

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 : *Microbiologie Appliquée*

Domaine : *Sciences de la Nature et de la Vie*

Recherche Filière : *Sciences Biologiques*

Spécialité : *Microbiologie Appliquée*

Thème

Recherche et caractérisation d'activités enzymatiques à intérêt industriel chez des bactéries isolées à partir du sol

Présenté Par :

- 1) Melle TEGUIEG Nor El Houda
- 2) Melle ZENASNI Afaf
- 3) Melle AISSAOUI Sabrina

Devant le jury composé de :

Dr. BENELHADJ Djelloul Saadia	M C A	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Président
Dr. OUADAH Yamina	M C B	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Examineur
Dr. BENYAMINA Sofiane Mourad	M C B	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant

Année Universitaire 2023/2024

Remerciement

Nous sommes extrêmement reconnaissantes envers ALLAH pour toutes les bénédictions et le succès qu'il nous a accordés tout au long de notre parcours.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers notre encadrant, M. Benyamina, pour son soutien inestimable et ses conseils précieux tout au long de ce projet. Son expertise et son dévouement ont été essentiels à notre réussite. Nous le remercions sincèrement d'avoir partagé son savoir et d'avoir été une source constante d'inspiration pour nous.

Nous adressons également nos chaleureux remerciements aux membres du jury, Mme Benlhadj Saadia et Mme Ouadah Yamina, qui ont consacré de leur temps précieux à l'examen approfondi et dévoué de notre travail. En tant que professeurs éminents, nous leur exprimons notre profonde gratitude pour le partage généreux de leurs connaissances et de leur expertise, qui ont eu un impact majeur sur notre orientation et l'enrichissement de notre parcours scientifique.

Nous sommes infiniment reconnaissantes envers vous tous pour votre soutien et votre contribution à notre réussite.

TEGUIEG Nor El Houda

ZENASNI Afaf

AISSAOUI Sabrina

Dédicace

Je remercie infiniment Allah pour sa grâce et sa guidance tout au long de ces années d'études

« Chers Mama Zidane Houaria et Papa TEGUIEG Abde El Kader »

Vous êtes mes sources inépuisables d'amour et de soutien. Votre dévouement et votre présence constante ont grandement contribué à façonner la personne que je suis aujourd'hui. Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour tous les sacrifices que vous avez faits pour moi.

« Ma jumelle TEGUIEG Yasmine, mon frère TEGUIEG Hossam »

Vous êtes bien plus que de simples frères et sœurs, vous êtes mes compagnons de vie. Je suis honoré d'avoir grandi à vos côtés et de pouvoir compter sur vous en toutes circonstances.

« À mes professeurs, M. BANYAMINA, Monsieur BENNABI, M. ZIAN, Mme BELHADJ, Mme ACHAACHI, M. KARAJ Ibrahim »

Je tiens à vous exprimer ma gratitude pour votre rôle qui va au-delà de celui des enseignants. Vous êtes mes guides, ceux qui m'ont accompagné sur le chemin de la connaissance et de la découverte. Vos précieux enseignements et votre passion pour l'apprentissage ont alimenté ma curiosité et élargi mes horizons de manière significative. Je vous suis très reconnaissant pour l'impact positif que vous avez eu sur ma vie.

« Fatima Lahmar »

Tu es bien plus qu'une simple amie. Tu as toujours été fidèle et une source d'énergie positive. Ta présence illumine ma vie et ta gentillesse me remplit de bonheur. Je te remercie pour ton amitié sincère et ton soutien constant à mon égard. Je te souhaite du succès et du bonheur, et j'espère que notre amitié perdurera tout au long de nos vies.

« À mes copines Afaf, Sabine et Safia »

Vous êtes mes chères amies, mes proches et mes partenaires dans les vicissitudes de la vie. Je suis reconnaissant de vous avoir à mes côtés.

« À mon oncle maternel ZIDANE Said, ma tante maternelle ZIDANE Hanane, mon oncle TEGUIEG Hbib et ma tante TEGUIEG Nadia »

Merci d'être là pour moi et de faire partie de ma famille.

« À mes cousines Ikram et Souzane, et à mon cousin Samir »

Vous êtes ma famille et mes précieux amis. Merci à tous pour votre soutien inconditionnel et votre amour. Cette dédicace est pour vous.

« Mes chats »

Vous avez apporté tant de joie et de bonheur dans ma vie d'une manière indescriptible. Vous êtes des amis fidèles et merveilleux compagnons. Je vous remercie pour chaque moment passé à mes côtés, et je souhaite que vous restiez toujours près de moi. Je vous aime de tout mon cœur.

TEGUIEG Nor El Houda

Dédicace

*Avant tout, je remercie Dieu Tout-Puissant pour cette réussite et pour toutes les
bénédictions dans ma vie.*

*Je dédie cette réussite à mes parents, « Abdul Alkader » et « Yamina », qui ont été des piliers
de soutien, de force et de confiance. Il m'est difficile de trouver les mots pour exprimer toute
ma gratitude envers eux,*

*Je tiens également à remercier ma sœur « Fatima » et mon frère « Muhammad Al-Bachir »
pour leur amour et leur soutien constant .*

*Un remerciement particulier à ma grand-mère « Chrifa » pour ses prières incessantes, à mes
oncles « Morad » et « Bachir » pour leur soutien, à l'épouse de mon oncle « Ismahen » , pour
son appui indéfectible tout au long de mon parcours universitaire .*

*Je suis profondément reconnaissant envers tous mes professeurs qui m'ont guidé et aidé tout
au long de mon parcours académique, en particulier « M. BËNYAMINA » pour son encadrement
précieux,*

*Enfin, je félicite mes collègues « AISSAOUI Sabrine » ET « TEGUIEG Nor El Houda » pour avoir
partagé ce succès avec moi, et je les remercie pour leur amitié et leur soutien.*

ZENASNI AFAF

Dédicace

En ce moment, je trouve difficile de mettre en mots la joie et la satisfaction qui emplissent mon cœur. Tout d'abord, je tiens à remercier Dieu pour Son aide et le succès qu'Il m'a accordé.

Je suis parfaitement consciente de l'origine de mon parcours, auprès de mes plus grands soutiens : mes parents, Ahmed et Yamina. Je peine encore à trouver les mots pour exprimer tout l'amour et la gratitude que je ressens pour vous. Je me considère extrêmement chanceuse d'avoir des parents comme vous. Cette première étape vers mon succès, c'est à vous que je la dédie.

Mon parcours éducatif n'aurait jamais débuté sans mon estimé professeur Lakhdar, qui m'a appris mes premières lettres, et il n'aurait pas pu se conclure sans l'accompagnement dévoué de mon superviseur, Monsieur Benyamina Sofiane, son rôle en tant qu'encadrant ne s'est pas limité à l'enseignement, il a également comportait un volet motivationnel très bénéfique pour ce projet, je souhaite vous exprimer toute ma reconnaissance pour vos conseils avisés, votre patience, votre temps consacré, et toutes les efforts déployés pour viser l'excellence. À tous les enseignants que j'ai rencontrés au long de cette aventure académique, je vous exprime ma gratitude et partage avec vous mon succès.

À mes plus chères ; mon âme sœur Nadia, ma tante Malika, ma confidente Nor, Afaf et à tous ceux qui me connaissent et m'apprécient, ma famille, mes amis, je vous offre le résultat de nombreuses années d'efforts et de dévouement.

AISSAOUI Sabrina

Sommaire

- **Remerciement.**
- **Dédicaces.**
- **Liste des figures.**
- **Liste des tableaux.**
- **Liste des abréviations.**

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Synthèse bibliographique.

1. Généralités sur les enzymes.....	3
2. Mécanisme d`action des enzymes.....	3
3. La nomenclature et classification des enzymes.....	4
4. Importance des enzymes	7
4.1. Importance des enzymes au niveau cellulaire	7
4.2. Importance des enzymes au niveau industriel.....	7
2. Les amylases.....	10
2.1. Importance des amylases au niveau cellulaire et industriel	14
2.1.1. Importance des amylases au niveau cellulaire.....	14
2.1.2.. Importance des amylases au niveau industriel.....	15
2.2. Sources et origines des amylases	16
2.2.1. Les amylases d`origine végétale et les amylases d`origine animale	16
2.2.2. Les amylases d`origine microbienne	17
2.3. production des amylases bactériennes à l`échelle industrielle et importance des bactéries du sol dans cette production	18

Matériels et méthodes

1. Isolement et purification des isolats bactériens à partir des différents sols.....	22
2. Vérification de la pureté des isolats bactériens.....	24
2.1. Observation macroscopique.....	24
2.2. Observation microscopique.....	24
3. Préparation des cultures et récupération des surnageants des isolats bactériens.....	24
3.1. Préparation des cultures bactériennes	24
3.2. Récupération des surnageants des isolats bactériens.....	24
4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976).....	25
5. Recherche et caractérisation de l'activité amylasique des isolats bactériens	25
5.1. Influence du temps d'incubation sur l'activité amylasique des surnageants des isolats bactériens.....	27
5.2 Caractérisation physico-chimique des amylases des surnageants des isolats bactériens....	27
5.2.1 Influence de pH sur l'activité amylasique des isolats bactériens.....	27
5.2.2. Influence de la température sur l'activité amylasique des surnageants des isolats bactériens.....	28
6. Test de thermostabilité des amylases des surnageants des isolats bactériens.....	28

Résultats et discussions

1. Isolement et purification des isolats bactériens à partir des différents sols.....	30
2. Vérification de la pureté des isolats bactériens	30
2.1 Observation macroscopique	30
2.2 Observation microscopique	30
3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976).....	33
4. Recherche et caractérisation de l'activité amylasique des isolats bactériens.....	34

5. Caractérisation physico-chimique des amylases des surnageants des isolats bactériens.....	43
5.1. Influence du pH sur l'activité amylasique des surnageants des isolats bactériens.....	44
5.2. Influence de la température sur l'activité amylasique des surnageants des isolats bactériens.....	46
5.3. Test de thermostabilité des amylases des surnageants des isolats bactériens.....	50
• Conclusion et perspectives. .	
• Références bibliographiques.	
• Annexes.	
• Résumé.	

Liste des figures

- ❖ **Figure 1** : Mécanisme d'action des enzymes et interaction enzyme-substrat.....4
- ❖ **Figure 2** : parts du marché occupés par les enzymes dans différents secteurs.....9
- ❖ **Figure 3** : Distribution des enzymes hydrolytiques dans le marché mondial total des enzymes.....10
- ❖ **Figure 4** : Mécanisme d'action des enzymes amylolytiques.11
- ❖ **Figure 5** : prélèvement du sol pour l'isolement des bactéries.....22
- ❖ **Figure 6** : préparation des dilutions décimales à partir de la solution mère.23
- ❖ **Figure 7** : courbe étalon de la protéine de référence BSA.....33
- ❖ **Figure 8** : courbe étalon de l'amidon.....34
- ❖ **Figure 9** : courbes représentatives de la diminution, en fonction du temps, de la quantité de l'amidon en présence des différents surnageants.....35
- ❖ **Figure 10 A** : courbe représentative de la cinétique de dégradation de l'amidon par les surnageants des isolats SV1 et SV2.....36
- ❖ **Figure 10 B** : vitesses initiales des amylases présentes dans les surnageants des isolats SV1 et SV2.....37
- ❖ **Figure 11A** : courbes représentatives de la cinétique de la dégradation de l'amidon par surnageant des isolats SRZ 1 et SRZ 2.....38
- ❖ **Figure 11B** : vitesses initiales des amylases présentes dans les surnageants des isolats SRZ 1 et SRZ 2.....38
- ❖ **Figure 12 A** : courbes représentatives de la cinétique de la dégradation de l'amidon par surnageant des isolats SRZ 1m 1 et SRZ 1m 2.....39
- ❖ **Figure 12 B** : vitesses initiales des amylases présents dans les surnageants des isolats SRZ 1m 1 et SRZ 1m 2.....39
- ❖ **Figure 13 A** : courbes représentatives de la cinétique de la dégradation de l'amidon par surnageant des isolats SS 1 et SS 2.....41

❖ Figure 13 B : vitesses initiales des amylases présentes dans les surnageants des isolats SS 1 et SS 2.....	41
❖ Figure 14 : résultats de l'effet du pH sur l'activité amylasique des surnageants des différents isolats.	44
❖ Figure 15 : résultats de l'effet de la température sur l'activité amylasique des surnageants des différents isolats.....	47
❖ Figure 16 : résultats de test de thermostabilité obtenus après 1h et 2h de traitement thermique.....	50

Liste des tableaux

- ❖ **Tableau 1** : les classes des enzymes et les réactions qu'elles catalysent.....5
- ❖ **Tableau 2** : tableau représentatif des types d'amylases et leurs mode d'action.....12
- ❖ **Tableau 3** : les différentes concentrations, de la protéine de référence BSA, utilisées pour la préparation de la courbe d'étalon $DO_{595nm} = f([BSA])$25
- ❖ **Tableau 4** : les différentes concentrations d'amidon utilisées pour la préparation de courbe d'étalon $DO_{620nm} = f([amidon])$27
- ❖ **Tableau5** : tableau récapitulatif de l'observation macroscopique et microscopique des huit isolats bactériens.....31
- ❖ **Tableau 6** : résultats de dosage des protéines au niveau des surnageants des isolats bactériens.....33
- ❖ **Tableau7** : tableau récapitulatif des résultats de la recherche et de la caractérisation des amylases chez les 8 isolats bactériens.....53

Liste des abréviations

- **ADP** : Adénosine diphosphate.
- **ATP** : Adénosine triphosphate.
- **BN** : Bouillon Nutritif.
- **BSA** : Bovine Serum Albumin.
- **CaCl₂** : Chlorure de calcium.
- **CO₂** : dioxyde de carbone.
- **DO** : Densité Optique.
- **EC** : Commission d'enzymes .
- **g** : gramme.
- **GN** : Gélose Nutritive .
- **h** : Heure
- **HCL**: chlorure d'hydrogène.
- **H₂O** : (molécule d'eau).
- **H₂CO₃** : L'acide carbonique.
- **IUBMB**: International Union of Biochemistry and Molecular Biology.
- **L** : litre .
- **M** : Molaire.
- **mg** : Milligramme.
- **min** : Minute.
- **mL** : Millilitre.
- **NaCl** : Chlorure de sodium.
- **nm** : Nanomètre.
- **SV1 et SV2** : les souches isolés à partir du sol vierge.
- **SRZ 1 et SRZ 2** : les souches isolées à partir du sol rhizosphérique.
- **SRZ 1m1 et SRZ 1m2** : les souches isolées à partir du sol à 1m de distance de la végétation.
- **SS1 et SS2** : les souches isolées à partir d'une zone rhizosphérique d'un sol salin.
- **µg** : Microgramme.
- **%** : Pourcentage.
- **°C** : Degré Celsius.

*"Sans enzymes, la vie telle que nous la connaissons ne serait
Pas possible. Elles sont les clés de la chimie de la vie."*

Max Perutz

Introduction générale

Introduction générale

La survie de différents organismes vivants , des bactéries aux humains , est soigneusement coordonnée par des réactions biochimiques rendues possibles grâce à l'intervention des biocatalyseurs appelés les enzymes (Simon et Barry, 2005).

Ces molécules de nature protéique, sont capables d'accélérer les différentes réactions biochimiques au sein des cellules vivantes (Gatenby et Frieden, 2016). Elles sont non seulement essentielles pour ces processus cellulaires, mais également très valorisées dans diverses applications industrielles (Li *et al.*, 2012 ; Choi *et al.*, 2015).

Face aux évolutions du secteur industriel, l'optimisation de la production et la réduction des coûts et des impacts environnementaux deviennent prioritaires. Dans ce contexte, les enzymes industrielles, et particulièrement la classe des hydrolases, représentant 75 % des enzymes utilisées en industrie, elles attirent l'attention des chercheurs (Assamoi *et al.*, 2009).

Parmi les hydrolases, on distingue les amylases (EC3.2.1.1), qui catalysent la décomposition initiale de l'amidon en oligosaccharides courts en brisant les liaisons glycosidiques α -D 1,4 (Tallapragada *et al.*, 2018). Ces amylases sont omniprésentes et elles sont produites par tous les organismes vivants : les microorganismes, les animaux et les végétaux (Tallapragada *et al.*, 2018).

De nos jours, les amylases commercialisées sont principalement extraites de sources microbiennes, représentent la source alternative d'enzymes industrielles (Meunier, 1999) et celles issues des champignons et des bactéries sont les plus couramment utilisées dans les applications industrielles (Garske *et al.*, 2017 ; Sindhu *et al.*, 2017 et Debnath *et al.*, 2019).

