Boyce et Tipton, 2001 ; Cuesta *et al.*, 2015), comme par exemple, les estérases qui sont des hydrolases qui catalysent le clivage de liaisons ester pour générer un acide et un alcool (Lopes

et al., 2011 ; Montella *et al.*, 2012), les glycosidases qui catalysent l'hydrolyse des liaisons N-glycosidique O-glycosidique et S-glycosidique (Aspeborg *et al.*, 2012 ; Van Wyk *et al.*, 2017 ; Guillotin *et al.*, 2019) et les peptidases qui clivent les liaisons peptidiques (Boyce et Tipton, 2001 ; Hamin Neto *et al.*, 2018).

Les phytases et les amylases sont des exemples typiques des enzymes, de cette classe, et qui possèdent de large application et contribuent à une productivité et une rentabilité accrue (Kashyap *et al.*, 2001 ; Lynd *et al.*, 2002 ; Jegannathan et Nielsen, 2013 ; Cangussu *et al.*, 2018).

Les phytases sont très fréquentes dans le règne végétal, elle appartient à la famille des phosphatases (myo-inositol hexakis phosphate phosphohydrolases) qui déphosphoryle l'inositol hexakis phosphate (IP6) en myo-inositol inférieur et en phosphore inorganique de manière séquentielle (Figure 4) (Selle *et al.*, 2000 ; Yao *et al.*, 2012 ; Jegannathan et Nielsen, 2013 ; Borgi *et al.*, 2015 ; Reddy *et al.*, 2017 ; Cangussu *et al.*, 2018). Selon la réaction suivante :

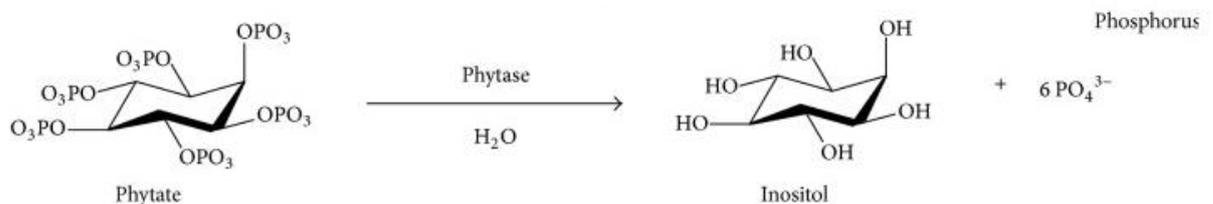


Figure 4 : Réaction catalytique des phytases (Cangussu *et al.*, 2018).

Les phytases se trouvent couramment dans la nature et peuvent être obtenues à partir des animaux, des microorganismes et des plantes (Yao *et al.*, 2012 ; Gupta *et al.*, 2015 ; Reddy *et al.*, 2017).

Le premier rapport sur les phytases animales a été en 1908 par McCollum et Hart. Les phytases ont été signalées chez les vertébrés inférieurs, les d'oiseaux, les reptiles, les poissons, les batraciens et les tortues marines (McCollum et Hart, 1908 ; Rapoport *et al.*, 1941 ; Bohn *et al.*, 2008 ; Gupta *et al.*, 2015). Ces phytases se trouve également chez les microorganismes

(les bactéries, les levures et les champignons) (Mayer *et al.*, 1999 ; Bohn *et al.*, 2008 ; Schneider *et al.*, 2012 ; Cangussu *et al.*, 2018).

Les phytases ont été aussi détectée chez de nombreuses espèces végétales telles que le blé, le seigle, l'orge, le pois, le haricot, le soja, le maïs, le riz, la laitue, les épinards, l'herbe, le pollen de lys, etc. (Gupta *et al.*, 2015 ; Madsen et Brinch-Pedersen, 2019). Cette enzyme a de nombreuses applications dans les industries alimentaires et environ 60% des enzymes du marché mondial alimentaire sont des phytases (Adeola et Cowieson, 2011 ; Yao *et al.*, 2012 ; Reddy *et al.*, 2017 ; Cangussu *et al.*, 2018). Cette enzyme permet la libération du phosphore et d'autres micronutriments importants pour le développement des animaux monogastriques, y compris les humains, via l'amélioration de la dégradation de l'acide phytique dans le tractus gastro-intestinal (Hughes *et al.*, 2009 ; Gao *et al.*, 2013 ; Gao *et al.*, 2014 ; Gupta *et al.*, 2015 ; Cangussu *et al.*, 2018). Cette enzyme peut être, par exemple, utilisée comme additif dans de nombreux produits alimentaires, pour réduire la teneur en acide phytique des aliments et améliorer la valeur nutritionnelle (Greiner et Konietzny, 2006 ; Yao *et al.*, 2012 ; Dahiya, 2016 ; Madsen et Brinch-Pedersen, 2019).

Les amylases sont largement distribuées et sont l'une des enzymes les plus étudiées (Rana *et al.*, 2013). Ces enzymes hydrolysent les molécules d'amidon en polymères composés d'unités glucose (Souza et Magalhães, 2010 ; Rana *et al.*, 2013).

Les amylases peuvent être obtenues à partir des animaux, des microorganismes et des plantes (Reddy et Nimmagadda, 2003 ; Anbu *et al.*, 2017). Les amylases sont des enzymes importantes et indispensables qui jouent un rôle central dans le domaine de la biotechnologie (Anbu *et al.*, 2017). Ils ont une application potentielle dans un grand nombre de procédés industriels tels que les industries alimentaires, les industries de fermentation et pharmaceutiques (Souza et Magalhães, 2010). Parmi les caractéristiques structurelles et dynamiques de l'amylase, la thermostabilité et la stabilité aux différents pHs (Rana *et al.*, 2013 ; Souza et Magalhães, 2010).

Vu l'importance des deux enzymes, les phytases et les amylases, nous nous sommes intéressés à la recherche et la caractérisation de l'activité de ces deux enzymes chez l'une des plantes médicinales la plus connue, pour ses nombreuses potentialités nutritives, médicinales et industrielles, à savoir *Moringa oleifera*.

2. *Moringa oleifera*

Moringa oleifera (*M. oleifera*), également connue sous le nom d'arbre de raifort et d'arbre de bâton de tambour (Paikra, 2017 ; Kou *et al.*, 2018), est une plante appartenant à la famille des *Moringaceae* et originaire des régions sub-himalayennes de l'Inde, du Pakistan, du Bangladesh et de l'Afghanistan (Galuppo *et al.*, 2013 ; Arora *et al.*, 2013 ; Paikra, 2017). La classification taxonomique de *M. oleifera* est représentée dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Classification taxonomique de *M. oleifera* (Paikra, 2017).

Royaume	Plantae
Sous-royaume	<i>Tracheobionta</i>
Super Division	Spermatophyte
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Dilleniidae</i>
Famille	<i>Moringaceae</i>
Genre	<i>Moringa</i>
Espèce	<i>oleifera</i>

La famille *Moringaceae* comprend 14 espèces, comme par exemple le *M. peregrine*, *M. stenopetala*, *M. ovalifolia*. (Dehshahri *et al.*, 2012 ; Paikra, 2017 ; Meireles *et al.*, 2020).

M. oleifera est l'espèce la plus connue, la plus étudiée et la plus utilisée (Anwar *et al.*, 2005 ; Olson et Fahey, 2011 ; Meireles *et al.*, 2020). *M. oleifera* est une plante cultivée partout dans le monde du fait de ses nombreuses potentialités nutritives, médicinales et industrielles (Jed et Fahey, 2005 ; Saxena *et al.*, 2013 ; Vergara-Jimenez *et al.*, 2017). Ses feuilles, ses graines et ses fleurs ont de bonnes valeurs nutritionnelles et thérapeutiques (Arora *et al.*, 2013 ; Vergara-Jimenez *et al.*, 2017 ; Paikra, 2017).

2.1. Caractéristiques de *Moringa oleifera*

M. oleifera est l'une des plantes médicinales les plus connues et largement répandues dans les régions tropicales (Satish *et al.*, 2012 ; Stohs et Hartman, 2015 ; Anwar *et al.*, 2007 ; Banik *et al.*, 2018). Cette plante possède une large gamme d'utilisations médicinales (Anwar *et al.*, 2007 ; Kou *et al.*, 2018), par exemple elle est utilisée pour ces propriétés anticancéreuses, hépatoprotectrices, anti-inflammatoires, antidiabétiques, immunomodulatrices et antimicrobien (Bose, 2007 ; Abdull Razis *et al.*, 2014 ; Minaiyan *et al.*, 2014 ; Toppo *et al.*, 2015 ; Bhattacharya *et al.*, 2018).

Les feuilles de *M. oleifera* ont été caractérisées pour contenir un équilibre nutritionnel souhaitable, contenant des vitamines, des minéraux, des acides aminés et des acides gras (Moyo *et al.*, 2011 ; Anwar *et al.*, 2007 ; AbdullRazis *et al.*, 2014), aussi elles sont riches en antioxydants (Vergara-Jimenez *et al.*, 2017). Les fleurs de *M. oleifera*, sont riches en calcium, potassium et antioxydants, et sont utilisées dans l'alimentation humaine (Pontual *et al.*, 2012), elles sont aussi riches en composés phytochimiques bioactifs et les extraits de fleurs ont montré des propriétés antibactériennes, anticancéreuse et anti-inflammatoires (Moura *et al.*, 2011 ; Dubey *et al.*, 2013 ; Gopalakrishnan *et al.*, 2016 ; Kalappurayil et Joseph, 2017).

Les graines de *M. oleifera*, sont utilisées dans l'alimentation humaine, la médecine, le cosmétique et offre de bonnes perspectives de recherche (Price, 2007 ; Oyeyinka, 2018 ; Meireles *et al.*, 2020). Aussi, ces graines possèdent une activité antimicrobienne et sont utilisées pour le traitement des eaux résiduaires et pour l'élimination des métaux lourds et les composés organiques (Kalogo *et al.*, 2000 ; Foidl *et al.*, 2001 ; Andrade Luz *et al.*, 2013 ; Bichi, 2013 ; Meireles *et al.*, 2020). Les graines de *M. oleifera* sont rondes avec une coque semi-perméable brunâtre et qui possède trois ailes blanches (Makkar et Becker, 1997). Chaque arbre de *M. oleifera* peut produire entre 15 000 et 25 000 graines/an (Makkar et Becker, 1997 ; Sahoo *et al.*, 2020). Le poids moyen par graine est de 0,3 g et le rapport grain/coque est de 75 : 25 (Foidl *et al.*, 2001 ; Olson *et al.*, 2019). Elles sont riches en protéines, en lipides bruts, en huiles et minéraux (Foidl *et al.*, 2001 ; Liang *et al.*, 2019 ; Meireles *et al.*, 2020).

Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biochimie du l'universitaire Belhadj Bouchaib- Ain Témouchent (UBBAT), durant le second semestre de master 2 de l'année universitaire 2020/2021.

1. Récolte du matériel végétal

Pour la recherche et la caractérisation d'activité phytasique et amylasique, des graines achetées au commerce à Ain Témouchent ont été utilisées comme matériel biologique.

2. Caractérisation des graines de *M. oleifera*

Les graines achetées au commerce ont été caractérisées en fonction de leur poids, de leur contour, de leur couleur, leur pH et de leur forme.

Ces graines sont, ensuite, triées et séchées à l'aire libre pendant quelques jours, puis broyées et tamisées. La poudre obtenue est utilisée pour la récupération de l'extrait brut enzymatique.