Pour cela, l'objectif de notre travail est d'isoler des bactéries à partir de différents sols, (sol vierge, sol rhizosphérique, sol rhizosphérique à 1m de la végétation et un sol salin) afin de rechercher et de caractériser les activités amyliques à intérêt industriel, chez ces différents isolats.

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les enzymes

Chez les différents organismes vivants, y compris l'être humain, il existe des réactions biochimiques très importantes pour leur survie et pour leur développement. Ces réactions biochimiques sont considérées comme des éléments fondamentaux de tous les processus biologiques et elles peuvent être catalysées par des molécules spécifiques appelées les enzymes (Gatenby et Frieden, 2016).

Les enzymes sont des macromolécules protéiques trouvées dans les différents organismes vivants (plantes, animaux et microorganismes) (Gurung *et al.*, 2013). Ces enzymes sont connues pour leur spécificité dans la catalyse des réactions biochimiques (Rouzé, 1969) et leur présence permet l'augmentation d'au moins 10^6 fois les vitesses de ces réactions biochimiques (Granner *et al.*, 2008). Ces molécules jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques (ceci sera développé dans la partie importance des enzymes en industrie), telles que la biosynthèse des molécules et des métabolites (Wohlgemuth et Littlechild, 2022), la régulation de l'expression des gènes et des voies métaboliques (Hall *et al.*, 2004). De plus, elles participent dans la dégradation de molécules complexes, en molécules plus facilement assimilables par les organismes (Meunier, 1999), tout en restant intactes à la fin de la réaction (Perez, 1990).

En plus de leur importance au niveau cellulaire, elles revêtent une grande importance dans le monde industriel. Les enzymes sont mondialement reconnues pour leurs larges utilisations dans divers domaines industriels tels que l'agriculture, la médecine (ceci sera développé dans la partie importance des enzymes en industrie), l'alimentation et les produits pharmaceutiques (Li *et al.*, 2012 ; Choi *et al.*, 2015).

2. Mécanisme d'action des enzymes

De nombreuses études ont été menées depuis plus d'un siècle pour comprendre le fonctionnement d'une enzyme, sa structure et comment elle accélère les réactions (Richard, 2013). Les enzymes se caractérisent par la présence d'un site actif par lequel le substrat est transformé en un produit spécifique, après formation d'un complexe Enzyme-Substrat (**Figure 1**) (Kingsley et Lill, 2015 ; Cooper, 2000) selon la réaction suivante



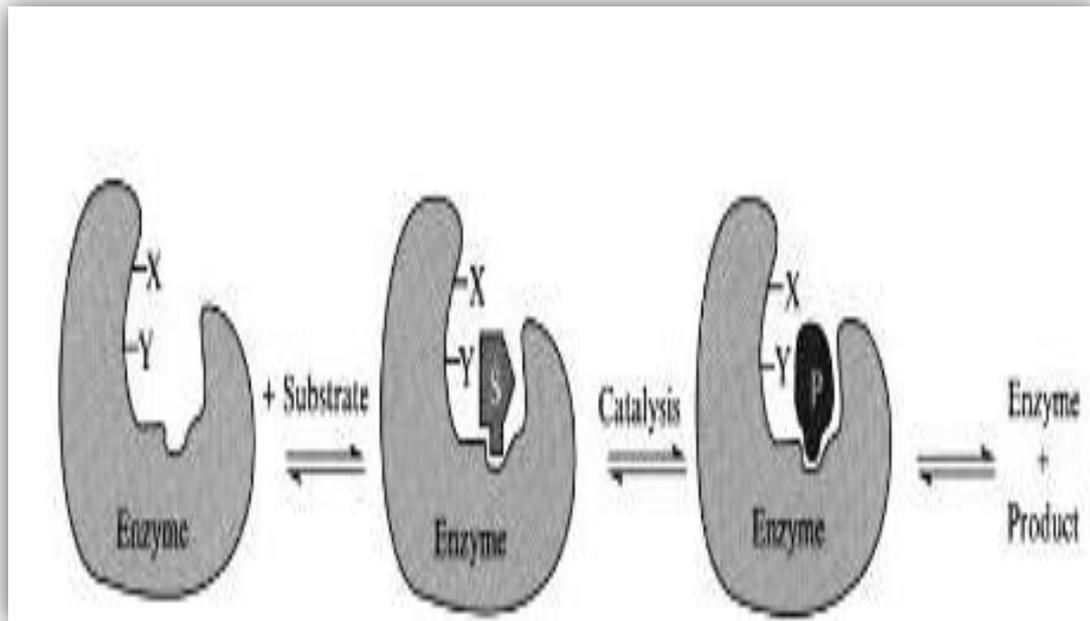


Figure 1 : Mécanisme d'action des enzymes et interaction enzyme-substrat (Bugg, 2012).

3. Nomenclature et classification des enzymes

La Commission des Enzymes ou Enzyme Commission (EC) de l'IUBMB (The International Union of Biochemistry and Molecular Biology) a résolu le problème complexe de la nomenclature des enzymes en décrivant les enzymes avec un numéro qui se compose de quatre parties (Robinson, 2015).

Chaque enzyme est identifiée par un numéro à quatre chiffres, précédé de "EC" pour "Enzyme Commission", qui indique à la fois la classification de l'enzyme et le type de réaction qu'elle catalyse (McDonald et Tipton, 2014).

Le premier chiffre correspond à la classe de l'enzyme (**voir Tableau 1**), le deuxième chiffre représente la sous-classe, le troisième chiffre correspond à la sous-sous-classe et le quatrième chiffre est un numéro de série utilisée pour identifier chaque enzyme d'une façon individuelle (McDonald et Tipton, 2014).

Le suffixe "ase" est généralement utilisé pour désigner les noms des enzymes.

Cependant, il existe des exceptions qui se terminent par "ine", comme la chymotrypsine (Subin et Bhat, 2016).

Il existe 7 classes différentes des enzymes (McDonald et Tipton, 2023) comme mentionné dans le tableau suivant

Tableau 1 : les classes des enzymes, et les réactions qu'elles catalysent.

EC	Classe de l'enzyme	Type de réaction catalysée	Exemples
EC1	Oxydo-réductases.	La réaction permet le transfert des électrons et des protons entre substrat (Morel <i>et al.</i> , 2015).	D-Lactate Déshydrogénase (Iwatsubo Et Motohiro, 1963).
EC2	Transférases.	La réaction permet le transfert d'atomes ou de groupements fonctionnels entre substrat (Robinson, 2015).	ADN polymérase (Aravind et Eugene, 1999).
EC3	Hydrolases.	La réaction catalyse l'hydrolyse des liaisons (Bornscheuer, 2002).	α -amylases (Janeček et Štefan, 2005)

Synthèse bibliographique

EC4	Lyases.	Ces enzymes agissent pour rompre les liaisons, mais pas par hydrolyse ou oxydation (Subin et Bhat, 2016).	Pyruvate carboxylase (Utter et Michael, 1969).
EC5	Isomérasés.	Catalyse la conversion des molécules d'une forme isomérique à une autre (Trincone, 2002).	Isomérase Phosphoglucose (Bhosale <i>et al.</i> , 1996).
EC6	Ligases.	La réaction permet de former des liaisons entre les molécules et de les lier (Robinson 2015).	Ligase D'ubiquitine E3 (Zeng <i>et al.</i> , 2008).
EC7	Translocases.	La réaction permet aux molécules et aux ions de se déplacer à travers la membrane et de les séparer au sein de la membrane (McDonald et Tioton, 2023).	ATP synthase (Penna <i>et al.</i> , 2013).

4. Importance des enzymes

4.1. Importance des enzymes au niveau cellulaire

La cellule, correspond à l'unité initiale de la formation de tous les organismes vivants (Misslin, 2003). Malgré leur taille microscopique, les cellules sont capables d'effectuer de nombreuses réactions chimiques, dont la plupart d'entre elles nécessitent des molécules enzymatiques qui accélèrent et facilitent leurs déroulements (Karp, 2010).

Chez les différents organismes vivants, les enzymes participent dans plusieurs processus importants, par exemple : la réparation de l'ADN au sein de la cellule (l'ADN polymérase) (Bebenek et Kunkel, 2004), la régénération de l'énergie (ATP) pour la cellule pour accomplir ses diverses fonctions cellulaires (ATP synthase) (Usey et Huet, 2023).

Les enzymes jouent également un rôle crucial en facilitant et en accélérant les réactions chimiques lors des processus métaboliques au niveau de la cellule (Prescott *et al.*, 2018). Par exemple, une anhydrase carbonique peut catalyser la réaction de conversion de plus d'un demi-million de CO₂ et H₂O en HCO₃, et ceci en une seconde (Robinson, 2015).

Grâce à cette propriété remarquable, les enzymes ont acquis une grande importance dans diverses industries, offrant une grande valeur ajoutée et un large éventail d'applications (Robinson, 2015).

4.2. Importance des enzymes au niveau industriel

Dans le monde industriel moderne, les entreprises ont constamment besoin de moyens pour améliorer leurs processus de production et augmenter la qualité de leurs produits finaux. Une des tendances de plus en plus répandues est l'utilisation d'enzymes (Li *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2015). Les enzymes optimisent le processus de production en réduisant la durée et l'énergie requises, tout en restant abordables et non toxiques (Li *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2015).

Avec l'évolution de la biotechnologie, l'industrie des enzymes a connu une expansion significative, permettant la production de 40 à 50 variétés d'enzymes chaque année en quantités allant de plusieurs kilogrammes à plusieurs tonnes pour divers secteurs industriels (Robinson, 2015), ce qui génère de gros revenus par exemple en 2014 le marché mondial des

Synthèse bibliographique

enzymes industrielles a généré des revenus dépassant les 4.2 milliards de dollars et selon les prédictions, les ventes devaient atteindre 6.2 milliards de dollars en 2020 (Mehta et Sattyanarayana, 2016).

L'utilisation des enzymes est reconnue pour son efficacité économique, sa sécurité, et est considérée comme une technologie écologique ou « verte » (Simon et Barry, 2005). Cette technologie enzymatique a émergé dans les années soixante (Arbige *et al.*, 1989) impliquant une multitude de secteurs industriels.

Dans le secteur agroalimentaire diverses enzymes sont utilisées, comme par exemple les lipases qui sont utilisées dans la production des biscuits et la maturation de certaines viandes séchées comme les salamis et les saucissons (Hasan *et al.*, 2006), les protéases sont utilisées dans le processus d'affinage des fromages (Haussner *et al.*, 1996).

Dans l'industrie des détergents des enzymes comme les protéases, les amylases et les lipases sont utilisées surtout pour la production des lessives « biologiques » (Simon et Barry, 2005), Les cellulases sont aussi utilisées dans cette industrie et spécifiquement pour l'élimination des différentes taches des tissus, tout en maintenant la couleur et la douceur du tissu (Kuhad, 2011).

Dans l'industrie du papier, les cellulases ont un rôle crucial dans le bioblanchiment et le détachage de l'encre (Dienes *et al.*, 2004 ; Nakamura *et al.*, 2001). Dans l'industrie de textile, les amylases et les lactases sont un exemple de l'utilisation des enzymes dans cette industrie, pour leur efficacité dans le blanchiment des tissus et la dégradation des excès de peroxyde. De même, la cellulase est reconnue pour son rôle crucial dans le délavage des couleurs, contribuant ainsi à l'amélioration de la qualité des textiles (Mojsov, 2011).

Dans le domaine cosmétiques, les lipases, comme exemple, sont largement utilisées pour créer des arômes, elles contribuant aussi, dans les soins de la peau (Jaeger et Eggert, 2002 ; Hasan *et al.*, 2006).

Dans l'industrie pharmaceutique et médicale, aussi des enzymes sont utilisées comme exemple les amylases sont employées en tant qu'agents anti-inflammatoires et aides digestives, contribuant à prévenir des dyspepsies et fermentations intestinales (Charnock et Mcclery, 2005) et les cellulases sont incorporées dans des préparations médicamenteuses destinées à faciliter la digestion (Jayasekara et Ratanayake, 2019). Les collagénases aussi sont

appliquées dans le traitement des plaies et des brûlures (Rao *et al.*, 1998) , les lactases sont aussi utilisées pour assister certains patients intolérants au lactose, puisqu'elles permettent de transformer le lactose en glucose (Tanasupawat et Komagata, 2001).

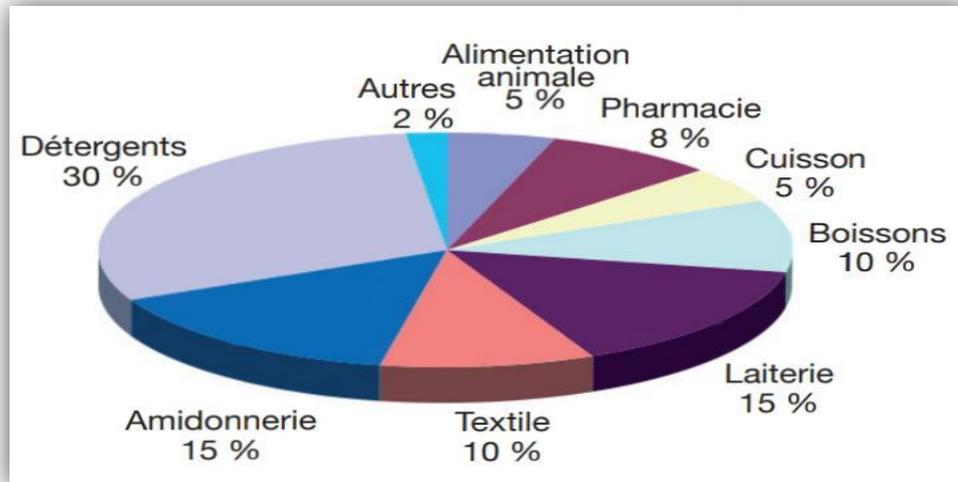


Figure 2 : parts du marché occupés par les enzymes dans différents secteurs (Lareeta-Garde, 1997).

Parmi ces enzymes, 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases (Assamoi *et al.*, 2009), une famille d'enzymes très répandue dans la nature et très diversifiée comprenant des amylases, des lipases et des protéases, qui sont exploitées pour une variété d'applications industrielles (Assamoi *et al.*, 2009).

Leur marché mondial des enzymes a été évalué à 1,5 milliard de dollars en 2000, représentant ainsi environ 60 % des ventes totales d'enzymes avec des prédictions d'augmentation de ces ventes (Gupta *et al.*, 2003; Chellapandi, 2010; Gaur *et al.*, 2010).

Parmi les enzymes hydrolytiques industrielles les plus utilisées, on compte les amylases (**Figure 3**). Ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser un large spectre de substrats, notamment la mylose, l'amylopectine, les cyclodextrines et le glycogène, tout en montrant une spécificité particulièrement élevée pour l'amidon (Antranikian, 1992).

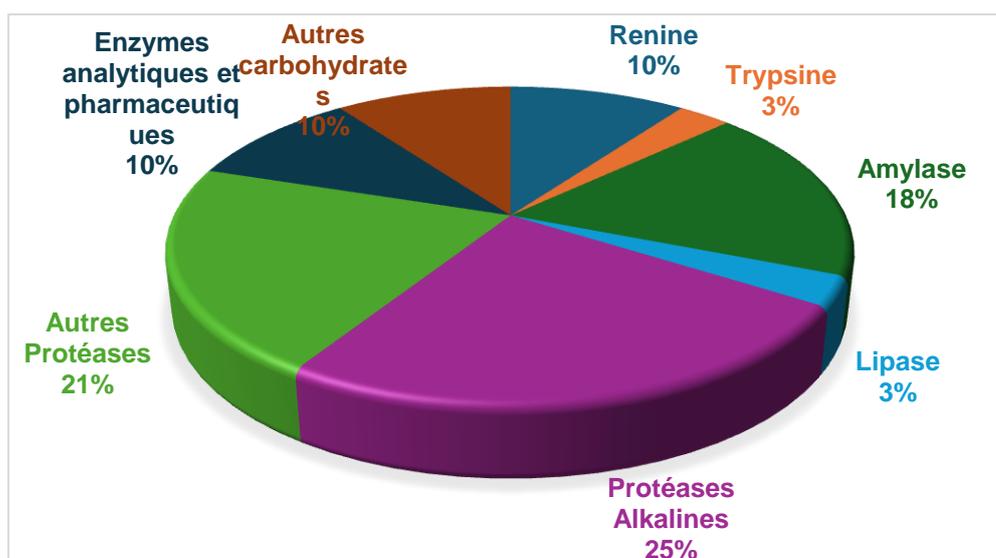
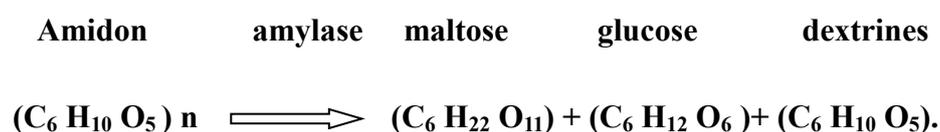


Figure 3 : Distribution des enzymes hydrolytiques dans le marché mondial total des enzymes (Rao *et al.*, 1998).

Au niveau commercial, les amylases viennent en seconde position après les protéases (Assamoi *et al.*, 2009), représentant à elles seules 18 % de ce marché (Rao *et al.*, 1998; Rai et Mukherjee, 2010) (**Figure 3**). Selon Ashraf *et al.*, (2018), le marché des amylases à l'échelle mondiale a vu son expansion annuelle, avec une estimation portée à 320,1 millions de dollars pour l'année 2024. (Dans la partie suivante, les amylases seront développées).

2. Les amylases

Les amylases, sont des enzymes qui ont été identifiées par Kirchoff en 1811 (Emanuel et Lorrence, 2009). Ces amylases, sont responsables de la dégradation de l'amidon et du glycogène comme le montre la réaction suivante



L'amidon est le polysaccharide de réserve le plus répandu dans la nature après la cellulose, (Meier et Reid, 1982), En revanche, il est la principale source d'énergie pour les animaux, et par conséquent pour les êtres humains (Hannah et James, 2008), il est constitué

Synthèse bibliographique

de l'assemblage de deux types de molécules distinctes : l'amylose et l'amylopectine (Sindhu *et al.*, 2017).

Selon leurs modes d'action, les amylases peuvent être classées en deux grandes catégories : les endoamylases et les exoamylases (Masuda *et al.*, 1987).

Les endoamylases agissent en catalysant l'hydrolyse au sein de la molécule d'amidon de manière aléatoire, ce qui entraîne la création d'oligosaccharides, à la fois linéaires et ramifiés, de différentes longueurs (Ahmad *et al.*, 2019).

Les exoamylases quant à elle, agissent sur l'extrémité non réductrice de la molécule, libérant progressivement des produits finaux de longueur réduite (Gupta *et al.*, 2003).

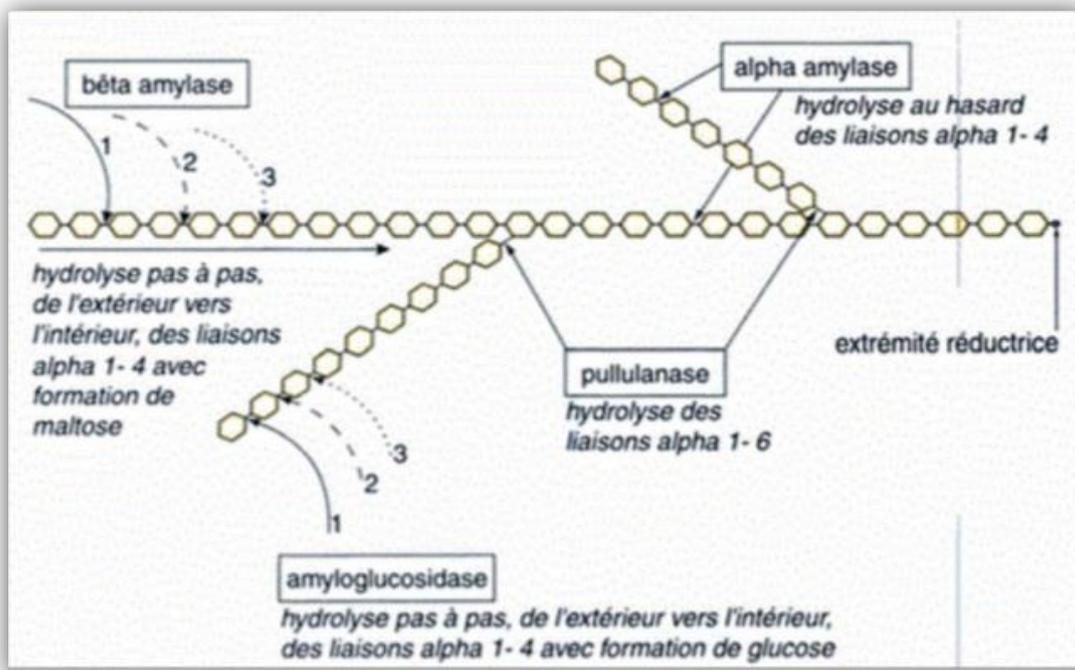


Figure 4 : Mécanisme d'action des enzymes amylolytiques (Pierre, 2000).

Par ailleurs, au-delà des deux catégories mentionnées, on distingue plusieurs sortes d'amylases comme le montre le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : tableau représentatif des types d'amylases et leurs mode d'action.

Type d'amylases	Mode d'action	EC
Les α-amylases	Les α -amylases agissent comme des endoamylases, rompant aléatoirement les liaisons osidiques (1,4) au sein de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène, mais sans affecter les liaisons en extrémité de ces molécules. Cette action résulte en la libération de glucose, de maltose et, en grande partie, de dextrans, selon Kelly <i>et al.</i> ,1997.	(EC 3.2.1.1)
Les β-Amylases	Les β -amylases fonctionnent en tant qu'exoenzymes hydrolysant sélectivement les liaisons α -1,4 de manière alternative à partir de l'extrémité non réductrice. Ces enzymes contournent les liaisons α -1,6 des chaînes ramifiées, engendrant ainsi du maltose et des dextrans β de haut poids moléculaire, comme l'ont décrit Vihinen et Mäntasala en 1989.	(EC3.2.1.2)
Les gluco-amylases connues aussi sous les noms d'amylo-glucosidases ou γ-amylases.	Les gluco-amylases, Ces amylases procèdent à une hydrolyse spécifique des liaisons α -1,4 et α -1,6 des α -glucanes, en partant des extrémités non réductrices. Elles manifestent une préférence pour le traitement des polysaccharides de grande taille, transformant l'amidon en glucose avec une efficacité maximale théorique de 100 %, comme rapporté par Kumar et Satyanarayana en 2004.	(EC3.2.1.3),
Les	Les pullulanases sont des enzymes débranchantes qui	(EC

<p>pullulanases</p>	<p>permettent de scinder les liaisons glycosidiques α-1,6 ainsi que les liaisons α-1,4 dans le pullulane, l'amidon et l'amylopectine, produisant ainsi des sucres réduits tels que le maltose, le panose, le glucose, le maltotriose, etc. On distingue cinq types de pullulanase : la pullulanase type I, l'amylopullulanase, la néopullulanase, l'isopullulanase et la pullulan hydrolase de type III. (Hii <i>et al.</i>, 2012 ; Naik <i>et al.</i>, 2023), chaque type ayant son substrat spécifique et donc un produit de réaction différent (Bertoldo et Antranikian, 2002).</p>	<p>3.2.1.41)</p>
<p>Les amylo maltases (Les transférase)</p>	<p>Les transférases sont un autre groupe d'enzymes de conversion de l'amidon qui clive une liaison glycosidique α-1,4 de la molécule donneuse et transfère une partie du donneur vers un accepteur glycosidique avec formation d'une nouvelle liaison glycosidique (Hii <i>et al.</i>, 2012 a).</p>	<p>(EC .2.4.1.25)</p>

En plus de leurs classification en fonction de leurs mode d'action, les amylases peuvent aussi être classées selon leur slocalisation et leur fonction relative à la cellule, en enzymes intracellulaires et enzymes extracellulaires (Gianfreda, 2015).

Les enzymes intracellulaires, aussi connues sous le nom d'enzymes cytoplasmiques, agissent à l'intérieur de la cellule (Gianfreda, 2015; Nannipirri,2006), à l'inverse, les enzymes extracellulaires sont synthétisées à l'intérieur de la cellule, mais sont excrétées pour y exercer leurs fonction à l'extérieur de la cellule, elles se concentrent sur la décomposition des substances organiques dans l'environnement extracellulaire (Gianfreda, 2015; Luo *et al.*, 2017).

Ceci est également valable pour les amylases, qui peuvent être classées en

amylases intracellulaires qui participent à la décomposition des polysaccharides chez certaines espèces bactériennes (Simpson et Russell, 1998), tandis que les amylases extracellulaires interviennent à l'extérieur des cellules (Elamary et Salem, 2020).

2.1 Importance des amylases au niveau cellulaire et industriel

2.1.1 Importance des amylases au niveau cellulaire

De nombreuses fonctions complexes sont assurées par les cellules, et le bon fonctionnement de ces processus nécessite l'action de plusieurs enzymes, comme par exemple les amylases (Souza et Oliveira, 2010).

Les amylases jouent un rôle vital à travers plusieurs mécanismes biologiques, par exemple, elles sont impliquées dans le métabolisme du glucagon dans les hépatocytes, comme décrit par Pierzynowska *et al.*, en 2020, et elle aide à décomposer le glycogène, un polysaccharide (Simpson et Russell, 1998). Aussi, l' α -amylase pancréatique, joue un rôle crucial dans la gestion de l'absorption des sucres (Asanuma *et al.*, 2012). L'amylase contribue aussi à la digestion des aliments riches en amidon, en les convertissant en glucose, lequel est absorbé par les cellules intestinales (Alpers et Solin, 1970). En addition, l'amylase joue un rôle prépondérant dans la régulation de la glycémie. La β -amylase, par son interaction avec les N-glycanes, limite l'absorption du glucose duodénal, facilitant ainsi une régulation homéostatique du glucose dans le sang (Date *et al.*, 2015).

Dans le développement végétal, l'amylase joue son rôle notamment dans la croissance des angiospermes. l' α -amylase est particulièrement importante tout au long de la croissance et du cycle de vie des plantes. Pour le riz, par exemple, les isozymes de l' α -amylase sont essentielles à la création de granules d'amidon de réserve durant la maturation des graines et à la mobilisation de cet amidon stocké pour soutenir les jeunes pousses pendant la germination. Ces processus influencent directement le développement des plantes et leur productivité (Damaris *et al.*, 2019).

Dans le monde microbien, l'amylase permet la transformation de l'amidon en glucose, une source d'énergie primordiale pour les bactéries (Homaei *et al.*, 2016 ; Planchot *et al.*, 1995), influençant également l'adhésion cellulaire et la formation de biofilms, comme démontré chez *Staphylococcus epidermidis*. Ainsi, l'amylase se révèle être un pivot énergétique et fonctionnel (Mack *et al.*, 1992).

2.1.2 Importance des amylases au niveau industriel

En raison de leurs efficacité et leurs thermostabilité, les amylases sont largement utilisées dans divers secteurs (Behal *et al.*, 2006), tels que le secteur de l'industrie des produits de nettoyage, de l'industrie agroalimentaire, des textiles, du papier, des adhésifs, et l'industrie pharmaceutique (Marc *et al.*, 2002).

L'évolution de la biotechnologie a par ailleurs élargi le champ d'utilisation des amylases à de nouveaux domaines, incluant la chimie clinique, médicale et analytique (Pandey *et al.*, 2000).

De multiples applications supplémentaires pour les amylases ont été explorées, incluant le secteur agroalimentaire dont la bioconversion de l'amidon se réalise particulièrement par les α -amylases, où elles facilitent la conversion de l'amidon en sirops de glucose et de fructose durant le processus de liquéfaction dans les boulangeries (Nielsen et Borchert, 2000). De même, les amylases sont utilisées comme additifs alimentaires ou une faible quantité d'amylase incorporée à la farine génère des sucres simples facilement assimilables par les levures, ceci permet d'obtenir un pain plus léger et mieux aéré (Pandey *et al.*, 2000). En sucrerie, les amylases sont employées pour simplifier les processus d'extraction et de raffinage du saccharose de la betterave ou de la canne à sucre, aussi, les amylases sont utilisées dans la fabrication de sirops sucrés à partir d'amidon de maïs, ainsi que dans la production de sirops de chocolat (Martin *et al.*, 2003).

Quant à l'industrie des boissons, les amylases jouent un rôle clé principalement dans la production d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcooliques et de jus de fruits (Mamo et Gessesse, 1999).

Par ailleurs, dans l'industrie des détergents, les amylases viennent en seconde position dans la formulation de détergents enzymatiques, et elles sont représentées dans 90% de tous les détergents liquides, L'intégration de ces enzymes dans la composition des détergents renforce leur efficacité à éliminer les taches tenaces et à nettoyer le linge, tout en étant respectueuses à l'environnement (Hmidet *et al.*, 2009 ; Mitidieri *et al.*, 2006).

Dans l'industrie du papier, les amylases sont employées pour dissoudre les colles à base d'amidon, facilitant ainsi la conservation des feuilles de papier (Gupta *et al.*, 2003). Dans

l'industrie de textile, les amylases sont bien établies pour leur efficacité dans le blanchiment des tissus (Mojsov, 2011).

Dans le secteur médical et pharmaceutique, les amylases trouvent leur utilité en tant qu'agents anti-inflammatoires et aides digestives, contribuant à prévenir les dyspepsies et les fermentations intestinales (Simon *et al.*, 2005 ; Pandey *et al.*, 2000).

L'efficacité des amylases ne s'est pas limitée à cela, elles sont aussi utilisées dans des domaines plus complexes, comme celui de la valorisation des déchets agricoles, Les amylases contribuent efficacement dans la dépollution et la récupération des déchets (Chen *et al.*, 2007; Adeniran *et al.*, 2010), notamment pour le traitement des résidus alimentaires tels que les surplus de boulangerie et autres matières riches en amidon (déchets de céréales) ainsi que les déchets agricoles. L'amidon présent dans ces déchets est transformé en sucres réducteurs (glucose, maltose et divers malto-oligosaccharides), ces produits de dégradation d'amidon, de grande valeur biotechnologique, trouvent leurs utilisations dans plusieurs domaines, incluant la nutrition, la cosmétique et la pharmacie (El-Aty et Mostafa, 2015; Rashid *et al.*, 2018).

2.2 Sources et origines des amylases

Comme c'est le cas d'autres enzymes à intérêt industriel, les amylases aussi peuvent être extraites de sources variées d'organismes vivants tels que les plantes, les animaux et les microorganismes (Tanyildizi *et al.*, 2005).

2.2.1 Les amylases d'origine végétale et les amylases d'origine animale

Les amylases végétales sont fréquemment extraites de divers types de céréales, incluant le blé, l'orge maltée, le seigle et le riz (Pratima et Umender, 1989 ; Mamo et Gessesse, 1999).

Ces enzymes, sont utilisées dans le secteur industriel, comme le secteur de l'industrie agroalimentaire par exemple il est possible d'accroître la teneur énergétique des porridges (un plat à base de céréales) enrichissant la farine avec des sources d' α -amylases d'origine végétale, surtout celles provenant de farines de grains germés (Desikachar, 1980 ; Mosha et Svanberg, 1983 ; Gopaldas *et al.*, 1988 ; Gopaldas *et al.*, 1989).

Au-delà de leurs provenance végétale, les amylases, peuvent aussi provenir des sources animales. Chez les animaux, seules les α -amylases qui ont été identifiées (Gabriela et Elena,

2008), ces enzymes sont principalement sécrétées par le pancréas des animaux supérieurs, et chez certaines espèces, elles proviennent également des glandes salivaires, notamment chez l'homme (Peyrot des Gachons et Breslin, 2016), chez le singe, le cobaye, l'écureuil, le rat et la souris (Gabriela et Elena, 2008). Cette enzyme se trouve également dans plusieurs tissus tels que le sang, les muscles, le foie, et l'urine (Gabriela et Elena, 2008).

Chez les poissons, la présence et l'activité des α -amylases dépendent de leurs régime alimentaire (Rodriguez-Viera *et al.*, 2016), à titre d'exemple, une activité élevée a été observée dans le système digestif des tilapias herbivores (Pervin *et al.*, 2020) et une activité principalement pancréatique chez les perches carnivores (Cuvier-Peres et Kestemont, 2001).

Toutefois, ces enzymes n'ont pas encore trouvé d'application industrielle majeure, ce qui explique pourquoi les recherches n'approfondissent pas davantage les études sur leurs propriétés et leurs fonctions (Hi *et al.*, 2012b).