3. Préparation de l'extrait brut enzymatique des graines de *M. oleifera*

La préparation de l'extrait brut enzymatique été réalisée selon la méthode de Sánchez-Muñoz *et al.*, (2017) avec une modification mineure.

2 g de poudre des graines sont immergées dans 10 ml de tampon phosphate 50 mM (pH7), puis le mélange obtenu est vortexé, et laisser pour macération pendant 4h à température ambiante (Sánchez-Muñoz *et al.*, 2017).

Après 4h de macération, le mélange est centrifugé à 6000 rpm/min pendant 5min. Le surnageant est récupéré et conservé à 4°C pour être utilisé comme extrait brut enzymatique.

Le pH de l'extrait brut a été mesuré en utilisant des bandelettes de pH.

4. Recherche et caractérisation des activités phytasiques et amylasiques des graines de *M. oleifera*

La caractérisation des activités phytasiques et amylasiques de la poudre de graines de *M. oleifera* a été effectuée par l'étude de l'influence de la température et des pHs sur l'activité et la stabilité de ces 2 enzymes.

Pour doser l'activité des phytases, la méthode de Sajidan *et al* (2015) a été utilisée, 25µL de solution d'extrait brut de graine a été ajoutée à 125µL d'ammonium d'acétate 0,1M contenant le phytate de sodium à 5 mM. Le mélange réactionnel est incubé à 30°C pendant 30min.

Le Pi libéré est mesuré selon la technique modifiée de Heinonen et Lahti (1981) in Sajidan *et al* (2015). 750 µL de solution fraîchement préparée d'acétone, d'acide sulfurique (2,5 M) et de molybdate ammonium (10 mM) (2: 1: 1 v / v) sont ajoutés pour arrêter la réaction enzymatique. A ce mélange, 100µL d'acide ascorbique à 1M ont été ajoutés.

Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 820 nm contre un blanc préparé et incubé dans les mêmes conditions.

Pour doser l'activité des amylases, la méthode de Caraway Somogyi iode/potassium iodure (IKI) a été utilisée. La préparation de la solution du substrat consiste à ajouter 40mL d'une solution d'amidon à 1%, à 50mL d'eau distillée en ébullition. Après agitation et refroidissement de cette solution d'amidon à température ambiante, une quantité suffisante pour 100 mL d'eau distillée a été ajoutée (Fatema, 2017). Un volume de cette solution est récupéré et dilué 10 fois dans de l'eau distillé (Fatema, 2017).

Le milieu réactionnel est constitué de 0,1 mL de cette solution d'amidon préparée, 0,750 mL de tampon phosphate à 0,1 M et pH 7 et de 0,4 mL de l'extrait brut enzymatique. Le mélange réactionnel est incubé à 30°C pendant 30 minutes. Puis 0,750 ml de Lugol sont ajoutés au mélange réactionnel.

Afin de stopper la réaction enzymatique 1,5 mL d'HCl à 10 % ont été ajoutés à 1 mL du mélange réactionnel (Fatema, 2017). L'absorbance est mesurée à 620 nm (Syn et Chen, 1997), contre un blanc préparé et incubé dans les mêmes conditions.

4.1. L'influence de la température sur l'activité phytasique et amylasique des graines de *M. oleifera*

Afin d'étudier l'influence de la température sur l'activité des phytases et des amylases les milieux réactionnels sont incubés pendant 30min à différentes températures 4, 20, 30, 45 et 50°C.

4.2. L'influence du pH sur l'activité phytasique et amylasique des graines de *M. oleifera*

Afin d'étudier l'influence du pH sur l'activité des phytases et des amylases, le tampon phosphate de la réaction à 0,1 M et pH 7 est remplacé par du tampon phosphate à 0.1M et pH 5, et le tampon glycine NaOH à 0.1M et pH 9.

4.3. Effet du traitement thermique sur la stabilité des phytases et amylases des graines de *M. oleifera*

La stabilité thermique des phytases et des amylases est déterminée par le chauffage de l'extrait brut enzymatique de la poudre de *M. oleifera* dans un bain marie à une température de 90°C pendant 60 et 120 min.

L'activité enzymatique résiduelle des deux enzymes en utilisant les mêmes protocoles décrit précédemment.

4.4. Effet du traitement du pH sur la stabilité des phytases et amylases des graines de *M. oleifera*

La stabilité des phytases et des amylases aux pHs acide et basique a été déterminé, par incubation de l'extrait brut enzymatique de la poudre de *M. oleifera* en présence de HCl ou du NaOH à 1M, pendant 60 et 120 min

L'activité enzymatique résiduelle des deux enzymes en utilisant les mêmes protocoles décrit précédemment.

5. Préparation des courbes étalons pour dosage des activités phytasiques et amylasiques des graines de *M. oleifera*

5.1. Préparation de la courbe étalon du phosphate

La concentration de Pi libéré par les phytases de la poudre des graines de *M. oleifera* a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe étalon $DO=f([\text{phosphate}])$ (Wyss *et al.*, 1999). Pour cela, une série des concentrations allant de 0,2 à 1mM est préparée à partir d'une solution mère KH_2PO_4 à 1mM (Tableau 3).

Tableau 3 : La gamme étalon des solutions du KH_2PO_4

[KH_2PO_4] (mM)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Solution KH_2PO_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 courbe étalon a été préparé à partir de l'absorbance, correspondant aux différentes concentrations de phosphate, mesurée à 820 nm.

5.2. Préparation de la courbe étalon de l'amidon

La concentration d'amidon dégradée par les amylases de la poudre des graines de *M. oleifera* a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe étalon $\text{DO} = f([\text{amidon}])$. Pour cela, une série des concentrations allant de 20 à 400 $\mu\text{g/mL}$ a été préparée à partir d'une solution mère d'amidon à 400 $\mu\text{g/mL}$ (Tableau 4).

Tableau 4 : La gamme étalon des solutions de l'amidon

Solutions étalons d'amidon ($\mu\text{g/mL}$)	0	20	40	60	80	100
Solution mère d'amidon (400$\mu\text{g/mL}$)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Eau distillée (mL)	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5

La courbe étalon a été préparé à partir de l'absorbance, correspondant aux différentes concentrations de l'amidon, mesurée à 620 nm.

Résultats et discussions

1. Caractérisation des graines de *Moringa*

Les graines de *Moringa oleifera* utilisées dans cette étude ont été caractérisées. Ces graines présentent une forme ronde et une coque triangulaire de couleur marron avec trois ailes blanches (Figure 5 A). Ces graines ont un poids moyen d'environ 0,24 g et un diamètre d'environ 1 cm.

Pour la recherche d'activités phytasiques et amylasiques, ces graines ont été broyées et leur poudre a été utilisée (Figure 5B).



Figure 5 : Les graines (A) et la poudre (B) des graines de *Moringa oleifera*.

2. Mesure du pH de l'extrait brut enzymatique de la poudre des graines de *M. oleifera*

Le pH de l'extrait brut a été mesuré en utilisant des bandelettes de pH, le résultat a montré que l'extrait brut enzymatique de la poudre des graines de *M. oleifera* a un pH de 5 (Figure 6).



Figure 6 : Mesure du pH de la solution de poudre des graines de *M. oleifera*.

3. Recherche et caractérisation des activités phytasiques et amylasiques des graines de *M. oleifera*

La recherche et la caractérisation des activités phytasiques et amylasiques de la poudre de graines de *M. oleifera* a été effectuée par l'étude de l'influence de la température et des pHs sur l'activité et la stabilité de ces 2 enzymes.

3.1. Les courbes d'étalonnages du phosphate et de l'amidon

Les courbes étalons du KH_2PO_4 (Figure 7A) et de l'amidon (Figure 7B) ont été préparées afin de déterminer la quantité de Pi libéré et de l'amidon dégradée, respectivement, par les phytases et les amylases.

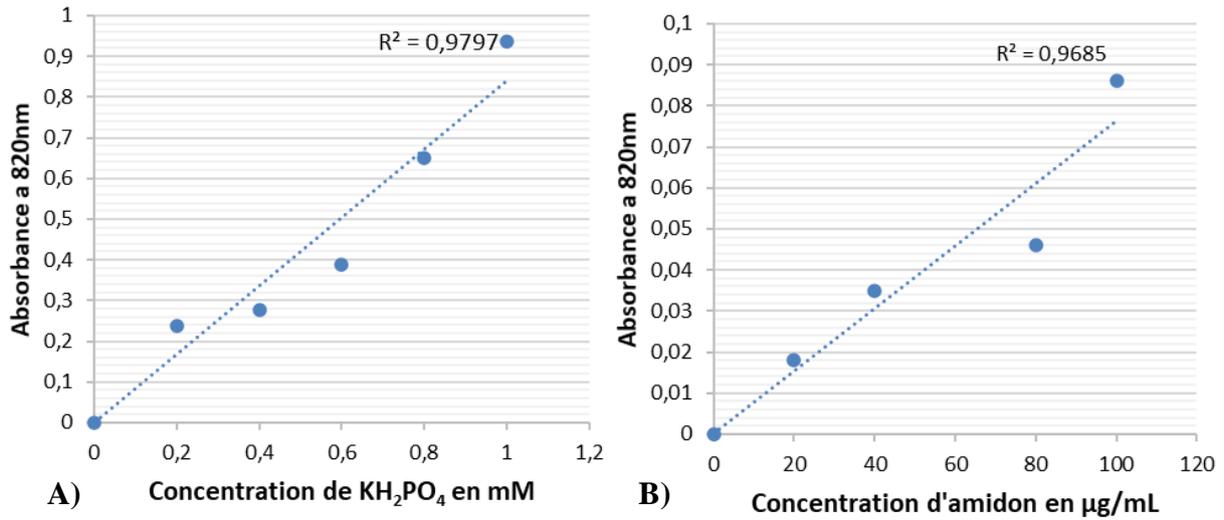


Figure 7 : Les courbes d'étalons du phosphate (A) et de l'amidon (B).

3.2. Influence de la température sur l'activité phytasique et amylasique des graines de *M. oleifera*

L'étude de l'effet de la température sur les activités phytasique et amylasique de l'extrait brut enzymatique des graines de *M. oleifera* a été effectuée aux températures 4, 20, 37, 45 et 50°C (Figure 8).

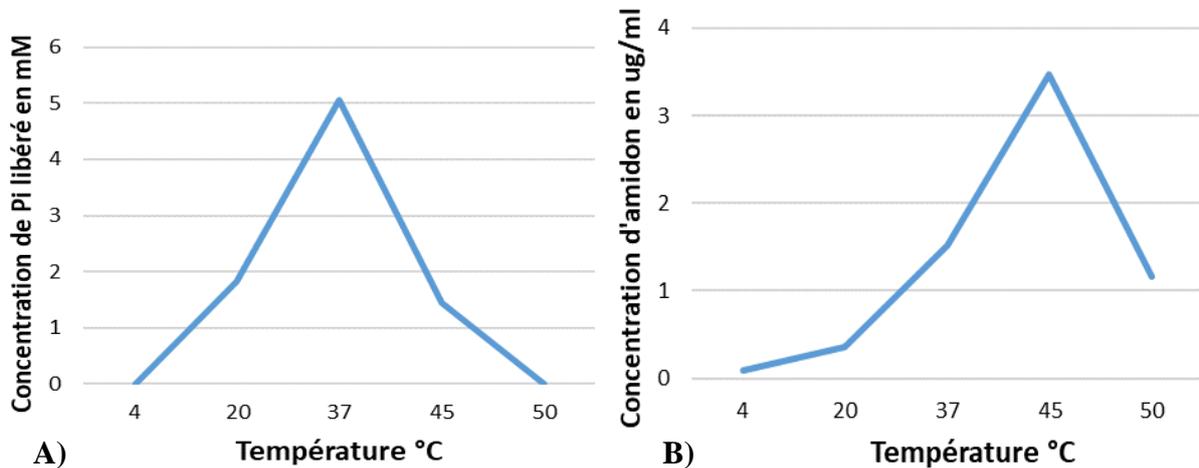


Figure 8 : Etude de l'influence de la température sur l'activité phytasique (A) et amylasique (B) des graines de *M. oleifera*.