2.2.2 Les amylases d'origine microbienne

Parmi toutes les enzymes amylolytiques existantes, les amylases microbiennes sont les plus utilisées à l'échelle industrielle, cela revient à leurs stabilité, leurs spécificité, et la capacité de contrôle de la réaction amylolytique (Mehta et Satyanarayana, 2016). L'emploi de microorganismes pour produire des amylases présente principalement deux avantages : le potentiel de production à grande échelle de façon économique et la facilité de modification génétique des microorganismes pour obtenir des enzymes aux propriétés spécifiques souhaitées (Abdel-Fattah *et al.*, 2013 ; Nigam, 2013).

Les amylases d'origine microbienne trouvent leurs utilisations dans diverses industries, notamment dans l'industrie des détergents où elles vont servir à éliminer les taches d'amidon responsables de la salissure des surfaces (Mitidieri *et al.*, 2006).

Les α -amylases, utilisées en industrie, sont principalement extraites de sources fongiques et bactériennes (Ferreira *et al.*, 2021), étant donné que ces microorganismes synthétisent les α -amylases en quantité abondante (Wang *et al.*, 2020).

L'extraction d'enzymes à partir de microorganismes fongiques, notamment les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, est une méthode éprouvée depuis le premier succès de production d' α -amylase par Takamine en 1894. Les α -amylases issues de ces champignons présentent

une thermostabilité modérée, avec une fourchette de température optimale s'étendant de 50°C à 55°C, comme le soulignent Fogarty et Kelly en (1994).

D'autres espèces sont productrices d' α -amylase, comme *Trichoderma harizianum* (Mohamed *et al.*, 2011), et *Aspergillus niger* qui est reconnue comme une espèce productrice d'une façon efficace d' α -amylase (Avwioroko *et al.*, 2018).

Chez les bactéries, la production de cette enzyme peut se fait aussi par des bactéries de la famille des *Bacillacées* (Milner *et al.*, 1997), parmi les espèces de cette famille on peut citer *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus licheniformis* qui ont été identifiées comme des souches productrices efficaces d' α -amylase (Bousseboua, 2002). Récemment, *Anoxybacillus thermarum* a été mis en avant par Mantri *et al* en 2019 comme une source précieuse d' α -amylase.

Parallèlement aux bactéries, les actinobactéries démontrent également leurs capacités à participer activement à la synthèse des enzymes amylolytiques. Parmi les espèces d'actinomycètes productrices d'amylases, on retrouve notamment *Streptomyces lophonurensis* (Rathore et Singh, 2021) et *Streptomyces griseorubens* (Bukhari *et al.*, 2021). Ceci met en évidence l'importance des actinobactéries comme source d'enzymes industriellement utiles, en particulier pour la dégradation de l'amidon dans divers secteurs tels que le secteur de l'industrie alimentaire et l'industrie pharmaceutique (Elyasi Far *et al.*, 2020).

Les microorganismes restent la source la plus exploitée dans la biotechnologie industrielle (Nigam, 2013), en raison de leur grande productivité à faible coût, leur plasticité et leur grande disponibilité (Burhan *et al.*, 2003).

2.3 Production des amylases bactériennes à l'échelle industrielle et l'importance des bactéries du sol dans cette production

La production à grande échelle des amylases est essentielle pour répondre aux besoins de l'industrie. Dans ce contexte, la recherche de microorganismes capables de produire de grandes quantités d'amylase constitue une priorité pour les scientifiques (Elyasi Far *et al.*, 2020).

Pour produire de l' α -amylase à grande échelle, les méthodes de fermentation submergée et de fermentation en milieu solide sont privilégiées, La fermentation submergée est idéale pour les cultures liquides et nécessite une humidité élevée pour la croissance des

Synthèse bibliographique

microorganismes, facilitant ainsi la production et la purification de l'enzyme, notamment avec l'utilisation de souches comme *Bacillus sp* (Vidyalakshmi, 2009). La fermentation en milieu solide, quant à elle, utilise des déchets à faible teneur en eau, tels que le papier, et se distingue par sa simplicité d'équipement, une production plus élevée et moins de déchets.

Cette méthode est couramment adoptée pour l' α -amylase, en particulier avec des co-cultures de *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus* (Sundarram et Krishna, 2014; Vidyalakshmi, 2009; Abdullah *et al.*, 2018).

Le sol est un épicycle d'une large gamme d'activités enzymatiques, incluant les oxydoréductases, les transférases et les hydrolases (comme les phosphatases, les cellulases, les chitinases, les protéases et les amylases (Davet, 1996).

Selon les travaux de Xavier et Laurence (1997), les bactéries se présentent dans une variété de sols et représentent la population microbienne la plus dense et la plus active métaboliquement dans le sol. Les bactéries sont au cœur de nombreux processus et d'interactions, soit bénéfiques soit néfastes, avec d'autres organismes du sol. Les défis majeurs pour ces microorganismes incluent la résistance à des températures élevées et la capacité à produire des enzymes thermostables ainsi que d'autres substances bioactives, comme l'ont rapporté Alrumman et ses collègues (2018).

Ces enzymes, dispersées dans cette unité vivante (sol), sont indispensables pour la décomposition de la matière organique, un processus fondamental pour l'équilibre d'écosystème (Petit et Jobin, 2005). Il a été estimé qu'un seul gramme de sol peut renfermer entre 10^{10} et 10^{11} bactéries, réparties en 5000 à 6000 espèces distinctes (Gurtis *et al.*, 2002; Horner-Devine *et al.*, 2003), qui sont donc des fournisseurs principaux d'enzymes dans le sol, se positionnant comme des agents de dégradation exceptionnellement efficaces (Parales et Haddock, 2004). Ils facilitent la biodégradation de composés organiques même complexes, comme la cellulose, la lignine, la chitine, et la pectine, entre autres (Pollegioni, 2015). De même, la production d'enzymes par les bactéries telluriques qui décomposent la matière organique libère des nutriments minéraux nécessaires à la croissance des plantes (Shukla et Varma, 2010). De plus, les bactéries ont un rôle déterminant dans la modération des cycles biogéochimiques (Bartoli, 1986) par exemple, la décomposition de la cellulose qui joue un rôle vital dans le cycle du carbone (Leschine, 1995).

Synthèse bibliographique

Comme précisé plus haut, les amylases présentent une importance particulière dans le secteur industriel, d'où l'importance de rechercher des bactéries du sol productrices de cette enzyme, parmi les bactéries telluriques, le genre *Bacillus* est reconnu comme l'une des principales sources de production d'amylase en particulier *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus polymyxa* (El-Fallal *et al.*, 2012; Dash Rahman et Sarker, 2015).

D'autre part, les actinobactéries possèdent une capacité remarquable à dégrader des substances complexes, grâce à leur production d'une gamme d'enzymes hydrolytiques telles que les pectinases, amylases, cellulases, xylanases, lipases, protéases et chitinases. Ces enzymes, dont plusieurs, sont employées industriellement (Pooja *et al.*., 2009 ; Assamoi *et al.*, 2009 ; Mukhtar *et al.*, 2017).

Les capacités, propres aux bactéries du sol, leur ont permis de s'imposer comme des acteurs majeurs et de confirmer leur place au rang des microorganismes privilégiés pour la production d'enzymes à intérêt industriel. De ce fait, le sol a été identifié comme un milieu idéal pour l'isolation de bactéries à des fins de recherche d'enzymes à intérêt industriel important comme c'est le cas des amylases. Pour cela l'objectif de notre travail est de rechercher et de caractériser des amylases chez des bactéries isolées à partir de différents sols.

Matériels et méthodes

L'intégralité de ce travail expérimental réalisé pour l'obtention du diplôme de master en microbiologie appliquée a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie de l'Université Belhadj Bouchaib-Ain Témouchent (UBBAT), durant le second semestre du Master 2 de l'année universitaire 2023/2024.

L'objectif de ce travail est de rechercher et de caractériser l'activité amylasique à intérêt industriel chez des bactéries isolées à partir de différents sols.

1. Isolement et purification des isolats bactériens à partir des différents sols

Pour réaliser l'isolement des bactéries, 4 échantillons de sol ont été collectés. Dans un premier temps, 3 des échantillons du sol ont été prélevés à partir d'un site situé au niveau de notre université. Ces 3 échantillons du sol, prélevés d'une profondeur d'environ 5 cm de la surface les terres (**Figure 5**) proviennent d'un sol vierge, d'une zone rhizosphérique et d'une zone située à 1 m de distance de la végétation. Le 4^{ème} échantillon, provient d'une zone rhizosphérique d'un sol salin situé à Hammam Bouhdjer de la ville d'Ain Témouchent. Les échantillons ont été mis ensuite dans des boîtes de Pétri stériles et ramenés au laboratoire pour l'isolement des bactéries.



Figure 5 : prélèvement du sol pour l'isolement des bactéries.

Ensuite, pour l'isolement des bactéries du sol, les techniques de dilutions décimales en série ont été utilisées (Jamil *et al.*, 2007 ; Rasooli *et al.*, 2008). Pour cela, 0.9 g de sol sont placés dans un tube contenant 9 mL de l'eau physiologique stérile, ensuite, le mélange est vigoureusement vortexé pour obtenir une solution homogène. Cette solution sera

considérée comme une solution mère à partir de laquelle les dilutions décimales seront préparées jusqu'à la dilution 10^{-5} .

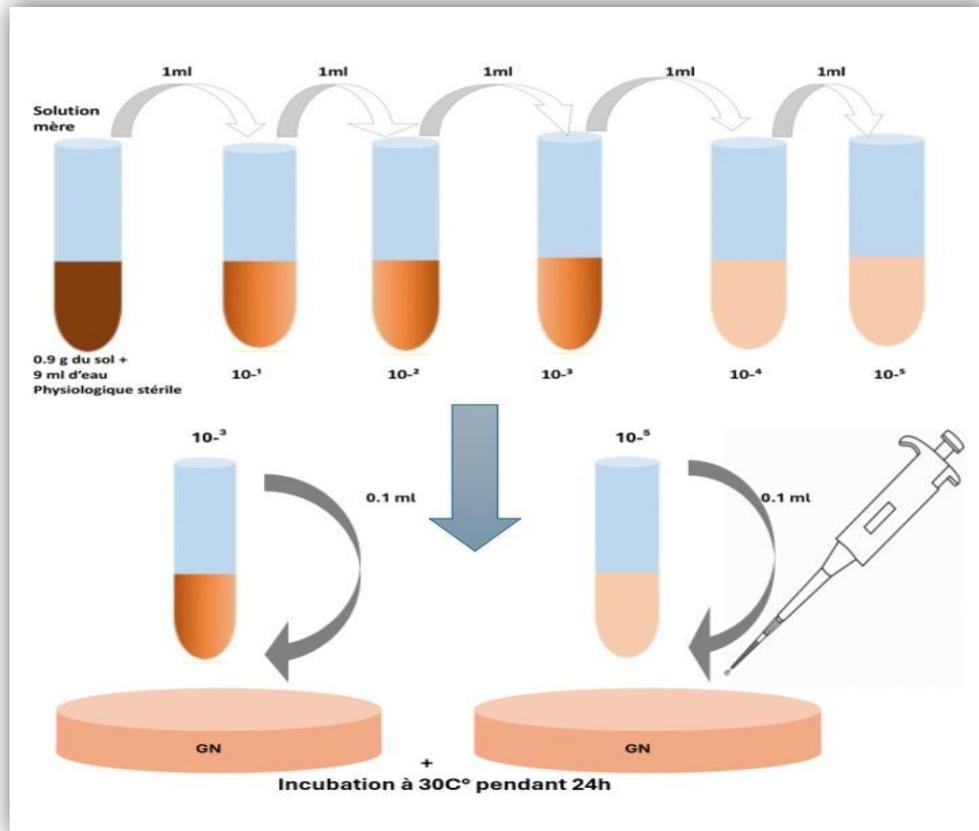


Figure 6 : Préparations des dilutions décimales à partir de solution mère .

Ensuite, $100\ \mu\text{L}$ sont prélevés à partir de la dilution 10^{-3} et 10^{-5} et étalés sur la Gélose Nutritive (GN) (voir Annexe 1). Les boîtes sont incubées par la suite pendant 24h à 30°C .

Après incubation, 2 colonies bien distinctes sont prélevées à partir des boîtes déjà incubées 10^{-3} ou 10^{-5} et ensemencées sur GN par épuisement afin d'obtenir des colonies purifiées. Les boîtes sont incubées, ensuite, pendant 24 h à 30°C .

Les 8 isolats obtenus après purification ont été nommés comme suit

- SV1 et SV2 isolés à partir du sol vierge ;
- SRZ 1 et SRZ 2 isolés à partir du sol rhizosphérique ;
- SRZ 1m1 et SRZ 1m 2 isolés à partir du sol à 1m de distance de la végétation ;
- SS1 et SS2 isolés à partir d'une zone rhizosphérique d'un sol salin.

La pureté des colonies isolées est vérifiée par observation macroscopique et microscopique.

2. Vérification de la pureté des isolats bactériens

2.1. Observation macroscopique

Dans le but de vérifier et d'assurer la pureté des colonies bactériennes, un examen macroscopique des colonies bactériennes obtenues après l'incubation des boîtes a été réalisé.

Cela permet d'identifier leurs différentes caractéristiques telles que la forme, la taille, la couleur, l'élévation, le contour, l'opacité et la consistance des colonies.

2.2. Observation microscopique

L'observation microscopique a été effectuée après coloration de Gram afin de déterminer le Gram, la forme et le mode de regroupement des cellules bactériennes isolées.

Après vérification de leurs pureté, les isolats bactériens sont conservés à 4°C, après ensemencement sur GN inclinée sur tube à essai.

3. Préparation des cultures et récupération des surnageants des isolats bactériens

3.1. Préparation des cultures bactériennes

À partir des cultures bactériennes purifiées précédemment sur GN, des colonies sont prélevées pour ensemercer des tubes à essai contenant 10 mL de Bouillon Nutritif (BN) (**voir Annexe 1**).

Après 24 h d'incubation à 30°C, la densité optique (DO) des pré-cultures obtenues est mesurée à 600 nm. À partir de ces pré-cultures, 50 mL de BN stérile préparés dans des flacons, sont ensemencés de sorte à avoir une DO initiale de 0.01 et incubés à 30°C pendant 24h.

3.2. Récupération des surnageants des isolats bactériens

À partir des cultures bactériennes de 24h, les surnageants des isolats bactériens sont récupérés par centrifugation à 6000 tours/min pendant 5 min. Les surnageants obtenus sont utilisés pour la recherche de l'activité amylasique chez les différents isolats. La teneur en protéines de ces surnageants sont déterminées par la méthode de Bradford (1976).

4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976)

Afin de déterminer et de quantifier les concentrations des protéines présentes dans les surnagants des isolats bactériens, la méthode de Bradford (1976) a été utilisée.

Cette méthode rapide, précise et fiable, se base sur l'utilisation du colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 qui se lie spécifiquement aux protéines. Cette interaction modifie le spectre d'absorption du colorant, le faisant passer de 465 nm à 595 nm, et c'est ce changement spécifique qui est mesuré (Bradford, 1976). La réaction de coloration est complète en 2 min environ et la teinte restant stable durant une heure (Bradford, 1976).

Pour le dosage des protéines dans les surnagants, un volume de 0.8 mL est pris de chaque surnageant auquel 0.2 mL de réactif Bradford sont ajoutés. Pour le blanc, le volume du surnageant est remplacé par 0.8 mL de BN stérile. L'absorbance est ensuite mesurée à 595 nm.

Ensuite, pour déterminer la quantité des protéines dans les surnageants, une courbe étalon de la protéine de référence Albumine du Sérum Bovin ou Bovine Serum Albumin (BSA), $DO_{595nm} = f([BSA])$ est tracée (Brady et Macnaughtan, 2015).

Pour cela, une solution mère de la protéine BSA à 1 mg/mL est préparée. À partir de cette solution, une gamme de solutions à différentes concentrations (de 0.05 à 1 mg/mL) (**Tableau3**) est préparée. Ensuite, 0,2 mL du réactif de Bradford sont ajoutés à 0,8 mL de chaque concentration. L'absorbance de chaque concentration est ensuite mesurée à 595 nm.

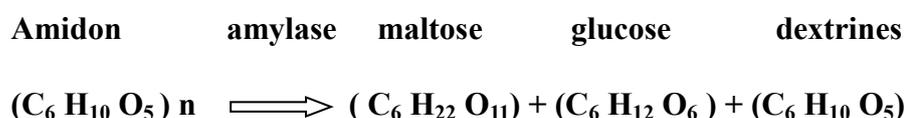
Tableau 3: les différentes concentrations, de la protéine de référence BSA, utilisées pour la préparation de la courbe d'étalon $DO_{595nm} = f([BSA])$.

Concentrations des solutions étalons de BSA en mg/mL	0	0.05	0.1	0.25	0.5	1
Volume BSA à 1mg/mL en (mL)	0	0.05	0.1	0.25	0.5	1
Eau distillée en mL	1	0.95	0.9	0.75	0.5	0

5. Recherche et caractérisation de l'activité amylasique des isolats bactériens

Afin de rechercher et de caractériser l'activité amylasique présente chez les 8 souches bactériennes et isolées dans notre étude, une méthode basée sur le dosage de la disparition de l'amidon a été effectuée.

A savoir que les enzymes amylolytiques, ont la capacité de cliver les grandes molécules d'amidon en hydrolysant les liaisons glucosidiques (Mehta et Satyanarayana, 2016), les produits finaux de cette digestion amylolytiques des amidons sont principalement le maltose, une certaine quantité de glucose, ainsi que des dextrans limites (Jacobsen *et al.*, 1972), comme montré dans la réaction suivante



Afin de rechercher l'activité amylasique au niveau des surnageants des 8 isolats bactériens, la disparition de l'amidon révélatrice de la présence d'une activité amylasique a été évaluée, Pour cela, le substrat (l'amidon) est préparé en mélangeant 40 mL d'une solution d'amidon à 1% avec 50 mL d'eau distillée préalablement bouillie. Ensuite, l'eau distillée est ajouté jusqu'à l'obtention d'un volume total de 100 mL (Fatema *et al.*, 2017). Cette solution est ensuite diluée par un facteur de 10 pour obtenir la solution mère d'amidon à 400 µg/mL.

La réaction enzymatique pour révéler la présence de l'amylase dans les surnageants de chaque isolat, s'effectue en ajoutant 0.4 mL du surnageant à 0.750 mL du tampon phosphate à 0,1 M et pH 7 et de 0.1 mL de solution d'amidon à 400 µg/mL.

Après agitation et incubation à 30°C, 0.750 mL de Lugol sont ajoutés et la réaction est arrêtée par l'ajout de 1.5 mL de HCL à 10% (Aiyer, 2004 ; Fatema *et al.*, 2017).

L'absorbance est ensuite mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 620 nm contre un blanc incubé dans les mêmes conditions, sauf la solution d'amidon est remplacée par l'eau distillée.

Pour déterminer la quantité de l'amidon qui reste après la réaction enzymatique, une courbe étalon $DO_{620nm} = f([\text{amidon}])$ est tracée, Pour cela, des solutions à différentes concentrations (de 20 à 100 µg/mL) sont préparées à partir de cette solution mère d'amidon à 400 µg/mL (Tableau 4).

Ensuite, un volume de 0.750 mL de Lugol est ajouté à 1,250 mL de chaque concentration, ensuite la DO de ce mélange est mesurée à 620 nm.

Tableau 4 : les différentes concentrations d'amidon utilisées pour la préparation de courbe d'étalon $DO_{620nm} = f([amidon])$.

Concentrations des solutions étalon de l'amidon en $\mu\text{g/mL}$	0	20	40	60	80	100
Volume de la solution d'amidon à (400 $\mu\text{g/mL}$) en mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Eau distillée en mL	2	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5

5.1. Influence du temps d'incubation sur l'activité amylasique des surnageants des isolats bactériens

L'étude de la cinétique de dégradation de l'amidon par les amylases présentes dans les surnageants, s'effectue par incubation des milieux réactionnels décrit précédemment à 30°C à différents temps (5 , 10, 15, 20 et 30 min).

L'absorbance est ensuite mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 620 nm.

5.2 Caractérisation physico-chimique des amylases des surnageants des isolats bactériens

Pour caractériser l'activité amylasique des isolats bactériens, l'influence du pH et de la température sur cette activité ont été testés.

5.2.1. Influence du pH sur l'activité amylasique des surnageants des isolats bactériens

Pour déterminer l'influence du pH sur l'activité amylasique des surnageants des 8 isolats

bactériens, le tampon phosphate 0.1 M à pH 7 (neutre) du milieu réactionnel (décrit précédemment) est remplacé par un tampon phosphate 0,1 M à pH 6 (acide) et un tampon phosphate 0,1 M à pH 8 (basique). Le milieu réactionnel est incubé ensuite à 30 °C pendant 30 min.

La quantité d'amidon restante après chaque réaction est mesurée par spectrophotométrie à 620 nm (Fatema *et al.*, 2017).

5.2.2. Influence de la température sur l'activité amylasique des surnageants des isolats bactériens

Pour déterminer l'effet de la température sur l'activité amylasique des surnageants des 8 isolats bactériens, le milieu réactionnel (décrit précédemment) est incubé à différentes températures (20°C, 25°C, 30°C, 35°C et 40°C) pendant 30 min.

La lecture spectrophotométrique est réalisée à 620 nm afin de mesurer la quantité d'amidon restante après chaque réaction (Fatema *et al.*, 2017).

6. Test de thermostabilité des amylases des surnageants des isolats bactériens

Une meilleure stabilité thermique de l'enzyme représente l'un des avantages les plus significatifs des biocatalyseurs dans les applications industrielles (Cernia *et al.*, 1998). De ce fait, le but principal du test de stabilité est d'identifier la capacité de l'enzyme amylase, sécrétée par les 8 isolats bactériens, pour maintenir leurs activités stables suite à un traitement thermique.

Ce test implique le dépôt des surnageants des 8 isolats bactériens dans un bain-marie, à une température de 90°C pendant 1h et 2h (Kiran *et al.*, 2018).

Après ce traitement thermique, l'activité résiduelle des amylases est mesurée en suivant le même protocole décrit précédemment, sauf que le surnageant non-traité est remplacé par surnageant traité.

La lecture spectrophotométrique est réalisée à 620 nm afin de mesurer la quantité d'amidon restant après chaque réaction.

Résultats et discussions

1. Isolement et purification des isolats bactériens à partir des différents sols

Afin de rechercher des activités amylasiques extracellulaires chez des bactéries du sol, 8 souches bactériennes ont été isolées à partir de différents sols : un sol vierge, sol rhizosphérique, un sol se trouvant à 1m de distance de la végétation et d'une zone rhizosphérique d'un sol salin.

2. Vérification de la pureté des isolats bactériens

2.1 Observation macroscopique

La pureté des isolats bactériens a été examinée d'abord sur GN. L'examen visuel des cultures sur boîtes a confirmé l'homogénéité et la pureté des colonies obtenues.

Les colonies des différents isolats bactériens présentent une variété de caractéristiques comme la forme, la taille, et la texture (**Tableau 5**).

2.2 Observation microscopique

L'examen microscopique réalisé après coloration de Gram, confirme la pureté des cultures obtenues sur GN, et il permet de déterminer leurs aspects microscopique et leur Gram, les résultats obtenus sont résumés dans le (**Tableau 5**).

Tableau 5 : tableau récapitulatif de l'observation macroscopique et microscopique des 8 isolats bactériens.

Isolats	Observation macroscopique				Observation microscopique	
	Forme	Taille	Couleur	Texture	Gram	Aspect
SV 1	Circulaires avec un profil légèrement bombé	Petites tailles.	Blanchâtre	Brillante et lisse.	-	Bacille, courts et certains longs, isolés ou en diplobacille.
SV 2	Des colonies arrondies à élévation convexe et des contours réguliers.	Petites tailles.	Blanchâtre	Brillante et lisse.	+	Bacille, courts Isolés ou en diplobacille.
SRS 1	De forme circulaire à élévation surélevée bien définis.	Petites tailles.	Blanchâtre	Butyreuse et lisse.	+	Bacille, longs et certains courts et isolés.
SRZ 2	Des colonies arrondies à élévation convexe.	Petites tailles.	Blanchâtre	Butyreuse et lisse.	-	Bacille courts très petits et isolés.

Résultats et discussions

SRZ 1m 1	Des colonies circulaires, certaines ovales avec des contours réguliers et une élévation allant de convexe à bombée.	Petite à moyenne.	Blanchâtre	Butyreuse et lisse.	+	Cocci très petits, regroupés en amas denses.
SRZ 1m 2	Des colonies arrondies à élévation convexe et des bords uniformes.	Très petites tailles.	Blanchâtre	Brillante et lisse.	+	Bacilles, bâtonnets allongés, isolés ou en chainettes.
SS 1	Des colonies circulaires, à élévation variée de plate à convexe avec des contours réguliers.	Petites tailles.	Blanchâtre	Mucoïde, brillante et lisse.	-	Bacilles avec extrémités arrondies, courts généralement isolés.
SS 2	Des colonies circulaires à élévation surélevée.	Petites tailles	Blanchâtre	Mucoïde, brillante et lisse.	-	forme de cocci, très petite et en amas.

2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976)

Pour déterminer les quantités des protéines dans les surnageants des 8 isolats bactériens, une courbe étalon $DO_{595nm} = f([BSA])$ de la protéine de référence BSA (Bovine Serum Albumin) a été tracée (**Figure 7**).

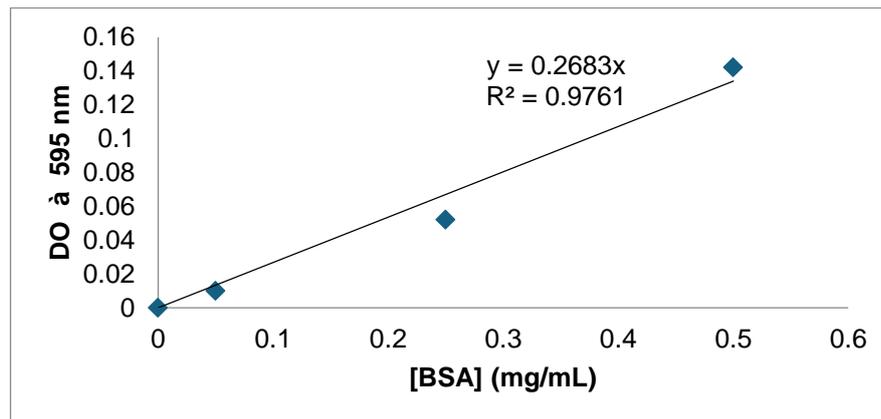


Figure 7 : courbe étalon de la protéine de référence BSA.

Ensuite, cette courbe étalon a été utilisée pour déterminer la quantité des protéines qui se trouve au niveau des surnageants des 8 isolats bactériens qui vont servir à rechercher les activités amylasiques. Les résultats de ce dosage de la quantité des protéines sont présentés dans le tableau suivant

Tableau 6 : résultats de dosage des protéines au niveau des surnageants des isolats bactériens.

L'isolat bactérien	SV1	SV2	SRZ1	SRZ2	SRZ1 m1	SRZ1 m2	SS1	SS2
Quantité des protéines mg/mL	0.201	0.5	0.481	0.182	0.145	0.115	0.276	0.022

Ces quantités de protéines seront utilisées pour déterminer les quantités d'amidon dégradées (par les amylases des surnageants) par mg de protéines.

4. Recherche et caractérisation de l'activité amylasique des isolats bactériens

Cette partie consiste à rechercher et à caractériser l'activité amylasique dans les surnageants des 8 isolats bactériens. La méthode utilisée pour évaluer cette activité est basée sur le protocole établi par Syn et Chen en 1997. Cette méthode utilise le révélateur Lugol et l'amidon comme substrat.

L'activité amylasique des 8 isolats a été mesurée en quantifiant la quantité d'amidon dégradée par les amylases présentes dans ces extraits bruts enzymatiques.

Afin de déterminer la quantité d'amidon dégradée par les amylases qui se trouve dans les surnageants des 8 isolats bactériens, une courbe étalon $DO_{620nm} = f([\text{amidon}])$ a été tracée (**Figure 8**).

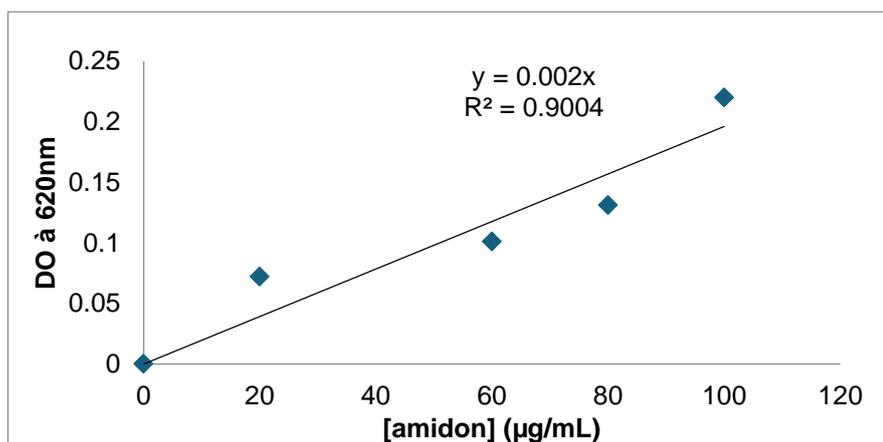


Figure 8 : courbe étalon de l'amidon.

Les résultats obtenus (**Figure 9**) montrent la présence d'une activité de dégradation de l'amidon dans les surnageants des 8 isolats bactériens.

Les résultats de la recherche de l'activité amylasique dans les surnageants des différents isolats, ont montré que la quantité de l'amidon (Substrat) diminue en présence des différents surnageants et en fonction du temps d'incubation (**Figure 9**). Comme indiqué dans la partie matériels et méthodes, les temps testés sont 5, 10, 15, 20 et 30 min.

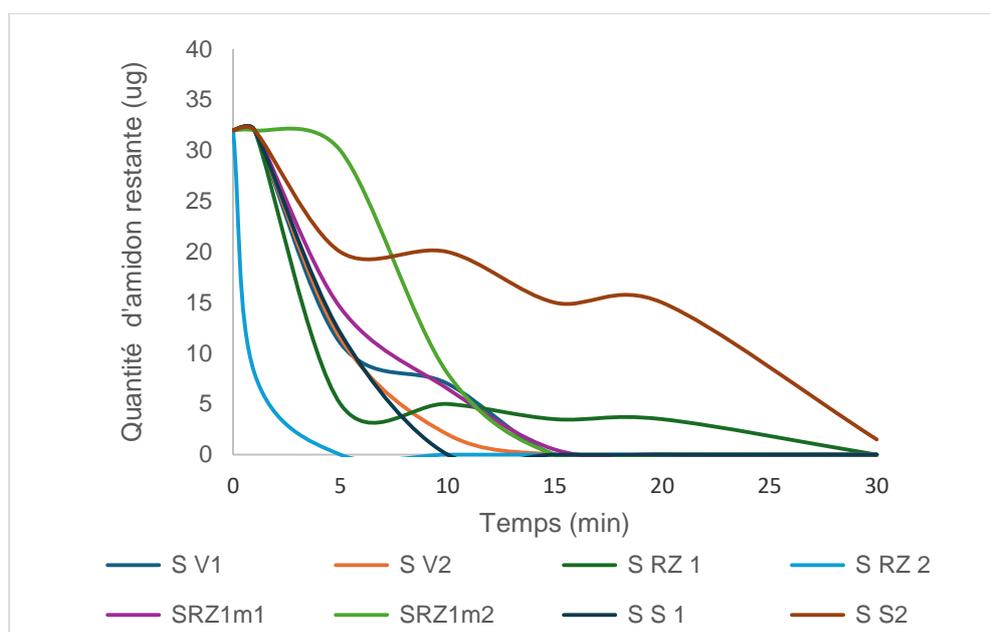


Figure 9 : courbes représentatives de la diminution, en fonction du temps, de la quantité de l'amidon en présence des différents surnageants.

D'après les analyses des pré-résultats obtenus de la recherche d'activités amylasiques (**Figure 9**), on remarque que les surnageants de tous les isolats testés possèdent une activité amylasique, cela est attribué à la capacité de réduction de la quantité initiale d'amidon au fil du temps, ce qui suggère que toutes les bactéries isolées à partir de différents sols sont capables d'hydrolyser l'amidon par leurs enzymes amylolytiques.

Plusieurs études sont en accord avec nos résultats, et qui ont confirmé l'existence des enzymes amylolytiques, non seulement chez les bactéries du sol, mais également chez d'autres microorganismes présents dans celui-ci (Aiyer, 2004 ; Reddy et Sreeramulu, 2012).