Les résultats obtenus montrent que l'activité enzymatique de l'extrait brut des graines de *M. oleifera*, des 2 enzymes, augmente avec l'augmentation de la température d'incubation

jusqu'à atteindre son maximum à la température optimale (Figure 8). Ensuite, cette activité enzymatique diminue au-delà de cette température.

On remarque que les activités enzymatiques des deux enzymes sont détectées aux différentes températures testées, sauf qu'à 4°C, aucune activité n'est détectée pour les 2 enzymes recherchées (Figure 8 A et B). Des études ont montré que les enzymes perdaient leurs activités enzymatiques à de basses températures (proche de 0°C) (Privalov, 1990 ; DeLong *et al.*, 2017).

À 50 °C, aucune activité phytasique n'est détectée (Figure 8A), par contre, l'extrait brut maintient une activité amylasique à cette température (Figure 8B). Nos résultats, de l'activité amylasique sont en concordance avec ceux de Dahot *et al.*, (2001), qui ont rapporté que l'amylase purifiée à partir des graines de *M. oleifera* possède une activité enzymatique à 50 °C.

La température optimale de l'activité phytasique de l'extrait brut enzymatique des graines de *Moringa* est de 37 °C, différente de celle des amylases (Figure 8A).

A 45°C, l'activité phytasique de notre extrait brut enzymatique est plus faiblement détectée alors que des études ont montré que 45°C est la température optimale de l'activité phytasique chez des plantes comme le blé et les racines de tomate (Nakano *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 1997).

La température optimale de l'activité amylasique de l'extrait brut enzymatique des graines de *Moringa* est de 45 °C (Figure 8B), ce qui est très proche de celle des travaux de Dahot *et al.*, (2001) qui ont rapporté une activité enzymatique maximale à 40 °C pour l'amylase purifiée à partir des graines de *Moringa*.

Par contre, cette température optimale amylasique de l'extrait brut enzymatique des graines de *Moringa* est plus élevée que celle des amylases de la plante de *Malus pumila* (35 °C) (Saini *et al.*, 2016) est inférieure à celle de l'amylase de la plante de jammun (60 °C) (Fatema *et al.*, 2017).

Des résultats similaires, de températures optimales différentes pour des enzymes différentes d'un même organisme a été déjà démontré. En effet, deux enzymes de *M. oleifera* une peroxydase et une protéase possèdent des températures optimales d'activités différentes, respectivement, de 30 °C et 37 °C (Banik *et al.*, 2018 ; Agunbiade *et al.*, 2021).

Pour la température de 20 °C, les phytases et les amylases présentent, respectivement, une activité relativement faible et une activité presque nulle. Par contre, des études sur des enzymes purifiées à partir de *M. oleifera*, une peroxydase et une protéase, ont montré la présence d'activité enzymatique à 20 °C (Banik *et al.*, 2018 ; Agunbiade *et al.*, 2021). D'autres études ont montré, aussi, que des phytases et des amylases, respectivement, des racines des tomates et de la plante jammun, possèdent une activité enzymatique à 20 °C (Li *et al.*, 1997 ; Fatema *et al.*, 2017).

L'activité enzymatique augmentent généralement de façon exponentielle à mesure que la température augmente puis diminuent au-delà des températures optimales (DeLong *et al.*, 2017 ;Ritchie, 2018).Les déclinis sont généralement attribués à des changements d'état des enzymes résultant de différents mécanismes, y compris la dénaturation des enzymes, des changements dans la distribution des charges au niveau du site actif, des changements dans la capacité thermique des intermédiaires liés aux enzymes, sensibilité à la température différentielle des transitions substrat-enzyme et enzyme-produit (Husain *et al.*, 2011 ; Yadav et Prakash, 2009 ; DeLong *et al.*, 2017 ; Ritchie, 2018 ; Almeida et Marana, 2019).

3.3. Influence du pH sur l'activité phytasique et amylosique des graines de *M. oleifera*

L'étude de l'effet du pH sur les activités phytasique et amylosique de l'extrait brut des graines de *M. oleifera* a été effectuée à pH 5, pH 7 (Tampon phosphate à 0.1M) et à pH 9 (tampon glycine-NaOH à 0.1M).

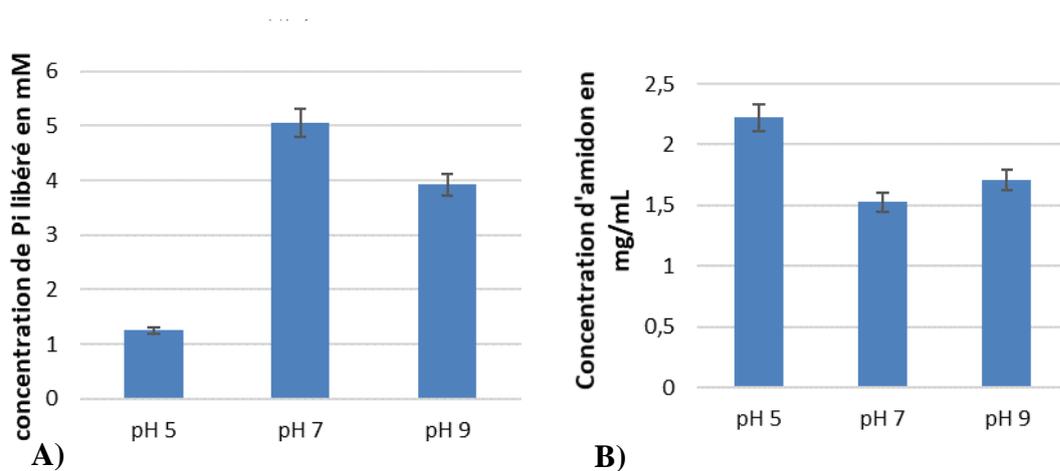


Figure 9 : Etude de l'influence du pH sur l'activité phytasique (A) et amylosique (B) des graines de *M. oleifera*.

On remarque que les activités enzymatiques des 2 enzymes sont détectées aux différents pHs testés. A pH5, l'activité phytasique est sévèrement affectée (Figure 9 A).

Le pH optimal de l'activité phytasique de l'extrait brut enzymatique des graines de *M. oleifera* est de pH7 (Figure 9 A). Des activités enzymatiques optimales à pH 7 ont été déjà trouvées chez *M. oleifera*. Derso et Dagnew, (2019) ont montré que l'enzyme de coagulation du lait (des protéases) de *M. oleifera* possède un pH optimal de 7. Abd-EIKhalek *et al.*, (2020) ont montré que la protéase de feuille *M. oleifera* possède un pH optimal de 7. Aussi, d'autres travaux ont montré que l'activité enzymatique maximale des phytases des haricots mungo est de 7,5 (Mandal *et al.*, 1972 in Bohn *et al.*, 2008).

Par contre, le pH optimal de notre échantillon est supérieur au pH optimal des phytases des Noisette (pH 5) (Andriotis et Ross, 2003) et inférieure à celui des phytases de la plante *Typha latifolia* (pH 8) (Hara *et al.*, 1985).

Des recherches montrées que la plupart des phytases végétales ont tendance à avoir un pH optimal à 5 (Wodzinski et Ullah, 1996 ; Kumar *et al.*, 2012). De plus, Sandberg et Svanberg, (1991) ont montré que les phytases des céréales ont un pH optimal de 5. Par contre, à pH5 l'activité phytasique de l'extrait brut enzymatique des graines de *M. oleifera* est sévèrement affectée (Figure 9 A).

A pH 9, l'extrait brut enzymatique des graines de *M. oleifera* présente une assez bonne activité phytasique (Figure 9 A). Par contre, Li *et al.*, (1997) ont montré que les phytases des racines de tomate perdaient leur activité à pH9. Des études ont montré, aussi, qu'une enzyme de *M. oleifera*, une protéase, possédait une activité optimale à un pH alcalin de 8 (Banik *et al.*, 2018).

Les phytases peuvent être classées en phytases acides et en phytases alcalines sur la base du pH optimal (Greiner et Konietzny, 2006 ; Jorquera *et al.*, 2008). Les phytases peuvent être classées en phytases acides avec un pH optimal de 3,5-6,0 et les phytases alcalines avec un pH optimal de pH 7,0-8,0 (Gupta *et al.*, 2015). D'après les résultats qu'on a obtenus, les phytases de l'extrait brut enzymatique des graines de *M. oleifera* sont des phytases alcalines avec un pH optimal de 7 et une activité à pH 9.

Pour les amylases de l'extrait brut enzymatique des graines de *M. oleifera*, on remarque que leur activité est détectée aux différents pHs testés (Figure 9 B). Des études ont

montré que l'activité amylasique peut s'adapter à des milieux acides (pH 2,8 à 3,0) ou alcalins (pH 8 à 8,5) (Bourgeois *et al.*, 1988).

Le pH optimal des amylases de notre extrait est de 5 (Figure 9 B), nos résultats concordent avec les travaux de Dahot *et al.*, (2001) où le pH optimum de l'amylase des graines de *M. oleifera* à une activité enzymatique maximale à pH 5. D'autres travaux ont montré aussi que des amylases avec des pHs optimaux acides, respectivement, de 4,8 pour les amylases des graines de blé (Kashem *et al.*, 2013) et de 6 pour les amylases de la pomme (Saini *et al.*, 2016).

A pH 7, l'activité amylasique de notre extrait diminue un petit peu comparé à l'activité au pH 5 (Figure 9 B). Pour d'autres enzymes de *M. oleifera*, telles que les protéases, il a été montré que pH 7 est le pH optimal d'activité (Derso et Dagneu, 2019 ; Abd-ElKhalek *et al.*, 2020).

A pH 9 l'extrait brut enzymatique des graines de *M. oleifera* présente une activité amylasique proche de celle de l'activité maximale. Banik *et al.*, (2018) ont montré que l'enzyme protéase des feuilles de *M. oleifera* possède aussi une bonne activité à pH 9.

Nos résultats montrent 2 profils différents d'activités enzymatiques en fonction des pHs pour les 2 enzymes recherchées. Les pHs optimaux de ces 2 enzymes étudiées, phytases et amylases, sont différents et sont, respectivement, de 7 et de 5 (Figure 9). Des résultats similaires, de pHs optimaux différents pour 2 enzymes différentes d'un même organisme a été déjà démontré. En effet, 2 enzymes de *M. oleifera*, une peroxydase et une protéase, possèdent des pHs optimaux, respectivement, de pH5 et de pH8 (Banik *et al.*, 2018 ; Agunbiade *et al.*, 2021). Cette différence d'activité en fonction du pH est une propriété de base de tous les enzymes probablement en raison d'une altération de la conformation de la protéine enzymatique causée par les changements de pH de son environnement (Farkhanda, 2016).

3.4. Effet du traitement thermique sur la stabilité des phytases et amylases des graines de *M. oleifera*

Afin d'étudier l'effet de haute température sur la stabilité des phytases et des amylases, l'extrait brut enzymatique de la poudre de *M. oleifera* des deux enzymes sont étaient pré-incubées à 90°C. Ensuite, la stabilité des phytases et des amylases est déterminée en mesurant leur activité résiduelle après 1h et 2h de traitements à 90°C. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante :

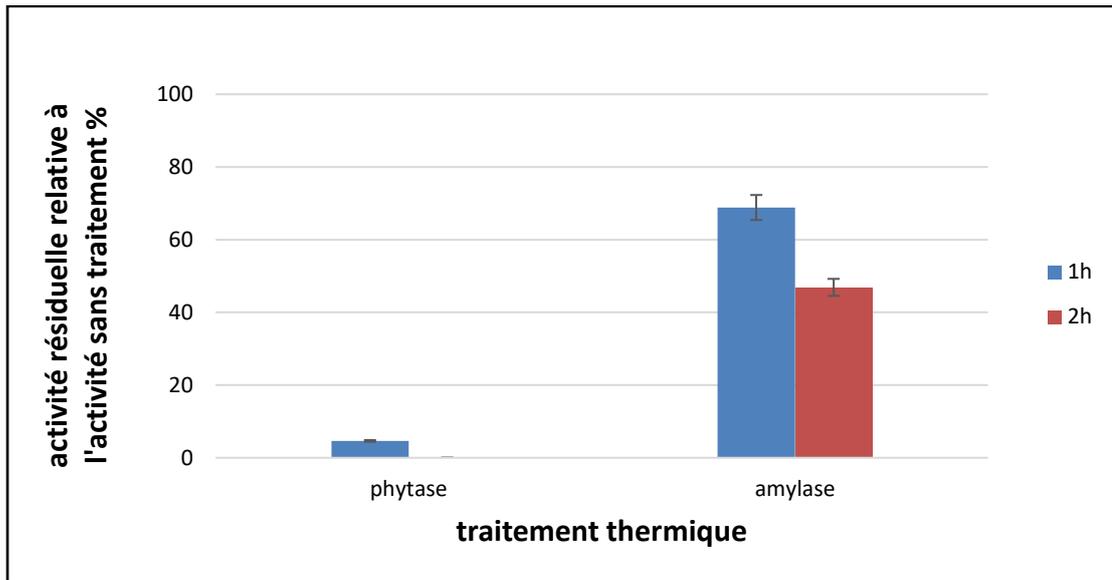


Figure 10 : Effet du traitement thermique sur la stabilité des phytases et amylases des graines de *M. oleifera*

Après traitement de 1h et 2h à 90°C, les phytases ont perdue, respectivement, 95,36% et 100% de leur activité (Figure 10), ce qui montre que les phytases de la solution de poudre de *M. oleifera* est sévèrement affectée par le traitement à 90°C. Des travaux sur la stabilité des phytases aux traitements thermiques ont montrée, qu’après 1h de traitement à des températures supérieures à 60°C, l'activité des phytases des racines de tomate diminue (Li *et al.*, 1997).

Concernant la stabilité des enzymes de *M. oleifera*, les travaux de Derso et Dagnew, (2019) ont montré que l'enzyme de coagulation du lait de *M. oleifera* pouvait retenir plus de 80% de de son activité après 1h de traitement à 55°C et 50 % de son activité après 2h de traitement à 60°C.

Les résultats obtenus montrent que les phytases de notre échantillon sont moins stables que les phytases hautement thermostable d'*Aspergillus fumigatus*. En effet, ces derniers restent stables même à des températures allant jusqu'à 100°C avec une perte de seulement 10% de leur activité enzymatique initiale (Pasamonts *et al.*, 1997).

Par contre l'activité amylasique de la solution de poudre de *M. oleifera* reste active après le traitement de 1h et 2h à 90°C. Ces enzymes retiennent, respectivement, 68,85% et 46,88% de leur activité initiale (Figure 10). Nos résultats concordent avec les travaux de Dahot *et al.*, (2001) qui ont montré que l'amylase des graines de *M. oleifera* conserve plus de 35% d'activité à 90°C.

Les amylases de la solution de poudre de *M. oleifera* qu'on a testée, sont moins stables que les amylases de maïs qui ont démontré une stabilité maximale à 90°C (Biazus *et al.*, 2009). Par contre, les amylases de notre échantillon sont plus stables que les amylases de *Bacillus amyloliquefaciens* qui perdent leur stabilité à 90°C (Fitter et Haber, 2004).

Simair *et al.*, (2017) ont rapportés que l'amylase de *Bacillus* sp reste stable à 100 % jusqu'à une température de 65°C et après 1h de traitement.

La stabilité thermique des enzymes, ou stabilité à la température, est souvent liée à la stabilité élevée aux autres agents dénaturants (forte force ionique, pH élevé, solvants organiques, etc.) (Owusu et Cowan, 1989 in Cornec *et al.*, 1997).

Le mécanisme de thermoinactivation irréversible des enzymes à des températures élevées est connu comme défavorable pour la stabilité des enzymes car elles favorisent les processus de dépliement et/ou d'agrégation par désamidation, hydrolyse des liaisons peptidiques, élimination des ponts disulfures...etc.) (Vieille et Zeikus, 2001). D'autre part, les enzymes résistantes à une inactivation irréversible à haute température sont plus thermostables, que leur homologue mésophile, ce qui les rend extrêmement intéressantes pour les procédés industriels (Vieille et Zeikus, 2001).

Les amylases des graines de *M. oleifera* caractérisées dans cette étude, sont potentiellement, des enzymes thermostables contrairement aux phytases caractérisées dans cette étude.

3.5. Effet du pH sur la stabilité des phytases et amylases des graines de *M. oleifera*

Afin d'étudier l'effet du pH (acide et alcalin) sur la stabilité des phytases et des amylases, l'extrait brut enzymatique de la poudre de *M. oleifera* ont été pré-incubés dans du HCl et dans du NaOH à une concentration de 1 M. Ensuite, la stabilité des phytases et des amylases est déterminée en mesurant leur activité résiduelle après 1h et 2h de traitement acide et basique. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante :

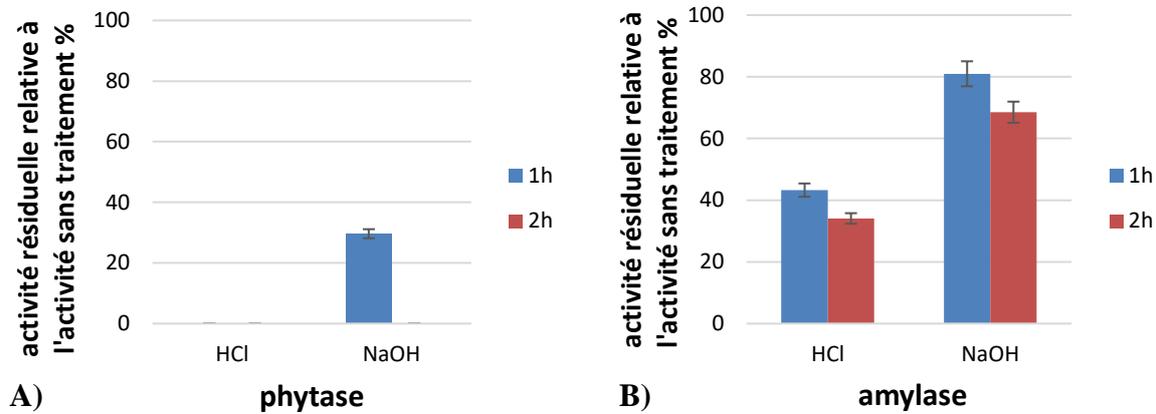


Figure 11 : Effet du pH sur la stabilité des phytases (A) et des amylases (B) des graines de *M. oleifera*

Les résultats obtenus montrent que l'activité phytasique de l'extrait brut des graines de *M. oleifera*, est sévèrement affectée par le traitement pH (Figure 11 A). En effet, après 1h de traitement à pH acide (1M d'HCl), les phytases perdent 100% de leur activité, et après 1h de traitement à pH alcalin (1M de NaOH) elles ne gardent que 29.66% de leur activité. L'activité phytasique est 100% perdue après 2h de traitement à pH alcalin (NaOH) (Figure 11A). Nos résultats ne concordent pas avec les résultats des études sur la stabilité des enzymes purifiées à partir des feuilles de *M. oleifera*, une protéase et une peroxydase, ont montré que la stabilité des 2 enzymes est relativement faible dans les pHs alcalin que dans les pHs acide (Khatun *et al.*, 2012 ; Derso et Dagneu, 2019) alors que nos résultats montrent que les phytases testées non pas de stabilité à ces traitements pHs et qu'elles sont plus affectées par le traitement acide.

De plus, nos résultats montrent que les phytases de notre échantillon sont moins stables que les phytases des racines de tomate qui ont conservé 90% de leur activité d'origine après 1h de traitement à des pH acides, par contre, ces phytases sont devenues très instables à pH alcalin (Li *et al.*, 1997). D'autres résultats de Nakano *et al* en 1999 ont montrés que les phytases extraites et purifiées des fibres de *Triticum aestivum* présentaient une stabilité enzymatique maximale à des pHs acides.

D'autre part la stabilité des amylases de l'extrait brut de la solution des graines *M. oleifera* est plus sensible au traitement acide que le traitement alcalin qui retiennent, respectivement, 43.27% et 80.98% après 1h de traitement et 34.09% et 68.52% après 2h de traitement (Figure 11B). Ce qui est très proche de ce qui été rapporté par les travaux de Simair *et al* en 2017 et qui ont montré que la stabilité des amylases relativement faibles dans les pHs acides que dans les pHs alcalins.

Nos résultats montrent que les traitements acide et alcalin affectent la stabilité des phytases et amylases des graines de *M. oleifera*, mais les phytases sont plus sévèrement que les amylases. De plus, ces dernières sont plus affectées par le traitement acide que le traitement alcalin.

Le pH a un effet marqué sur la stabilité, la structure et la fonction des enzymes en raison de sa capacité à influencer les interactions électrostatiques des groupements ionisables (acides ou basiques) portés par les 2 acides aminés situés aux extrémités N- et C-terminales et par les chaînes latérales des acides aminés qui constituent la chaîne polypeptidique (Kumar *et al.*, 2004 ; Venkataramani *et al.*, 2013 ; Littlechild, 2017).

La plupart des enzymes fonctionnent de manière optimale à un pH particulier (le pH de stabilité maximale). En conséquence, des valeurs de pH acides ou basiques induisent un dépliement et/ou d'agrégation conduise à une perte totale, irréversible, de la stabilité enzymatique (Kumar *et al.*, 2004 ; Venkataramani *et al.*, 2013). D'autre part, les enzymes extrêmophiles ont une bonne stabilité dans des conditions de pH extrême et sont appelés acidophiles ou alcalophiles, ce qui les rend extrêmement intéressantes pour les procédés industriels (Littlechild, 2017 ; Rigoldi *et al.*, 2018).

Les amylases des graines de *M. oleifera* caractérisées dans cette étude, sont potentiellement, des enzymes stables contrairement aux phytases caractérisées dans cette étude.