Les bactéries du genre *Bacillus*, naturellement présentes dans le sol, sont parmi les bactéries les plus étudiées pour leur capacité à produire des amylases (Mehta et Satyanarayana, 2016 ; Aiyer, 2004). Par exemple, les études d'Aiyer en 2004 ont démontré que la souche de *Bacillus licheniformis* SPT 27 naturellement présente dans les sols alcalins pouvait produire des amylases très actives. Mehta et Satyanarayana en 2016, ont aussi confirmé la présence des amylases de type α -amylases chez *Bacillus subtilis* TB1, Les

Résultats et discussions

actinomycètes sont aussi productrices des amylases (Saadoum *et al.*, 2007 ; Sathya et Ushadevi ,2014).

Autre que les bactéries du sol, l'étude de Reddy et Sreeramulu en 2012 a également montré que des champignons filamenteux isolés du sol, notamment *Aspergillus Niger*, *Cladosporium*, *A. terreus* et *A. flavus*, produisent aussi des amylases extracellulaires.

L'amylase, grâce a sa capacité à décomposer l'amidon en plusieurs sous-produits (dextrines, oligosaccharides, molécules de glucose) permettent à ces bactéries, d'utiliser ces sous-produits comme source d'énergie pour accomplir leurs fonctions vitales (Gupta *et al.*, 2003). Aussi, à partir de ces sous-produits issus de leur activité enzymatique sur l'amidon, les amylases jouent également un rôle crucial dans le cycle du carbone (Tomasik et haron, 2012), l'un des principaux cycles biogéochimiques de la planète. Par exemple les molécules du glucose peuvent être métabolisés en CO₂ contribuant ainsi au flux global du carbone dans l'écosystème (Poolman, 1993 ; Nag *et al.*,2011).

Afin de comparer l'activité amyliasique entre les surnagents des 8 isolats, la quantité d'amidon hydrolysée par mg de protéine a été calculée en se basant sur les résultats de dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) (**Tableau 6**).

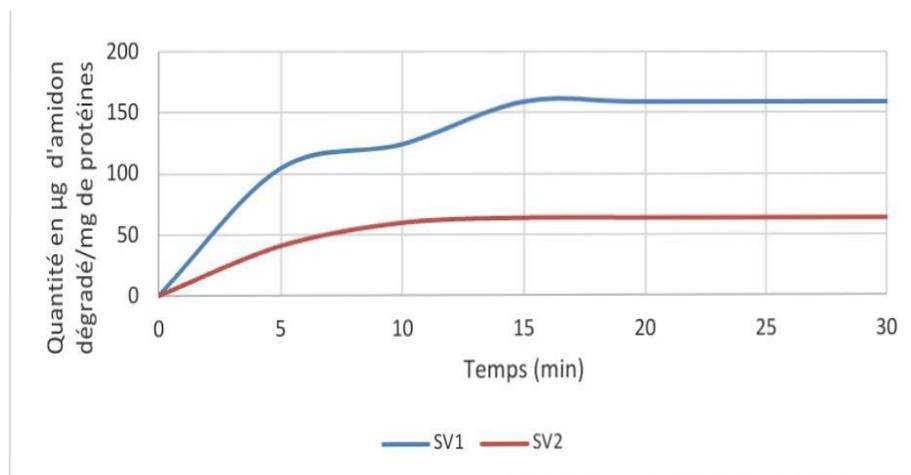


Figure 10 A : courbes représentatives de la cinétique de dégradation de l'amidon par les surnagents des isolats SV1 et SV2.

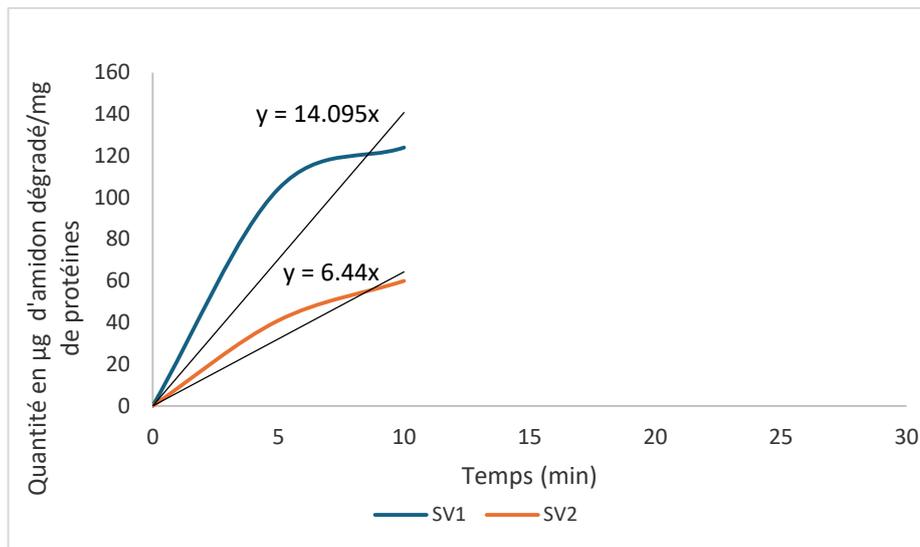


Figure 10 B : vitesses initiales des amylases présents dans les surnageants des isolats SV1 et SV2

Dans un premier temps, la comparaison des activités amylasiques a été effectuée entre les bactéries isolées d'un même sol.

Pour les isolats SV1 et SV2 (**Figure 10 A**), isolés du même sol vierge situé dans un site de l'université d'Ain Témouchent, on remarque qu'il y a une plus forte activité amylasique dans le surnageant de l'isolat SV1 que SV2.

En effet, au bout de 5 min, le surnageant de l'isolat SV1 a dégradé une quantité d'amidon égale à 104,22 µg /mg de protéines alors que le surnageant de l'isolat SV2 n'a dégradé qu'une quantité de 41 µg / mg de protéine.

Les amylases des surnageants des 2 isolats arrivent à leurs maximum d'activité au bout de 15 min d'incubation, ce qui représente, respectivement, une quantité d'amidon par mg de protéines égale à 158,81 µg/mg de protéines pour l'isolat SV1 et égale à 64 µg/mg de protéines pour SV2.

Résultats et discussions

La **Figure 10 B** : montre la vitesse initiale des amylases provenant des surnageants des isolats SV1 et SV2 au début de la réaction enzymatique. La vitesse du départ pour l'enzyme présente dans le surnageant de l'isolat SV1 est estimée à 14,095 $\mu\text{g}/\text{min}$, alors que celle de l'enzyme présente dans le surnageant de l'isolat SV2 est estimée à 6,44 $\mu\text{g}/\text{min}$.

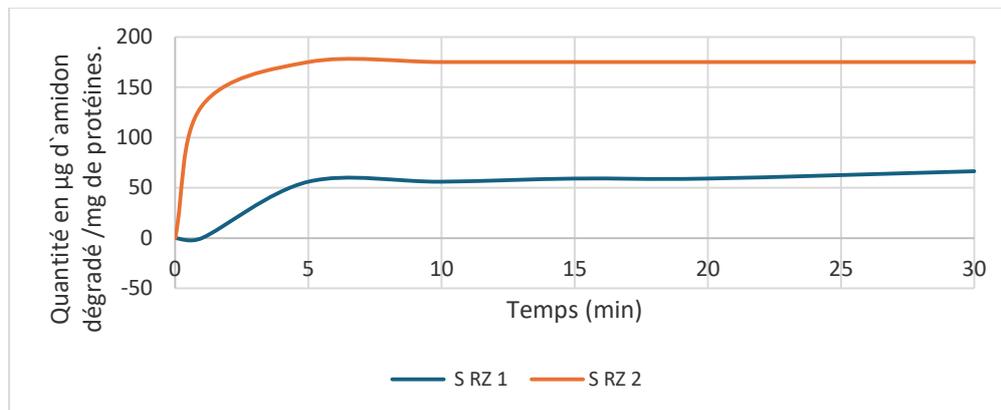


Figure 11A : courbes représentatives de la cinétique de la dégradation de l'amidon par surnageant des isolats SRZ 1 et SRZ 2.

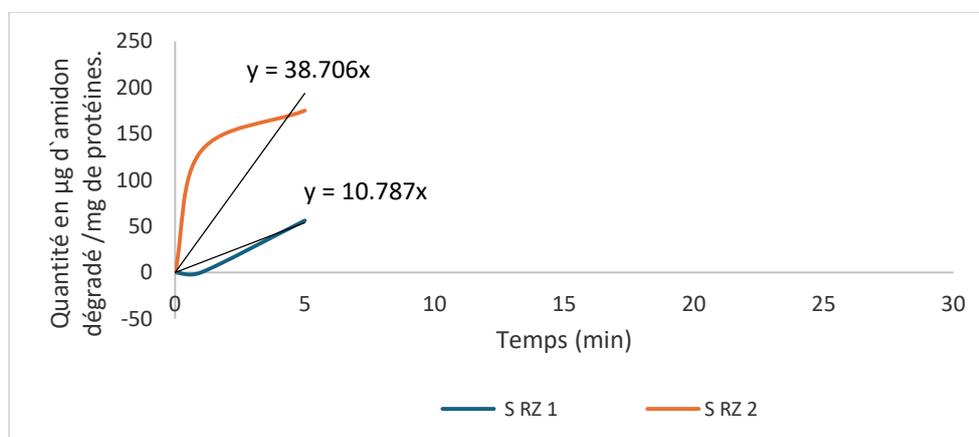


Figure 11B : vitesses initiales des amylases présents dans les surnageants des isolats SRZ 1 et SRZ 2.

Concernant les surnageants des isolats SRZ1 et SRZ2 provenant du même sol rhizosphérique d'un site au niveau de l'université d'Ain Témouchent, il a été constaté que l'activité amylasique du surnageant de l'isolat SRZ1 est moins importante comparativement à

Résultats et discussions

celle du surnageant de l'isolat SRZ2 (**Figure 11A**). Les amylases du surnageant de l'isolat SRZ1 a commencé à réagir en décomposant une quantité d'amidon évaluée à 56,093 µg/mg de protéines dès la 5^{ème} minute. Par la suite, la quantité d'amidon décomposé a augmenté progressivement pour atteindre 66,48 µg/mg de protéines à la trentième minute post-incubation. Quant à l'isolat SRZ2, dès la 1^{ère} minute, la quantité d'amidon hydrolysée est égale à 131,265 µg/mg de protéines et a augmenté pour atteindre son maximum de 175,020 µg/mg de protéines à la 5^{ème} minute.

La Figure 11B : montre la vitesse initiale des amylases provenant des surnageants des isolats SRZ1 et SRZ2 au début de la réaction enzymatique. La vitesse du départ pour l'enzyme présente dans le surnageant de l'isolat SRZ1 est estimée à 10.787µg/min, alors que celle de l'enzyme présente dans le surnageant de l'isolat SRZ2 est estimée à 38.796µg/min.

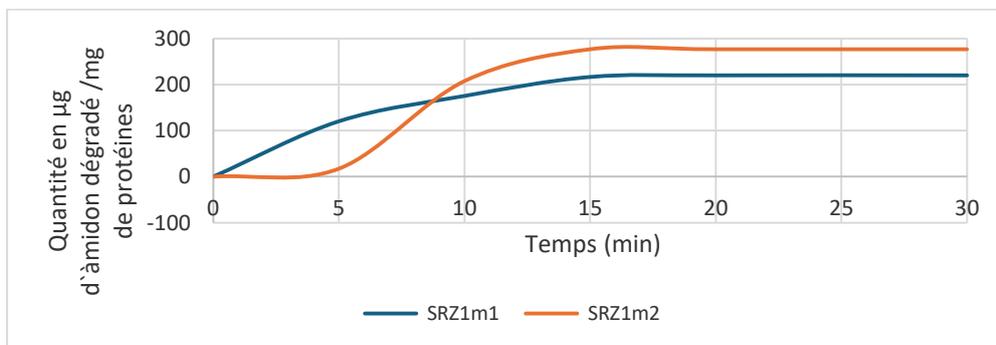


Figure 12A : courbes représentatives de la cinétique de la dégradation de l'amidon par surnageant des isolats SRZ 1m 1 et SRZ 1m 2.

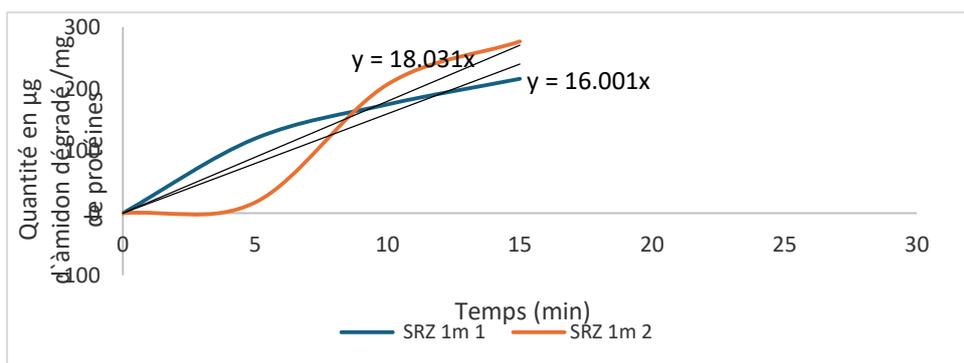


Figure 12B : vitesses initiales des amylases présents dans les surnageants des isolats SRZ 1m 1 et SRZ 1m 2.

Pour les isolats SRZ1m2 et SRZ1m1, provenant du même sol situé à 1m de distance de la végétation, dans un site de l'université d'Ain Témouchent on remarque dans un premier temps que l'activité amylasique du surnageant de l'isolat SRZ1m1 est supérieure à celle de l'isolat SRZ1m2 (**Figure 12A**). En effet, en 5 min l'isolat SRZ1m1 a dégradé une quantité d'amidon égale à 120.25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines alors que l'isolat SRZ1m2 n'a dégradé qu'une quantité de 17.29 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines. Ensuite au bout de 10 min d'incubation, l'activité des enzymes présentes dans le surnageant de l'isolat SRZ1m2 devient supérieure à celle du surnageant de l'isolat SRZ1m1. En effet, après 10 min d'incubation, le surnageant de l'isolat SRZ1m2 a dégradé une quantité d'amidon égale à 207.48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines alors que le surnageant de l'isolat SRZ1m1 n'a dégradé qu'une quantité de 175.23 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines.

L'activité des amylases présentes dans le surnageant de l'isolat SRZ1m1 atteint son activité maximale après 15 minutes d'incubation, ce qui représente une quantité d'amidon dégradée par mg de protéines égale à 219.89 μg . Quant aux amylases présentes dans le surnageant de l'isolat SRZ1m2, son activité atteint sa valeur maximale après 20 minutes d'incubation, ce qui représente une quantité d'amidon dégradée par mg de protéines égale à 276.64 μg .

La Figure 12 B : montre la vitesse initiale des amylases provenant des surnageants des isolats SRZ 1m1 et SRZ 1m2 au début de la réaction enzymatique. La vitesse de départ pour l'enzyme présente dans le surnageant de l'isolat SRZ 1m1 est estimée à 16.001 $\mu\text{g}/\text{min}$, tandis que celle de l'enzyme présente dans le surnageant de l'isolat SRZ 1m 2 est estimée à 18.031 $\mu\text{g}/\text{min}$.

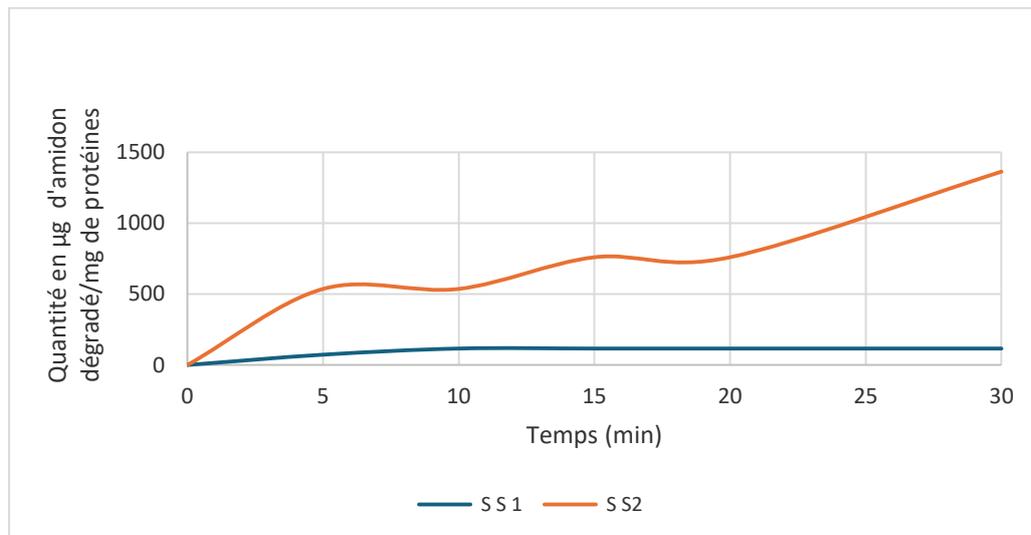


Figure 13 A : courbes représentatives de la cinétique de la dégradation de l'amidon par surnageant des isolats SS 1 et SS 2.

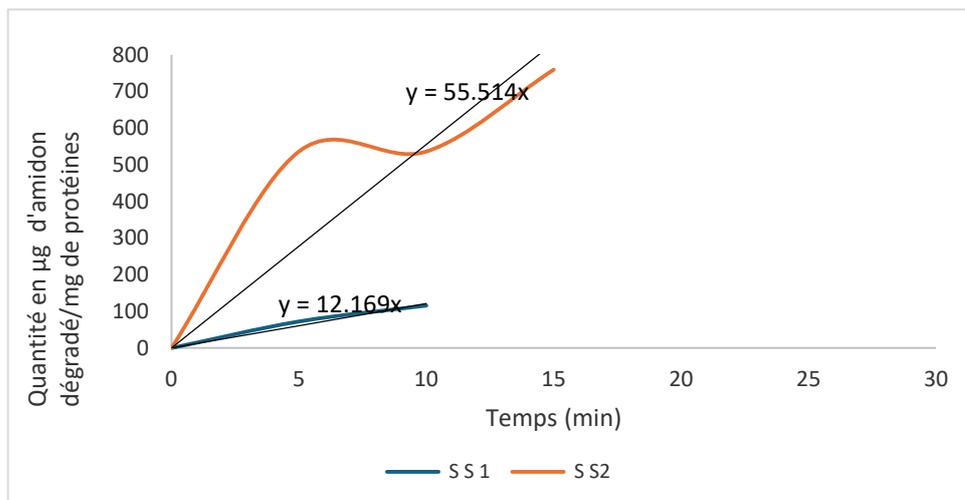


Figure 13B : vitesses initiales des amylases présentes dans les surnagants des isolats SS 1 et SS 2.

Enfin concernant les isolats SS1 et SS2 (**Figure 13A**), provenant d'une zone rhizosphérique d'un sol salin de la commune de Hammam Bouhdjer, on remarque qu'il y a une faible activité amylasique dans le surnageant de l'isolat SS1, tandis que le surnageant de

Résultats et discussions

l'isolat SS2, il présente une activité amylasique plus élevée. En effet, au bout de 5 minutes, l'isolat SS1 a dégradé une quantité d'amidon égale à 72,43 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines, alors que l'isolat SS2 a dégradé une quantité de 536 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine.

À 10 minutes, on remarque que l'activité de l'isolat SS1 a augmenté à 115,89 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine et celle de l'isolat SS2 elle est restée constante.

Les amylases des surnageants des 2 isolats SS1 et SS2, atteignent leur maximum d'activité, respectivement, au bout de 15 et 30 minutes d'incubation, ce qui représente une quantité d'amidon par mg de protéines égale à 115,89 μg pour le surnageant de l'isolat SS1 et 1362,33 μg pour le surnageant de l'isolat SS2.

La Figure 13B : montre la vitesse initiale des amylases provenant des surnageants des isolats SS1 et SS2 au début de la réaction enzymatique. La vitesse du départ pour l'enzyme présente dans le surnageant de l'isolat SS1 est estimée à 12.169 $\mu\text{g}/\text{min}$, alors que celle de l'enzyme présente dans le surnageant de l'isolat SS2 est estimée à 55.514 $\mu\text{g}/\text{min}$.

En comparant l'efficacité enzymatique des différents isolats, il est apparu que les amylases de l'isolat SS2 sont les plus performantes, suivies par celles de l'isolat SRZ1m2. Les amylases des isolats SRZ 1m1, SRZ2, SV1 et SS1 présentaient une efficacité modérée, tandis que celles des isolats SRZ1 et SV2 sont les moins actives parmi toutes celles testées.

D'après les résultats obtenus de cette comparaison, le type du sol ne semble pas avoir un effet direct, qu'il soit positif ou négatif, sur l'activité des amylases des isolats. De plus, on remarque aussi qu'il y a une différence de l'activité amylasique même entre les bactéries isolées d'un même sol.

La variabilité de l'efficacité des amylases des isolats pourrait être expliquée par plusieurs facteurs clés, incluant les différences physiologiques et génétiques entre les souches bactériennes. Ces différences sont également influencées par de nombreux facteurs externes, comme les conditions environnementales propres à chaque type de sol (Fry et Day, 1990).

Le sol est un milieu biologique multifonctionnel où la croissance de diverses espèces bactériennes qui y résident dépend de sa qualité ou de sa fertilité, mesurée notamment par des facteurs tels que les quantités de carbone et d'azote (Wei *et al.*, 2024).

Concernant la production des amylases chez les bactéries, il a été montré que la nature et la concentration des sources de carbone et d'azote dans ces milieux biologiques, affectent

directement la production des amylases chez les bactéries productrices (Aiyer, 2004), par exemple une carence en azote peut limiter la production optimale de l'amylase, tandis qu'un excès pourrait inhiber sa synthèse (Aiyer, 2004).

De plus, il a été prouvé que des niveaux de production plus élevés d'amylase sont obtenus dans des milieux composés de matières premières complexes incluant de l'amidon issu de maïs, d'orge, de blé et de malt (Pratima et Umender, 1989 ; Mamo et Gessesse, 1999). De même, la composition et la quantité de carbone dans les milieux sont déterminantes pour la croissance bactérienne et la production des amylases extracellulaires (Aiyer, 2004).

Bien que le contenu en amidon en tant que substrat essentiel pour les amylases stimule l'expression du gène bactérien responsable de la production de cette enzyme (Nikitkova *et al.*, 2012), son produit catalytique, le glucose, exerce un effet répressif sur la synthèse enzymatique en inhibant la transcription du gène de l'amylase (Buonocore *et al.*, 1976 ; Srivastava et Mathur, 1984). Ce mécanisme permet à la cellule de réguler efficacement l'utilisation de ses ressources énergétiques (Hill *et al.*, 1997). En présence de glucose, qui est une source d'énergie facilement utilisable, la cellule réprime la production de l'enzyme qui dégrade l'amidon, évitant ainsi une dépense énergétique inutile pour produire des enzymes dont le produit final est déjà disponible. Ce type de répression métabolique est avantageux en termes d'économie cellulaire et d'adaptation aux fluctuations des ressources disponibles dans l'environnement (Salahuddin, 2011 ; Singh *et al.*, 2008).

Par contre, certaines bactéries peuvent également produire cette enzyme en absence d'amidon, ce qui suggère que la production d'amylase par ces microorganismes est constitutive (Chandra *et al.*, 1980). Cette production chez certaines bactéries signifie que cette enzyme est produite en continu, indépendamment de la présence de son substrat spécifique (dans ce cas l'amidon) ou même en absence de toute source de carbone externe. Cette production continue pourrait être le résultat de facteurs génétiques qui maintiennent l'activation des gènes codant pour l'amylase, ce qui peut être un avantage pour les bactéries présentes dans des environnements dépourvus d'amidon ou de tout autre substrat pour l'amylase (Sánchez et Quinto, 1975).

Cependant, dans notre cas la production des amylases par les 8 isolats a été effectuée sur le même milieu BN, malgré que les 8 isolats ont eu les mêmes conditions pour produire leurs amylases, elles ont montré des différences dans l'activité des amylases entre les 8 isolats.

5. Caractérisation physico-chimique des amylases des surnageants des isolats bactériens

Pour caractériser l'activité amylasique des isolats bactériens, l'influence du pH et de la température sur cette activité ont été testés.

5.1 Influence du pH sur l'activité amylasique des surnageants des isolats bactériens

L'effet du pH sur l'activité enzymatique de l'amylase chez les 8 isolats a été évalué en remplaçant le tampon phosphate 0,1 M à pH 7 (neutre) par un tampon phosphate 0,1 M à pH 6 (acide) et un tampon phosphate 0,1 M à pH 8 (basique).

La figure suivante représente les résultats obtenus pour les surnageants de chaque isolat.

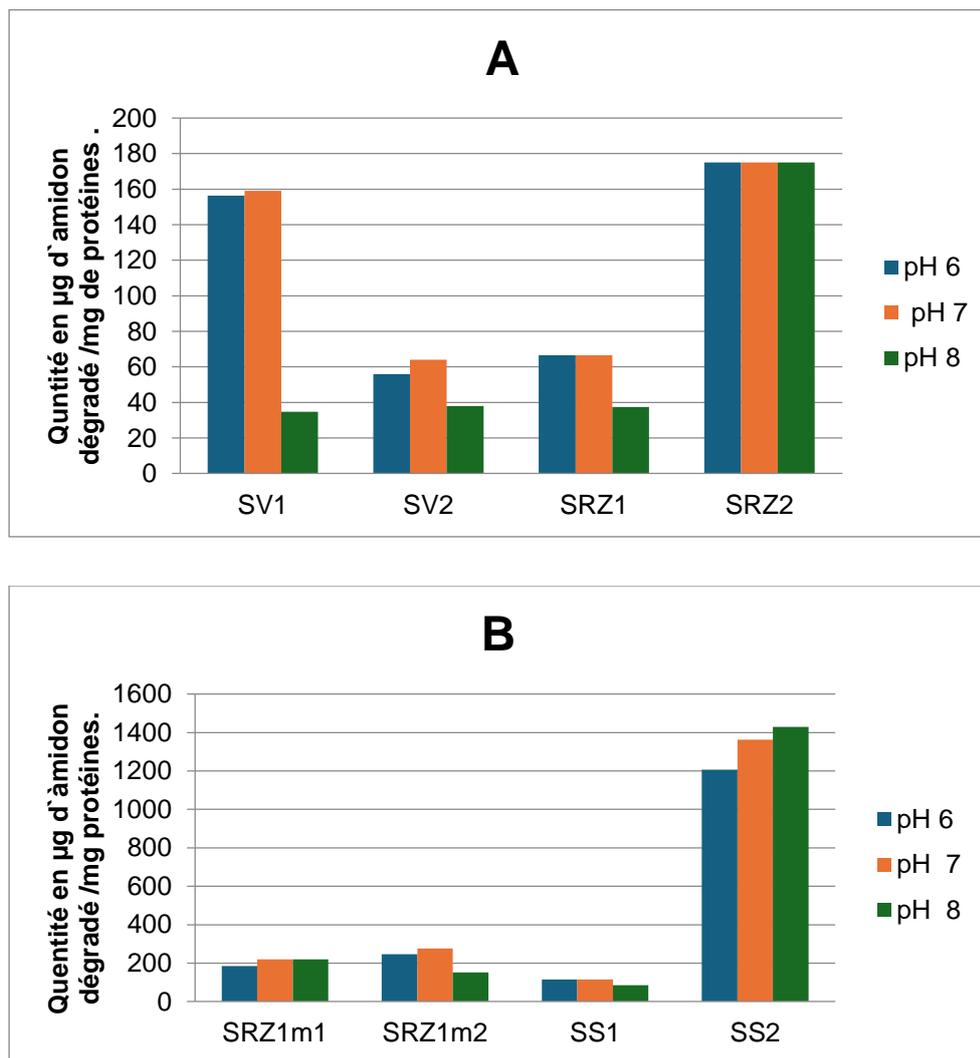


Figure 14 : résultats de l'effet du pH sur l'activité amylasique des surnageants des différents isolats.

(A) : Les isolats SV1 ,SV2, SRZ 1 et SRZ 2 ;

(B) : les isolats SRZ 1m 2 ,SRZ 1m 2, SS1 et SS2.

Résultats et discussions

Les résultats obtenus montrent une influence du pH sur l'activité amylasiques des surnageants des 8 isolats.

Pour les surnageants des isolats SV1, SV2, et SRZ1, l'activité amylasique est maximale aux pH 6 et pH 7 (**Figure 14 A**) et elle diminue au pH 8.

Pour le surnageant de l'isolat SRZ2, une activité optimale est notée aux pH 6, 7 et 8, l'activité amylasique du surnageant de cet isolat ne semble pas être affectée par les pHs testés.

Le surnageant de l'isolat SRZ1m1 présente une activité maximale de l'amylase aux pH 7 et 8, avec une réduction de cette activité au pH 6. L'activité de l'amylase dans le surnageant de l'isolat SRZ1m2 est optimale à pH 7, cette activité est moins élevée aux pH 6 et 8. Le surnageant de l'isolat SS1 affiche une activité amylasique optimale aux pH 6 et 7, et une activité réduite au pH 8.

Enfin, l'activité amylasique du surnageant de l'isolat SS2 ne semble pas être affectée par les pHs testés, en effet, les amylases de cet isolats sont à leurs optimums d'activités à pH 8, mais gardent aussi de très bonnes activités aux pHs 6 et 7.

D'après les résultats de l'influence de pH, les amylases de tous les isolats présentent une activité optimale à un pH neutre de 7, sauf celles de l'isolat SS2 qui sont optimales à un pH basique de 8. Ce résultat est en corrélation à l'étude de Lu *et al* en 2016 qui montrent que l'amylase provenant de *Bacillus pseudofermus*, ont une activité spécifique optimale à un pH de 7, ce qui la rend utile dans les secteurs des textiles et des détergents.

À un pH acide de 6, les amylases de tous les isolats à l'exception de celles de l'isolat SS2, montrent une activité supérieure ou équivalente à celle observée à un pH basique de 8. L'activité de l' α -amylase à un pH bas présente un intérêt majeur pour les usages industriels (Sajedi *et al.*, 2005), par exemple les travaux de Zafar et ses collègues en 2019, ont montré que l' α -amylase thermostable extraite de *Thermotoga petrophila*, est efficace dans l'industrie textile en raison de son activité maximale à un pH de 6,5.

Par contre, les amylases de l'isolat SS2, sont plus actives à un pH basique de 8 qu'à pH acide de 6. Cela est parfaitement similaire avec l'étude menée par Al-dhabi *et al.*, en 2020 qui révèle que l'amylase extraite de la souche *Streptomyces* sp est particulièrement active à un pH basique de 8. Cette enzyme est mise en avant pour son potentiel d'application dans la production de divers produits, notamment dans les secteurs de l'industrie alimentaire et de la

production de biocarburants. Aussi, selon l'étude de Kherouf *et al.*, en 2021, les amylases produites par la souche thermophile *Actinomadura keratinilytica sp* CPT 29 présentent leur meilleure activité à un pH optimal alcalin de 8. Cette caractéristique les positionne comme un nouvel additif potentiel pour les formulations de détergents.

De plus, outre le pH optimal à pH neutre de 7, les amylases des isolats SRZ2, SRZ1 et SS1 affichent également un pH optimal acide de 6, une constatation qui est similaire aux conclusions d'autres études comme celle réalisée par Ammar et ces collègues en 2002, qui ont identifié un pH optimal entre 6,0 et 7,0 pour l' α -amylase de *Streptomyces sp*.

Enfin, il apparaît que l'amylase de l'isolat SRZ2 n'est pas affectée par les variations de pH, montrant une activité constante aux trois pH testés : acide, neutre et basique. Cette propriété rend l'amylase de SS2 particulièrement adaptée pour des applications industrielles nécessitant des conditions de pH variées, qu'elles soient acides, neutres ou basiques. Le même cas selon l'étude de Enez en 2021, qui montre que l' α -amylase purifiée de *Bacillus sp*, fonctionne de manière optimale à des pH de 6.0, 7.0 et 8.0, la rendant appropriée pour les industries du textile et des détergents.

Les résultats obtenus montrent que le pH a une influence sur l'activité de certaines amylases, ceci peut être expliqué par le fait que le changement du pH peut conduire à une modification du site actif de l'enzyme (Alikhajeh *et al.*, 2007) voire même sa dénaturation, en effet, la modification d'un seul groupement carboxyle peut être associée à une perte totale de l'activité enzymatique (Kochhar et Dua, 1984).

5.2. Influence de la température sur l'activité amylasique des surnageants des isolats bactériens

L'effet de la température sur l'activité enzymatique a été étudié en testant la réaction à différentes températures d'incubation (20, 25, 30, 35 et 40°C).

La figure ci-dessus montre les résultats obtenus pour les surnageants de chaque isolat.