Le tableau suivant récapitule les résultats obtenus de la caractérisation des phytases et des amylases des graines de *M. oleifera*.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des résultats de la caractérisation de l'activité et de la stabilité des phytases et des amylases des graines de *M. oleifera*.

	Activité enzymatique		Stabilité enzymatique (activité résiduelle)		
	pH optimale	Température optimale	Stabilité à 90°C	Stabilité à pH acide (HCl)	Stabilité à pH alcalin (NaOH)
Phytase	7.0	37°C	Faible	Faible	Faible
Amylase	5.0	45°C	Forte	Moyenne	Forte

4. Discussion générale

Comme il a été cité dans la partie synthèse bibliographique, les phytases et les amylases sont des enzymes qui existent de manière omniprésente dans la nature et peuvent être obtenues à partir d'animaux, de microorganismes et de plantes (Gupta *et al.*, 2015 ; Anbu *et al.*, 2017). Ces 2 enzymes ont de larges applications dans un grand nombre de procédés industriels. Les phytases jouent un rôle de premier plan dans l'industrie alimentaire et la nutrition animale monogastrique (Borgi, 2015). Les amylases ont une grande importance dans les applications industrielles comme celles de l'alimentation, de la fermentation, des détergents, des produits pharmaceutiques, la saccharification (Simair *et al.*, 2017 ; Cangussu *et al.*, 2018).

Les phytases et les amylases purifiées des grains de *M. oleifera* ont des profils différents, elles ont un pH optimal d'activité, respectivement, à pH 7 et pH 5 et une température optimale d'activité, respectivement, à 37°C et à 45°C.

Pour l'étude de la stabilité thermique, le traitement à 90°C a affecté les 2 enzymes. Les phytases des graines de *M. oleifera* ont perdu, 95,36% de leur activité. Ces phytases ne peuvent pas être utilisées en industrie nécessitant des conditions des températures extrêmes, telles que les industries alimentaires pour la préparation de l'alimentation animale et les compléments alimentaires (Kalsi *et al.*, 2016 ; Pires *et al.*, 2019).

Les amylases des graines de *M. oleifera* retiennent 68.85% de leur activité initiale, ce qui peut permettre leur utilisation potentielle dans des industries nécessitant des températures élevées et des enzymes thermostables telles que l'industrie de l'amidon, la saccharification et la liquéfaction de l'amidon (Saxena et Singh, 2011 ; Gurung *et al.*, 2013 ; Simair *et al.*, 2017).

Pour l'étude de la stabilité des 2 enzymes aux différents pHs, les résultats ont montré que les traitements acide et alcalin ont affecté les 2 enzymes mais plus sévèrement l'activité phytasique. En effet, après traitement à pH acide (1 M d'HCl) les phytases perdent 100% de leur activité, et après traitement à pH alcalin (1 M de NaOH) elles ne gardent que 29.66% de leur activité. Comme l'estomac est le principal site fonctionnel des phytases additionnelles, et les phytases qu'on a caractérisées sont instables à un pH acide, elles ne pourront, donc, pas être utilisées dans l'industrie alimentaire (kalsi *et al.*, 2016).

Les amylases des graines de *M. oleifera* retiennent, après traitement à pH acide (1M d'HCl) et à pH alcalin (1M de NaOH), respectivement, 43.27% et 80.98% de leur activité initiale. Ces résultats indiquent la nature alcalophile de l'enzymes, qui est caractéristique industriellement importante pour en faire un additif approprié dans l'industrie des détergents (Simair et al., 2017). De plus, ces amylases gardaient une certaine activité après traitement à pH acide, ce qui facilite son utilisation dans l'industrie alimentaire (préparation des pâtes), la transformation des jus et des fruits, la boulangerie et la brasserie (Souza et Magalhães, 2010).

Les résultats obtenus des différents traitements, thermique et acido-basique, ont montré que les amylases sont plus stables que les phytases.

*C*onclusion et perspectives

L'objectif de cette étude est de rechercher et de caractériser des activités enzymatiques des graines de *M. oleifera*, en vue de valoriser ces graines, pour leur intérêt industriel. Pour cela, l'activité et la stabilité de deux enzymes, les phytases et les amylases, ont été recherchées et caractérisées chez les graines de *M. oleifera*.

Les résultats de l'étude de l'influence des températures et du pHs sur l'activité de ces deux enzymes ont montré que la température optimale de l'activité phytasique est de 37°C et celle de l'activité amylasique est de 45°C. Le pH optimal de l'activité phytasique est de pH7 et celle de l'activité amylasique est de pH5.

Pour mieux caractériser ces deux enzymes (les phytases et les amylases), et connaître la possibilité de leur utilisation dans l'industrie, des tests supplémentaires étaient effectués par détermination de la stabilité de ces deux enzymes à une température élevée (90°C) et à des pHs extrêmes (1 M HCl et 1M NaOH).

Les résultats du traitement thermique ont montré qu'après 2h de traitement à 90°C, les phytases perdaient 100% de leurs activités initiales, par contre, les amylases restaient actives après ce traitement et retenaient 46,88% de leurs activités initiales.

Les résultats des traitements acido-basiques (1 M d'HCl et 1 M de NaOH) ont montré qu'après 2h de traitement, les phytases perdaient 100% de leur activité. Par contre, les amylases retenaient 34.09% et 68.52% de leur activité après 2h de traitement, respectivement, avec 1M d'HCl et 1M de NaOH.

Les résultats de traitement obtenus montrent que les amylases possèdent une certaine stabilité face aux conditions extrêmes de température et de pH, ce qui leur permet d'être utilisées dans des processus industriels qui nécessitent généralement des conditions extrêmes de températures et de pHs. Ce qui n'est pas le cas des phytases qui ont montré une sensibilité aux 2 traitements.

Afin de mieux caractériser les activités enzymatiques présentes au niveau des graines de *M. oleifera* d'autres enzymes à intérêt industriel peuvent être recherchées et caractérisées, telles que des protéases, des lipases, des glucosidases, des cellulases...etc. De plus des tests supplémentaires peuvent être effectués, tels que la détermination de leur constante de Michaelis, leur séquences en acides aminés, leur poids moléculaire, leur structure et leur formation tridimensionnelle.

Conclusion et perspectives

De plus, des enzymes d'autres parties de cette plante c'est-à-dire les racines, les écorces, les fruits et les feuilles peuvent être aussi recherchées et caractérisées.

Références bibliographiques

- 1. Abd-ElKhalek, A. M., Seoudi, D. M., Ibrahim, O. A., Abd-Rabou, N. S., & Abd ElAzeem, E. M. (2020).** Extraction, partial purification, characteristics, and antimicrobial activity of plant protease from *Moringa Oleifera* leaves. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 7(4), 243-250.
- 2. Abdull Razis, A. F., Ibrahim, M. D., & Kntayya, S. B. (2014).** Health benefits of *Moringa oleifera*. *Asian pacific journal of cancer prevention*, 15(20), 8571-8576.
- 3. Adamczyk, B., Smolander, A., Kitunen, V., & Godlewski, M. (2010).** Proteins as nitrogen source for plants: a short story about exudation of proteases by plant roots. *Plant signaling & behavior*, 5(7), 817-819.
- 4. Adeola, O., & Cowieson, A. J. (2011).** Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *Journal of animal science*, 89(10), 3189-3218.
- 5. Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014).** Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
- 6. Agarwal, P. K. (2018).** A biophysical perspective on enzyme catalysis. *Biochemistry*, 58(6), 438-449.
- 7. Agunbiade, O. J., Famutimi, O. G., Kadiri, F. A., Kolapo, O. A., & Adewale, I. O. (2021).** Studies on peroxidase from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Heliyon*, 7(1), e06032.
- 8. Ahuja, S. K., Ferreira, G. M., & Moreira, A. R. (2004).** Utilization of enzymes for environmental applications. *Critical reviews in biotechnology*, 24(2-3), 125-154.
- 9. Akhtar, M. K., & Jones, P. R. (2014).** Cofactor engineering for enhancing the flux of metabolic pathways. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2, 30.
- 10. Almeida, V. M., & Marana, S. R. (2019).** Optimum temperature may be a misleading parameter in enzyme characterization and application. *PloS one*, 14(2), e0212977.
- 11. Anbu, P., Gopinath, S. C., Chaulagain, B. P., & Lakshmipriya, T. (2017).** *Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2016*.
- 12. Andriotis, V. M., & Ross, J. D. (2003).** Isolation and characterisation of phytase from dormant *Corylus avellana* seeds. *Phytochemistry*, 64(3), 689-699.
- 13. Ann Benore, M. (2019).** What is in a name?(or a number?): The updated enzyme classifications.

14. Anwar, F., Ashraf, M., & Bhangar, M. I. (2005). Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(1), 45-51.
15. Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2007). *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(1), 17-25.
16. Arora, D. S., Onsare, J. G., & Kaur, H. (2013). Bioprospecting of *Moringa* (Moringaceae): microbiological perspective. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 1(6), 193-215.
17. Aspeborg, H., Coutinho, P. M., Wang, Y., Brumer, H., & Henrissat, B. (2012). Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC evolutionary biology*, 12(1), 1-16.
18. Balakireva, A. V., & Zamyatnin, A. A. (2018). Indispensable role of proteases in plant innate immunity. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 629.
19. Banik, S., Biswas, S., & Karmakar, S. (2018). Extraction, purification, and activity of protease from the leaves of *Moringa oleifera*. *F1000Research*, 7.
20. Baysal, T., & Demirdöven, A. (2007). Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme and microbial technology*, 40(4), 491-496.
21. Benhamou, N., & Rey, P. (2012). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes: une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. I. Principes de la résistance induite. *Phytoprotection*, 92(1), 1-23.
22. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Enzymes accelerate reactions by facilitating the formation of the transition state. *Biochemistry*, 5th ed.; WH Freeman: New York, NY, USA.
23. Bhargav, S., Panda, B. P., Ali, M., & Javed, S. (2008). Solid-state fermentation: an overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22(1), 49-70.
24. Bhattacharya, A., Tiwari, P., Sahu, P. K., & Kumar, S. (2018). A review of the phytochemical and pharmacological characteristics of *Moringa oleifera*. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 10(4), 181.
25. Biazus, J. P. M., Souza, R. R. D., Márquez, J. E., Franco, T. T., Santana, J. C. C., & Tambourgi, E. B. (2009). Production and characterization of amylases from *Zea mays* malt. *Brazilian archives of Biology and technology*, 52(4), 991-1000.

26. **Bohec, P. (2012).** *Étude du comportement hors-équilibre du cortex cellulaire* (Doctoral dissertation, Université Paris-Diderot-Paris VII).
27. **Bohn, L., Meyer, A. S., & Rasmussen, S. K. (2008).** Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(3), 165-191.
28. **Borgi, M. A., Boudebouze, S., Mkaouar, H., Maguin, E., & Rhimi, M. (2015).** Bacillus phytases: Current status and future prospects. *Bioengineered*, 6(4), 233-236.
29. **Bose, C. K. (2007).** Possible role of *Moringa oleifera* Lam. root in epithelial ovarian cancer. *Medscape General Medicine*, 9(1), 26.
30. **Bourgeois, C. M., Mescle, J. F., Zucca, J., & Larpent, J. P. (1988).** Microbiologie alimentaire. v. 1: Aspect microbiologique de la securite et de la qualite alimentaires.
31. **Boyce, S. I. N. E. A. D., Tipton, K. E. I. T. H., & McDonald, A. G. (2004).** Extending enzyme classification with metabolic and kinetic data: some difficulties to be resolved. In *Proceedings of the 1st International Beilstein Workshop on Experimental Standard Conditions of Enzyme Characterizations*. Beilstein Institut, Frankfurt, Germany (pp. 17-43).
32. **Boyce, S., & Tipton, K. F. (2001).** Enzyme classification and nomenclature. *e LS*.
33. **Brooker, C. (2000).** *Le corps humain: Étude, structure et fonction*. De Boeck Supérieur.
34. **Bullock, A., Ziervogel, K., Ghobrial, S., Smith, S., McKee, B., & Arnosti, C. (2017).** A multi-season investigation of microbial extracellular enzyme activities in two temperate coastal North Carolina rivers: Evidence of spatial but not seasonal patterns. *Frontiers in microbiology*, 8, 2589.
35. **Cabrera, M. Á., & Blamey, J. M. (2018).** Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. *Biological research*, 51.
36. **Cabugao, K. G., Timm, C. M., Carrell, A. A., Childs, J., Lu, T. Y. S., Pelletier, D. A., ... & Norby, R. J. (2017).** Root and rhizosphere bacterial phosphatase activity varies with tree species and soil phosphorus availability in Puerto Rico tropical forest. *Frontiers in plant science*, 8, 1834.
37. **Cangussu, A. S. R., Aires Almeida, D., Aguiar, R. W. D. S., Bordignon-Junior, S. E., Viana, K. F., Barbosa, L. C. B., ... & Lima, W. J. N. (2018).** Characterization of the catalytic structure of plant phytase, protein tyrosine phosphatase-like phytase, and histidine acid phytases and their biotechnological applications. *Enzyme research*, 2018.

38. Carillo, S., Pariat, M., Jariel-Encontre, I., Steff, A. M., & Piechaczyk, M. (1995). Le catabolisme protéique intracellulaire: une fonction biologique majeure. Partie I: les mécanismes de dégradation.
39. COMBES, D., & MONSAN, P. (2009). Biocatalyse ou catalyse enzymatique. *Techniques de l'ingénieur. Bioprocédés*, (BIO590).
40. Cooper, G. M. (2000). The central role of enzymes as biological catalysts. Sinauer Associates.
41. Copeland, R. A. (2000). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. John Wiley & Sons.
42. Cornec, L., Loaec, M., Rougeaux, H., Guezennec, J., & Dietrich, J. (1997). Molécules d'intérêt biotechnologique issues des micro-organismes hydrothermaux: enzymes thermostables et polysaccharides.
43. Costa, H. M., Júnior, A. C. F., Amaral, I. P., Hirata, I. Y., Paiva, P. M., Carvalho, L. B., ... & Bezerra, R. S. (2013). Metal-sensitive and thermostable trypsin from the crevalle jack (*Caranx hippos*) pyloric caeca: purification and characterization. *BMC Chemistry*, 7(1), 1-8.
44. Cottret, L. (2009). *Analyse systémique de la symbiose intracellulaire: évolution et organisation du réseau métabolique des endocytobiotés* (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).
45. Cuesta, S. M., Rahman, S. A., Furnham, N., & Thornton, J. M. (2015). The classification and evolution of enzyme function. *Biophysical journal*, 109(6), 1082-1086.
46. Dahiya, S. (2016). Role of phytate and phytases in human nutrition. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 1(1), 39-42.
47. Dahot, M. U., Saboury, A. A., Ghobadi, S., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2001). Properties of the alpha amylase from *Moringa oleifera* seeds. *Journal of Biological Sciences*, 1(8), 747-749.
48. Dalai, R. C. (1977). Soil organic phosphorus. *Advances in agronomy*, 29, 83-117.
49. Dehshahri, S., Afsharypuor, S., Asghari, G., & Mohagheghzadeh, A. (2012). Determination of volatile glucosinolate degradation products in seed coat, stem and in vitro cultures of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. *Research in pharmaceutical sciences*, 7(1), 51.
50. DeLong, J. P., Gibert, J. P., Luhring, T. M., Bachman, G., Reed, B., Neyer, A., & Montooth, K. L. (2017). The combined effects of reactant kinetics and enzyme

stability explain the temperature dependence of metabolic rates. *Ecology and Evolution*, 7(11), 3940-3950.

51. **Derso, A. G., & Dagneu, G. G. (2019).** Isolate and Extract for Milk Clotting Enzymes from the leaves of Moringa Oleifera, Carica Papaya and Mangifera Indica and Use in Cheese Making: The Case of Western Hararage Region, Ethiopia. *Journal of Food and Nutrition Research*, 7(3), 244-254.
52. **Dubey, D. K., Dora, J., Kumar, A., & Gulsan, R. K. (2013).** A multipurpose tree- Moringa oleifera. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 2(1), 415-423.
53. **Espósito, T. S., Amaral, I. P., Buarque, D. S., Oliveira, G. B., Carvalho Jr, L. B., & Bezerra, R. S. (2009).** Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry*, 112(1), 125-130.
54. **Fatema, F., Khan, Z. H., Khan, N. D., & Mular, S. M. (2017).** Determination of amylase activity from germinated Syzygium cumini seed (jamun). *International Journal of Applied Research*, 3(1), 573-575
55. **Ferrara, P., Acquaviva, C., Bossis, G., Piechaczyk, M., & Jariel-Encontre, I. (2001).** Protéolyse intracellulaire et tumorigène.
56. **Ferrari, M., Folli, C., Pincolini, E., McClintock, T. S., Rössle, M., Berni, R., & Cianci, M. (2012).** Structural characterization of recombinant crustacyanin subunits from the lobster Homarus americanus. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 68(8), 846-853.
57. **Fischer, J. D., Holliday, G. L., & Thornton, J. M. (2010).** The CoFactor database: organic cofactors in enzyme catalysis. *Bioinformatics*, 26(19), 2496-2497.
58. **Fitter, J., & Haber-Pohlmeier, S. (2004).** Structural stability and unfolding properties of thermostable bacterial α -amylases: a comparative study of homologous enzymes. *Biochemistry*, 43(30), 9589-9599.
59. **Foidl, N., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001).** The potential of Moringa oleifera for agricultural and industrial uses. *What development potential for Moringa products*, 20.
60. **Galuppo, M., Nicola, G. R. D., Iori, R., Dell'Utri, P., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2013).** Antibacterial activity of glucomoringin bioactivated with myrosinase against two important pathogens affecting the health of long-term patients in hospitals. *Molecules*, 18(11), 14340-14348.

61. Gao, C. Q., Ji, C., Zhao, L. H., Zhang, J. Y., & Ma, Q. G. (2013). Phytase transgenic corn in nutrition of laying hens: Residual phytase activity and phytate phosphorus content in the gastrointestinal tract. *Poultry science*, 92(11), 2923-2929.
62. Gao, C., Ma, Q., Zhao, L., Zhang, J., & Ji, C. (2014). Effect of dietary phytase transgenic corn on physiological characteristics and the fate of recombinant plant DNA in laying hens. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(1), 77.
63. Garg, P., & Burgers, P. M. (2005). DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 40(2), 115-128.
64. Gari, R. R. S., Chattrakun, K., Marsh, B. P., Mao, C., Chada, N., Randall, L. L., & King, G. M. (2019). Direct visualization of the E. coli Sec translocase engaging precursor proteins in lipid bilayers. *Science advances*, 5(6), eaav9404.
65. Gianfreda, L. (2015). Enzymes of importance to rhizosphere processes. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(2), 283-306.
66. Gómez, E. J., Delgado, J. A., & González, J. M. (2020). Persistence of microbial extracellular enzymes in soils under different temperatures and water availabilities. *Ecology and Evolution*, 10(18), 10167-10176.
67. Gong, J. S., Li, W., Zhang, D. D., Xie, M. F., Yang, B., Zhang, R. X., ... & Shi, J. S. (2015). Biochemical characterization of an arginine-specific alkaline trypsin from *Bacillus licheniformis*. *International journal of molecular sciences*, 16(12), 30061-30074.
68. Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food science and human wellness*, 5(2), 49-56.
69. Greenfield, L. M., Hill, P. W., Paterson, E., Baggs, E. M., & Jones, D. L. (2020). Do plants use root-derived proteases to promote the uptake of soil organic nitrogen?. *Plant and soil*, 456(1), 355-367.
70. Greiner, R., & Konietzny, U. (2006). Phytase for food application. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2).
71. Greiner, R., & Konietzny, U. (2006). Phytase for food application. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2).
72. Gueguen, M., & Lenoir, J. (1975). Aptitude de l'espèce *Geotrichum candidum* à la production d'enzymes protéolytiques. *Le Lait*, 55(543-544), 145-162.

73. Guillotin, L., Assaf, Z., Pistorio, S. G., Lafite, P., Demchenko, A. V., & Daniellou, R. (2019). Hydrolysis of glycosyl thioimidates by glycoside hydrolase requires remote activation for efficient activity. *Catalysts*, 9(10), 826.
74. Gupta, R. K., Gangoliya, S. S., & Singh, N. K. (2015). Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *Journal of food science and technology*, 52(2), 676-684.
75. Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, 2013.
76. Hamin Neto, Y. A. A., da Rosa Garzon, N. G., Pedezzi, R., & Cabral, H. (2018). Specificity of peptidases secreted by filamentous fungi. *Bioengineered*, 9(1), 30-37.
77. Hara, A., Ebina, S., Kondo, A. et Funaguma, T. (1985). Un nouveau type de phytase du pollen de *Typha latifolia* L. *Chimie agricole et biologique*, 49 (12), 3539-3544.
78. Hartenstein, V., & Martinez, P. (2019). Structure, development and evolution of the digestive system.
79. Hasan, M., Cheng, Y., Kanwar, M. K., Chu, X. Y., Ahammed, G. J., & Qi, Z. Y. (2017). Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review. *Frontiers in plant science*, 8, 1492.
80. He, C., Han, T., Liao, X., Zhou, Y., Wang, X., Guan, R., ... & Chen, J. Y. (2018). Phagocytic intracellular digestion in amphioxus (Branchiostoma). *Proceedings of the Royal Society B*, 285(1880), 20180438.
81. Heinonen, J. K., & Lahti, R. J. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical biochemistry*, 113(2), 313-317.
82. Hood, E. E., Devaiah, S. P., Fake, G., Egelkrout, E., Teoh, K., Requesens, D. V., ... & Howard, J. A. (2012). Manipulating corn germplasm to increase recombinant protein accumulation. *Plant biotechnology journal*, 10(1), 20-30.
83. Hughes, A. L., Dahiya, J. P., Wyatt, C. L., & Classen, H. L. (2009). Effect of Quantum phytase on nutrient digestibility and bone ash in White Leghorn laying hens fed corn-soybean meal-based diets. *Poultry science*, 88(6), 1191-1198.
84. Husain, Q., Ansari, S. A., Alam, F., & Azam, A. (2011). Immobilization of *Aspergillus oryzae* β galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(1), 37-43.

- 85. Jackson, C. R., Tyler, H. L., & Millar, J. J. (2013).** Determination of microbial extracellular enzyme activity in waters, soils, and sediments using high throughput microplate assays. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (80).
- 86. Jed, W. F., & Fahey, S. D. (2005).** Moringa oleifera: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. *Trees for life journal*, 1(5).
- 87. Jegannathan, K. R., & Nielsen, P. H. (2013).** Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. *Journal of cleaner production*, 42, 228-240.
- 88. Jesús-de la Cruz, K., Álvarez-González, C. A., Peña, E., Morales-Contreras, J. A., & Ávila-Fernández, Á. (2018).** Fish trypsins: potential applications in biomedicine and prospects for production. *3 Biotech*, 8(4), 1-14.
- 89. Johannes, T. W., & Zhao, H. (2006).** Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Current opinion in microbiology*, 9(3), 261-267.
- 90. Jorquera, M., MARTÍNEZ, O. S. C. A. R., 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.
- 91. Jurtshuk, P. (1996).** Bacterial metabolism. *Medical microbiology*, 4.
- 92. Kalappurayil, T. M., & Joseph, B. P. (2017).** A review of pharmacognostical studies on Moringa oleifera lam. flowers. *Pharmacognosy Journal*, 9(1).
- 93. Kalsi, H. K., Singh, R., Dhaliwal, H. S., & Kumar, V. (2016).** Phytases from Enterobacter and Serratia species with desirable characteristics for food and feed applications. *3 Biotech*, 6(1), 64.
- 94. Kapiloff, M. S., & Chandrasekhar, K. D. (2011).** AKAPs: temporal and spatial regulation of intracellular signal transduction in the cardiovascular system. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 58(4), 337.
- 95. Kashem, M. A., Sultana, N., Samanta, S. C., & Kamal, A. M. A. (2013).** Starch, sugar, amylase and invertase activity in the germinating seeds of modern wheat varieties. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 23(2).
- 96. Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001).** Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource technology*, 77(3), 215-227.

- 97. Khatun, S., Ashraduzzaman, M., Karim, M. R., Pervin, F., Absar, N., & Rosma, A. (2012).** Purification and characterization of peroxidase from *Moringa oleifera* L. leaves. *BioResources*, 7(3), 3237-3251.
- 98. Kohli, A., Narciso, J. O., Miro, B., & Raorane, M. (2012).** Root proteases: reinforced links between nitrogen uptake and mobilization and drought tolerance. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 165-179.
- 99. Kou, X., Li, B., Olayanju, J. B., Drake, J. M., & Chen, N. (2018).** Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*, 10(3), 343.
- 100. Kou, X., Li, B., Olayanju, JB, Drake, JM et Chen, N. (2018).** Potentiel nutraceutique ou pharmacologique de *Moringa oleifera* Lam. *Nutriments* , 10 (3), 343.
- 101. Ktari, N., Khaled, H. B., Younes, I., Bkhairia, I., Mhamdi, S., Hamza, I., & Nasri, M. (2014).** Zebra blenny (*Salarias basilisca*) viscera as a source of solvent-stable proteases: characteristics, potential application in the deproteinization of shrimp wastes and evaluation in liquid laundry commercial detergents. *Journal of food science and technology*, 51(11), 3094-3103.
- 102. Kumar, D. P., Tiwari, A., & Bhat, R. (2004).** Effect of pH on the stability and structure of yeast hexokinase A: acidic amino acid residues in the cleft region are critical for the opening and the closing of the structure. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32093-32099.
- 103. Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P., De Boeck, G., & Becker, K. (2012).** Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96(3), 335-364.
- 104. Kumari, U., Singh, R., Ray, T., Rana, S., Saha, P., Malhotra, K., & Daniell, H. (2019).** Validation of leaf enzymes in the detergent and textile industries: launching of a new platform technology. *Plant biotechnology journal*, 17(6), 1167-1182.
- 105. Lewis, T., & Stone, W. L. (2020).** Biochemistry, Proteins Enzymes.
- 106. Li, M., Osaki, M., Honma, M., & Tadano, T. (1997).** Purification and characterization of phytase induced in tomato roots under phosphorus-deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43(1), 179-190.
- 107. Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012).** Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3), e201209017.
- 108. Li, X. B., Gu, J. D., & Zhou, Q. H. (2015).** Review of aerobic glycolysis and its key enzymes—new targets for lung cancer therapy. *Thoracic cancer*, 6(1), 17-24.

109. Liang, L., Wang, C., Li, S., Chu, X., & Sun, K. (2019). Nutritional compositions of Indian Moringa oleifera seed and antioxidant activity of its polypeptides. *Food science & nutrition*, 7(5), 1754-1760.
110. Littlechild, J. A. (2017). Improving the 'tool box' for robust industrial enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(4-5), 711-720.
111. Long, S. P., Marshall-Colon, A., & Zhu, X. G. (2015). Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell*, 161(1), 56-66.
112. Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. (2011). Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately?. *Food Science and Technology*, 31, 603-613.
113. López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433-30437.
114. Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 506-577.
115. Ma, J. K., Drake, P. M., & Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature reviews genetics*, 4(10), 794-805.
116. Madsen, C. K., & Brinch-Pedersen, H. (2019). Molecular advances on phytases in barley and wheat. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2459.
117. Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1997). Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the Moringa oleifera tree. *The Journal of Agricultural Science*, 128(3), 311-322.
118. Mandal, N. C., Burman, S., & Biswas, B. B. (1972). Isolation, purification and characterization of phytase from germinating mung beans. *Phytochemistry*, 11(2), 495-502.
119. Mayer, A. F., Hellmuth, K., Schlieker, H., Lopez-Ulibarri, R., Oertel, S., Dahlems, U., ... & Van Loon, A. P. G. M. (1999). An expression system matures: A highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology and bioengineering*, 63(3), 373-381.
120. McCollum, E. V., & Hart, E. B. (1908). On the occurrence of a phytin-splitting enzyme in animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 4(6), 497-500.

- 121. McDonald, A. G., Boyce, S., Moss, G. P., Dixon, H. B., & Tipton, K. F. (2007).** ExplorEnz: a MySQL database of the IUBMB enzyme nomenclature. *BMC biochemistry*, 8(1), 1-7.
- 122. Meireles, D., Gomes, J., Lopes, L., Hinzmann, M., & Machado, J. (2020).** A review of properties, nutritional and pharmaceutical applications of *Moringa oleifera*: integrative approach on conventional and traditional Asian medicine. *Advances in Traditional Medicine*, 1-21.
- 123. Minaiyan, M., Asghari, G., Taheri, D., Saeidi, M., & Nasr-Esfahani, S. (2014).** Anti-inflammatory effect of *Moringa oleifera* Lam. seeds on acetic acid-induced acute colitis in rats. *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(2), 127.
- 124. Miyabe, I., Kunkel, T. A., & Carr, A. M. (2011).** The major roles of DNA polymerases epsilon and delta at the eukaryotic replication fork are evolutionarily conserved. *PLoS Genet*, 7(12), e1002407.
- 125. 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, 437-449.
- 126. Morot-Gaudry, J. F. (2014).** Les métabolismes photosynthétiques: Intérêts pour l'agronomie.
- 127. Mótyán, J. A., Tóth, F., & Tózsér, J. (2013).** Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3(4), 923-942.
- 128. Moura, M. C., Pontual, E. V., Gomes, F. S., Napoleão, T. H., Xavier, H. S., Paiva, P. M., & Coelho, L. C. B. B. (2011).** Preparations of *Moringa oleifera* flowers to treat contaminated water. *Advances in environmental research*, 21, 269-285.
- 129. Moyo, B., Masika, P. J., Hugo, A., & Muchenje, V. (2011).** Nutritional characterization of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(60), 12925-12933.
- 130. Naidu, M. A., & Saranraj, P. (2013).** Bacterial amylase: a review. *Int J Pharm Biol Arch*, 4(2), 274-287.
- 131. Nakano, T., JoH, T., ToKuMoTo, E., & HAYAKAWA, T. (1999).** Purification and characterization of phytase from bran of *Triticum aestivum* L. cv. Nourin# 61. *Food Science and Technology Research*, 5(1), 18-23.
- 132. Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011).** Role of phosphatase enzymes in soil. In *Phosphorus in action* (pp. 215-243). Springer, Berlin, Heidelberg.

- 133. Olson, M. E., & Fahey, J. W. (2011).** Moringa oleifera: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(4), 1071-1082.
- 134. Olson, M. E., Palada, M. C., Foidl, N., & Bates, R. M. (2019).** Botany and Propagation. *The Miracle Tree: Moringa Oleifera*.
- 135. Omajali, J. B., Mikheenko, I. P., Merroun, M. L., Wood, J., & Macaskie, L. E. (2015).** Characterization of intracellular palladium nanoparticles synthesized by *Desulfovibrio desulfuricans* and *Bacillus benzeovorans*. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(6), 1-17.
- 136. Owusu, R. K., & Cowan, D. A. (1989).** Correlation between microbial protein thermostability and resistance to denaturation in aqueous: organic solvent two-phase systems. *Enzyme and microbial technology*, 11(9), 568-574.
- 137. Oyeyinka, A. T., & Oyeyinka, S. A. (2018).** Moringa oleifera as a food fortificant: Recent trends and prospects. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(2), 127-136.
- 138. Paikra, B. K. (2017).** Phytochemistry and pharmacology of Moringa oleifera Lam. *Journal of pharmacopuncture*, 20(3), 194.
- 139. Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., & Van Loon, A. P. (1997).** Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental microbiology*, 63(5), 1696-1700.
- 140. Pires, E. B. E., de Freitas, A. J., e Souza, F. F., Salgado, R. L., Guimarães, V. M., Pereira, F. A., & Eller, M. R. (2019).** Production of fungal phytases from agroindustrial byproducts for pig diets. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.
- 141. Pontual, E. V., Carvalho, B. E., Bezerra, R. S., Coelho, L. C., Napoleão, T. H., & Paiva, P. M. (2012).** Caseinolytic and milk-clotting activities from Moringa oleifera flowers. *Food Chemistry*, 135(3), 1848-1854.
- 142. Poznanski, S., Lenoir, J., & Mocquot, G. (1965).** La protéolyse de la caséine par les enzymes intracellulaires de certaines bactéries. *Le lait*, 45(441-442), 3-26.
- 143. Price, M. L. (2007).** Le moringa. *Note technique-ECHO (revue en 2000, en 2002 et en 2007)*.
- 144. Privalov, P. L. (1990).** Cold denaturation of protein. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 25(4), 281-306.
- 145. Putri, A. Z., & Nakagawa, T. (2020).** Microbial α -Amylases in the Industrial Extremozymes. *Reviews in Agricultural Science*, 8, 158-169.

- 146. Rana, N., Walia, A., & Gaur, A. (2013).** α -Amylases from microbial sources and its potential applications in various industries. *National Academy Science Letters*, 36(1), 9-17.
- 147. Rapoport, S., Leva, E., & Guest, G. M. (1941).** Phytase in plasma and erythrocytes of various species of vertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, 139(2), 621-632.
- 148. Raveendran, S., Parameswaran, B., Beevi Ummalya, S., Abraham, A., Kuruvilla Mathew, A., Madhavan, A., ... & Pandey, A. (2018).** Applications of microbial enzymes in food industry. *Food technology and biotechnology*, 56(1), 16-30.
- 149. Reddy, C. S., Kim, S. C., & Kaul, T. (2017).** Genetically modified phytase crops role in sustainable plant and animal nutrition and ecological development: a review. *3 Biotech*, 7(3), 1-13.
- 150. Reddy, N. S., Nimmagadda, A., & Rao, K. S. (2003).** An overview of the microbial α -amylase family. *African journal of biotechnology*, 2(12), 645-648.
- 151. Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., & Gautieri, A. (2018).** Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL bioengineering*, 2(1), 011501.
- 152. Ritchie, M. E. (2018).** Reaction and diffusion thermodynamics explain optimal temperatures of biochemical reactions. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.
- 153. Robinson, P. K. (2015).** Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1.
- 154. Sahoo, J. P., Mohapatra, U., Sahoo, S., & Samal, K. C. (2020).** Insights into the miracle plant *Moringa oleifera*.
- 155. Saini, H., Saini, R., Dahiya, A., & Mehta, S. (2016).** Extraction, partial purification and characterization of amylase from apple (*Malus Pumila*). *International Journal of Food and Nutritional Science*, 5(3).
- 156. Sánchez-Muñoz, M. A., Valdez-Solana, M. A., Avitia-Domínguez, C., Ramírez-Baca, P., Candelas-Cadillo, M. G., Aguilera-Ortíz, M., ... & Sierra-Campos, E. (2017).** Utility of milk coagulant enzyme of *Moringa oleifera* seed in cheese production from soy and skim milks. *Foods*, 6(8), 62.
- 157. Sandberg, A. S., & Svanberg, U. (1991).** Phytate hydrolysis by phytase in cereals; effects on in vitro estimation of iron availability. *Journal of Food Science*, 56(5), 1330-1333.

158. Sanzey, M., Abdul Rahim, S. A., Oudin, A., Dirkse, A., Kaoma, T., Vallar, L., ... & Niclou, S. P. (2015). Comprehensive analysis of glycolytic enzymes as therapeutic targets in the treatment of glioblastoma. *PloS one*, 10(5), e0123544.
159. Satish, A., Sairam, S., Ahmed, F., & Urooj, A. (2012). Moringa oleifera Lam.: Protease activity against blood coagulation cascade. *Pharmacognosy research*, 4(1), 44.
160. Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. (2013). Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 1(6).
161. Saxena, R., & Singh, R. (2011). Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using Bacillus sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1334-1342.
162. Schneider, J., Rupp, O., Trost, E., Jaenicke, S., Passoth, V., Goesmann, A., ... & Brinkrolf, K. (2012). Genome sequence of Wickerhamomyces anomalus DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. *FEMS yeast research*, 12(3), 382-386.
163. Selle, P. H., Ravindran, V., Caldwell, A., & Bryden, W. L. (2000). Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutrition Research Reviews*, 13(2), 255-278.
164. Shimizu, K. (2013). Metabolic regulation of a bacterial cell system with emphasis on Escherichia coli metabolism. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
165. Simair, A. A., Qureshi, A. S., Khushk, I., Ali, C. H., Lashari, S., Bhutto, M. A., ... & Lu, C. (2017). Production and partial characterization of α -amylase enzyme from Bacillus sp. BCC 01-50 and potential applications. *BioMed research international*, 2017.
166. Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 1-15.
167. Sorokina, M., Stam, M., Médigue, C., Lespinet, O., & Vallenet, D. (2014). Profiling the orphan enzymes. *Biology direct*, 9(1), 1-16.
168. Souza, P. M. D., & Magalhães, P. D. O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*, 41, 850-861.
169. Souza, P. M. D., & Magalhães, P. D. O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*, 41, 850-861.
170. Steinmetz, P. R. (2019). A non-bilaterian perspective on the development and evolution of animal digestive systems. *Cell and tissue research*, 377(3), 321-339.

171. Stohs, S. J., & Hartman, M. J. (2015). Review of the safety and efficacy of *Moringa oleifera*. *Phytotherapy Research*, 29(6), 796-804.
172. Stumpp, M., Hu, M. Y., Tseng, Y. C., Guh, Y. J., Chen, Y. C., Yu, J. K., ... & Hwang, P. P. (2015). Evolution of extreme stomach pH in bilateria inferred from gastric alkalization mechanisms in basal deuterostomes. *Scientific Reports*, 5(1), 1-9.
173. Syu, M. J., & Chen, Y. H. (1997). A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chemical Engineering Journal*, 65(3), 237-247.
174. Tao, Z., Dong, B., Teng, Z., & Zhao, Y. (2020). The classification of enzymes by deep learning. *IEEE Access*, 8, 89802-89811.
175. Tipton, K., & McDonald, A. (2018). A brief guide to enzyme nomenclature and classification.
176. Toppo, R., Roy, B. K., Gora, R. H., Baxla, S. L., & Kumar, P. (2015). Hepatoprotective activity of *Moringa oleifera* against cadmium toxicity in rats. *Veterinary world*, 8(4), 537.
177. Tusé, D., Tu, T., & McDonald, K. A. (2014). Manufacturing economics of plant-made biologics: case studies in therapeutic and industrial enzymes. *BioMed research international*, 2014.
178. Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Arumugam, M., & Balasubramanian, T. (2013). Purification and characterization of protease from *Bacillus cereus* SU12 isolated from oyster *Saccostrea cucullata*. *African Journal of Biotechnology*, 12(40).
179. Underkofler, L. A., Barton, R. R., & Rennert, S. S. (1958). Production of microbial enzymes and their applications. *Applied microbiology*, 6(3), 212.
180. Van Wyk, N., Drancourt, M., Henrissat, B., & Kremer, L. (2017). Current perspectives on the families of glycoside hydrolases of *Mycobacterium tuberculosis*: their importance and prospects for assigning function to unknowns. *Glycobiology*, 27(2), 112-122.
181. Venkataramani, S., Truntzer, J., & Coleman, D. R. (2013). Thermal stability of high concentration lysozyme across varying pH: A Fourier Transform Infrared study. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 5(2), 148.
182. Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M. M., & Fernandez, M. L. (2017). Bioactive components in *Moringa oleifera* leaves protect against chronic disease. *Antioxidants*, 6(4), 91.

- 183. Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001).** Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(1), 1-43.
- 184. Vingiani, G. M., De Luca, P., Ianora, A., Dobson, A. D., & Lauritano, C. (2019).** Microalgal enzymes with biotechnological applications. *Marine drugs*, 17(8), 459.
- 185. Voelker, D. R. (1991).** Organelle biogenesis and intracellular lipid transport in eukaryotes. *Microbiological reviews*, 55(4), 543-560.
- 186. Wodzinski, Rudy J. et AHJ Ullah. "Phytase." *Avancées en microbiologie appliquée* 42 (1996): 263-302.**
- 187. Wolfe, A. J. (2015).** Glycolysis for microbiome generation. *Microbiology spectrum*, 3(3), 3-3.
- 188. Wulandari, R., Sari, E. N., Ratriyanto, A., Weldekiros, H., & Greiner, R. (2015).** Phytase-producing bacteria from extreme regions in Indonesia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, 711-717.
- 189. Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., ... & Van Loon, A. P. (1999).** Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 367-373.
- 190. Yadav, J. K., & Prakash, V. (2009).** Thermal stability of α -amylase in aqueous cosolvent systems. *Journal of Biosciences*, 34(3), 377-387.
- 191. Yao, M. Z., Zhang, Y. H., Lu, W. L., Hu, M. Q., Wang, W., & Liang, A. H. (2012).** Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 1-14.
- 192. Zarevúcka, M., & Wimmer, Z. (2008).** Plant products for pharmacology: application of enzymes in their transformations. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(12), 2447-2473.
- 193. Zimmerman, A. E., Martiny, A. C., & Allison, S. D. (2013).** Microdiversity of extracellular enzyme genes among sequenced prokaryotic genomes. *The ISME journal*, 7(6), 1187-1199.

Résumé

La survie des organismes vivants dépend d'une série de réactions biochimiques qui fait intervenir des enzymes. Les enzymes ont le rôle de catalyseurs biologiques, ce qui signifie qu'elles accélèrent les réactions biochimiques à l'intérieur comme à l'extérieur de la cellule. L'une des classes les plus importantes de ces enzymes sont les hydrolases. Ces enzymes peuvent également être extraites à partir des cellules et ensuite utilisées pour catalyser un large éventail de processus commercialement importants. Le présent travail porte sur la recherche et la caractérisation de l'activité enzymatique de 2 enzymes, les phytases et les amylases, à partir des graines de *Moringa oleifera*.

Moringa oleifera est une plante très connue pour ses propriétés médicinales et industrielles. Les phytases et les amylases sont des enzymes de la classe des hydrolases et qui possèdent de larges applications industrielles. L'effet de la température et du pH a été étudié sur l'activité et la stabilité de ces deux enzymes. Les résultats de notre étude ont montré que l'extrait brut enzymatique des graines de *Moringa oleifera* possèdent les activités phytasiques et amylasique avec respectivement, des pHs optimaux de 7 et 5, et des températures optimales de 37°C et 45°C. Les amylases sont plus stables, aux traitements thermique et acido-basique que les phytases des graines de *Moringa oleifera*.

Mots-clés : *Moringa oleifera*, enzymes, phytases, amylases, l'extrait brut enzymatique, activité enzymatique.

Abstract

The survival of living organisms depends on a series of biochemical reactions that involve enzymes. Enzymes act as biological catalysts, which means that they accelerate biochemical reactions inside and outside the cell. One of the most important classes of these enzymes are the hydrolases. These enzymes can also be extracted from cells and then used to catalyze a wide range of commercially important processes. The present work focuses on the investigation and characterization of the enzymatic activity of 2 enzymes, phytases and amylases, from *Moringa oleifera* seeds.

Moringa oleifera is a plant well known for its medicinal and industrial properties. Phytases and amylases are enzymes of the hydrolase class and have wide industrial applications. The effect of temperature and pH was studied on the activity and stability of these two enzymes. The results of our study showed that the enzymatic crude extract of *Moringa oleifera* seeds possess phytase and amylase activities with optimal pHs of 7 and 5, and optimal temperatures of 37°C and 45°C, respectively. Amylases are more stable to thermal and acid-base treatments than phytases of *Moringa oleifera* seeds.

Keywords : *Moringa oleifera*, enzymes, phytases, amylases, enzymatic crude extract, enzymatic activity.

ملخص

يعتمد بقاء الكائنات الحية على سلسلة من التفاعلات الكيميائية الحيوية التي تتضمن الإنزيمات. تعمل الإنزيمات كمحفزات بيولوجية، مما يعني أنها تسرع التفاعلات الكيميائية الحيوية داخل وخارج الخلية. يعد الهيدرولاز أحد أهم فئات هذه الإنزيمات. يمكن أيضاً استخراج هذه الإنزيمات من الخلايا ثم استخدامها لتحفيز مجموعة واسعة من العمليات التجارية المهمة. يركز هذا العمل على دراسة وتوصيف النشاط الأنزيمي لاثنتين من الإنزيمات، الفايغاز والأميليز، من بذور *Moringa oleifera*.

Moringa oleifera نبات معروف جيداً بخصائصه الطبية والصناعية. الفايغاز والأميليز هي إنزيمات من فئة الهيدرولاز ولها تطبيقات صناعية واسعة. تمت دراسة تأثير درجة الحرارة ودرجة الحموضة على نشاط واستقرار هذين الإنزيمين. أظهرت نتائج دراستنا أن المستخلص الأنزيمي الخام لبذور *Moringa oleifera* يمتلك أنشطة فيتيز وأميلاز مع درجة حموضة مثلى 7 و 5 ودرجات حرارة مثالية 37 درجة مئوية و 45 درجة مئوية على التوالي. يعتبر الأميليز أكثر ثباتاً في العلاجات الحرارية والقاعدة الحمضية من الفايغاز من بذور *Moringa oleifera*.

الكلمات المفتاحية: *Moringa oleifera*، إنزيمات، فيتاز، أميليز، خلاصة إنزيمية خام، نشاط إنزيمي.