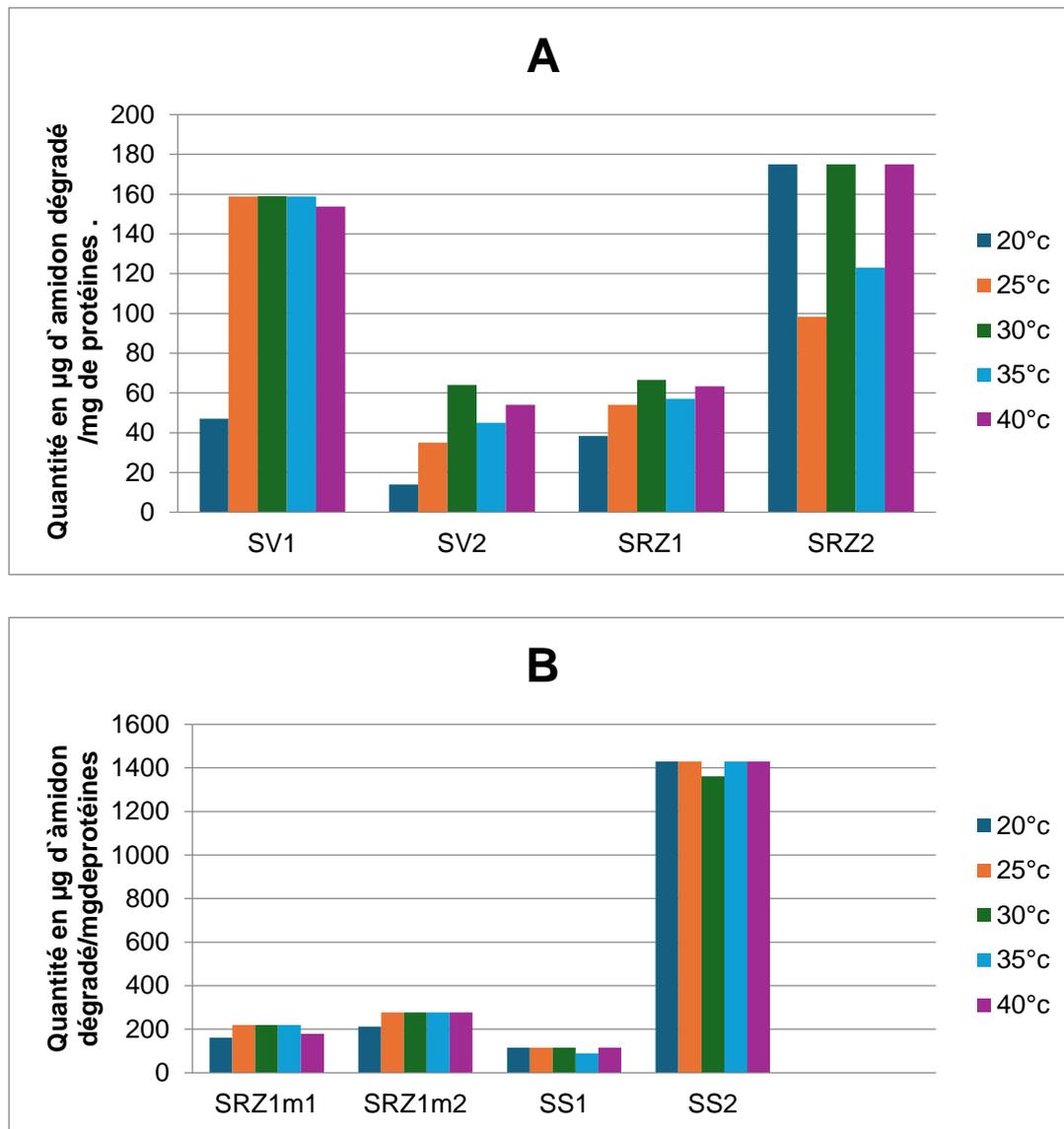


Figure 15 : résultats de l'effet de la température sur l'activité amylasique des surnageants des différents isolats.

(A) : SV1 ,SV2 , SRZ1 et SRZ2 ;

(B) : SRZ 1m 1 , SRZ 1m 2 , SS1 et SS2.

Les résultats obtenus montrent une influence de la température sur l'activité amylasique des surnageants des 8 isolats.

Les activités amylasiques des surnageants des 8 isolats, présentent une très bonne activité à 30°C et elle est même la température optimale de leurs activités amylasiques, sauf pour les amylases de l'isolat SS2 qui n'est pas la température optimale. Cependant, l'activité amylasique du surnageant de l'isolat SS2, ne semble pas être trop affectée par les différentes températures testées, l'activité optimale de ces amylases est observée à toutes les températures testées (20°C, 25°C, 35°C et 40°C) à l'exception de la température 30°C où elle diminue un peu (**Figure 15B**).

Même chose pour les amylases de l'isolat SS1, les températures testées (20°C, 25°C, 30°C et 40°C) n'affectent pas leurs activités, à l'exception de la température 35°C où l'activité est un peu affectée (**Figure 15B**).

Aussi, les amylases de l'isolat SRZ1m2, elles ne semblent pas être trop affectées par les différentes températures testées, l'activité optimale de ces amylases est observée à toutes les températures testées (25°C, 30°C, 35°C et 40°C) à l'exception de la température 20°C, où l'activité est affaiblie (**Figure 15B**).

Les amylases présentes dans le surnageant de l'isolat SV1 fonctionnent de manière optimale aux températures de 25°C, 30 °C et 35 °C, l'activité diminuée un peu à 40 °C et sévèrement affectée à 20°C (**Figure 15A**).

Pour les isolats SV2 et SRZ1, leurs activités amylasiques sont optimales à 30°C, tandis que leurs efficacité diminue aux autres températures et elles sont plus sévèrement affectées à la température de 20°C. Les amylases provenant de l'isolat SRZ2 atteignent leurs optimal d'activité à 20°C, 30°C et 40°C, et elles sont réduites à 25°C et 35°C (**Figure 15A**). L'enzyme de l'isolat SRZ1m1 atteint un optimum d'activité amylasique à 25°C, 30°C et 35°C, mais elle est moins performante à 20°C et 40°C (**Figure 15 B**).

Selon les résultats obtenus (**Figure 15**), beaucoup des amylases, comme celles de SV1, SRZ 1m 1 , SRZ 1m 2 , SS1 et SS2 ne semblent pas être trop affectées par les changements de température. Des résultats similaires ont été trouvés par l'étude de Aygan *et al.*, en 2008, qui

Résultats et discussions

ont montré que les variations de température entre 20°C et 90°C n'ont qu'un faible impact sur l'activité des amylases issues de *Bacillus* sp, qui restent actives dans cette gamme de températures.

Selon nos résultats, certaines amylases semblent avoir plusieurs températures optimales, ceci a été montré par une étude menée par Areekijserree *et al* en 2004, sur les enzymes amylases extraites des moules nacrées, qui ont montré une température optimale à 45°C, 55°C, 65°C et 60°C.

À une température ambiante de 30°C, les amylases de 7 isolats sur 8 affichent une activité optimale, à l'exception de celle de l'isolat SS2 mais son activité reste importante à 30°C. Une activité optimale à 30°C pour les amylases a été démontrée, par exemple les études de Samanta *et al.*, en 2013, ont montré que 30°C est la température optimale pour l'activité enzymatique des amylases extraites à partir des souches bactériennes *Cronobacter sakazakii* Jor52 (C2). Aussi l'étude de Affifi *et al* en 2008, a montré que l'activité optimale des α -amylases extraites à partir du champignon *Penicillium alsonii* est enregistré à une température de 30°C.

À 20°C, les amylases des isolats SRZ2 et SS2 montrent une activité optimale, ce qui est conforme aux résultats de l'étude de Lee *et al* en 2016 sur les α -amylases issues de *Bifidobacterium* qui présentent une activité optimale à 20°C.

À 25°C, les amylases des isolats SV1, SRZ 1m1, SRZ 1m2, SS1 et SS2 exhibent une activité optimale, un résultat similaire à celui de l'étude d'Applebaum et ses collègues en 1961 sur les amylases extraites du tube digestif des larves de *Tenebriomolitor* qui affichent une activité optimale aussi à 25°C.

À 35°C, les amylases des isolats SV1, SRZ 1m1, SRZ 1m2 et SS2 présentent également une activité optimale, indiquant que ces amylases partagent deux températures optimales communes, à 25°C et à 35°C. L'étude de Behel *et al.*, en 2006, montre également une température optimale de 37°C pour l'activité des amylases extraites à partir de *Bacillus* sp.

Enfin, à 40°C, les amylases des isolats SRZ2, SRZ 1m2, SS1 et SS2 sont optimales. L'étude de Dahiya et Rhathi en 2015 a identifié une température optimale de 40°C pour l'activité enzymatique des amylases extraites à partir de *Bacillus licheniformis*. L' α -amylase destinée à une utilisation dans l'industrie des détergents devrait avoir une température optimale de 40 à 60°C (Dahiya et Rhathi, 2015).

5.3. Test de thermostabilité des amylases des surnageants des isolats bactériens

Ce test a été effectué pour examiner la thermostabilité des amylases présentes dans le surnageant de 8 isolats, après traitement thermique à 90°C pendant 1h et 2h. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante

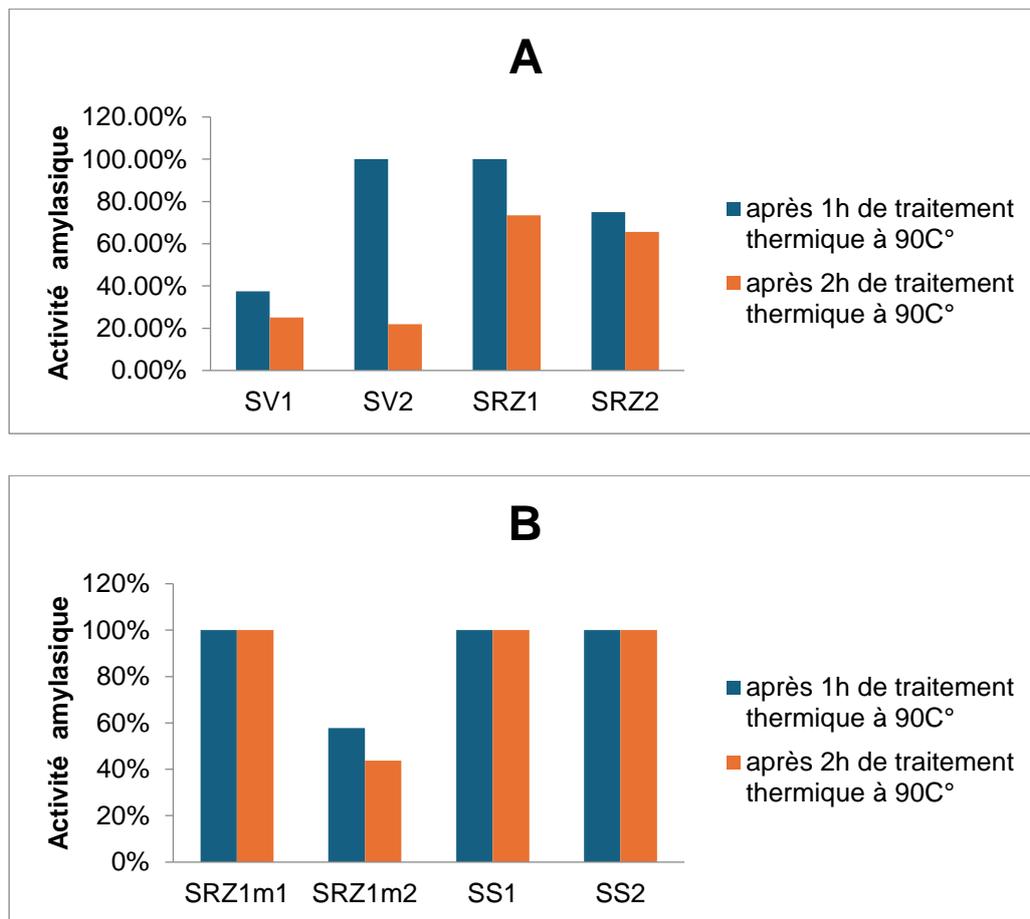


Figure 16: résultats de test de thermostabilité obtenus après 1h et 2h de traitement thermique.

Les résultats obtenus révèlent que, après 1h de traitement à 90°C, les amylases du surnageant de l'isolat SV1 ont préservé 37,49 % de leurs activités initiales, ensuite, cette activité a décliné à 25 % suite à une exposition prolongée de 2h à 90°C. Cependant, les

amylases de l'isolat SV2, isolés à partir du même sol que l'isolat SV1, sont restées intactes (à 100 %) après 1h de traitement thermique, toute fois, lors de la seconde heure, l'activité de l'enzyme a fortement baissé, ne maintenant que 21,81 % de son activité initiale (**Figure 16 A**).

Concernant les amylases du surnageant de l'isolat SRZ1, elles ont conservé une activité optimale de 100 % après la 1^{ère} heure de traitement, et 73,43 % après la 2^{ème} heure du traitement thermique. Les amylases du surnageant de l'isolat SRZ2, quant à elle, a conservé 75 % de son activité après la 1^{ère} heure de traitement et 65,62 % après la 2^{ème} heure du traitement thermique (**Figure 16 A**).

L'activité amyliasique du surnageant de l'isolat SRZ 1m1 est restée stable à 100 %, tant après 1 h, qu'après 2 h de traitement thermique. Cependant, les amylases de l'isolat SRZ1m2 ont maintenu 57,81 % de leurs activités après 1h de traitement et 43,74 % après 2h de traitement (**Figure 16 B**).

Enfin, les amylases trouvées dans les surnageants des isolats SS1 et SS2 ont montré une remarquable stabilité, maintenant une activité constante de 100 % tant après 1h que 2h de traitement thermique (**Figure 16 B**).

L'analyse des résultats nous a permis de constater qu'il y a des variations dans la capacité des enzymes des 8 isolats à conserver leur activité initiale après 1h de traitement thermique à 90°C, cependant, La plupart des amylases ont réussi à préserver leurs activités à 100 % (celles des isolats SRZ1m1, SS1, SS2, SRZ1 et SV2) (**Figure 16**). Ceci est compatible avec les expériences menées par Morgan et Priest en 1981 qui ont montré que les amylases produites par *Bacillus licheniformis* maintient son activité initiale à 98 %. Après 1h de traitement à une température de 85°C .

Tandis que d'autres amylases ont montré une conservation d'activité moins efficace (celles des isolats SRZ1m2, SRZ2 et SV1) (**Figure 16**). Cette instabilité de l'enzyme pendant le traitement thermique peut être due à une distorsion de la structure protéique (Ouahidi *et al.*, 2011), en effet, selon Szász (1974), la température diminue l'affinité des enzymes pour leurs substrats et affecte le site actif de l'enzyme avant leur dénaturation. Ceci est soutenu par d'autres études comme celle de Saito et Yamamoto en 1975, sur une α -amylase stable à la température de *Bacillus licheniformis* indiquant que cette enzyme perdait rapidement son activité à des températures supérieures à 76°C et n'était pas stable à 75°C au-delà de 5 min

Résultats et discussions

Certaines amylases, après 2h de traitement thermique à 90°C, Ils n'ont pas pu maintenir une activité satisfaisante (celles des isolats SRZ1m2, SV1 , SV2 ,SRZ1, SRZ2) alors que d'autres (celles de SRZ1m1, SS1 et SS2) ont réussi à conserver leur activité intacte même après 2h de traitement. Ceci a été démontré par les recherches menées par Kishnan et Chandra, en 1983, qui ont confirmé que l'enzyme α -amylase reste active même après 3h d'incubation à une température de 80°C. Aussi selon Al-Quadani *et al.*, en 2009 ; Das *et al.*, en 2004 et Valaparla, en 2010, une stabilité à 100% a été observée pour les amylases de diverses espèces de *Bacillus* à des températures plus élevées.

La réduction de l'activité enzymatique à des températures élevées est due à la dénaturation de l'enzyme (Saboury *et al.*, 1999), aussi les températures élevées peuvent entraîner des modifications à la conformation de l'enzyme, l'empêchant de se lier correctement au substrat (Mahdavi *et al.*, 2011). De ce fait, pour des applications industrielles nécessitant l'utilisation de hautes températures, il est préférable d'utiliser des enzymes ayant une meilleure thermostabilité (Vieille et Zeikus, 2001). Cela souligne l'importance de choisir ou de développer des enzymes plus résistantes pour des processus tels que la dégradation de l'amidon, où des températures élevées sont souvent nécessaires pour accélérer les réactions et minimiser les risques de contamination microbienne (Meghati *et al.*, 2017).

Ainsi, la capacité des amylases à conserver leurs activités catalytiques à des températures élevées offre des avantages notables dans plusieurs secteurs industriels (Behal *et al.*, 2006). Par exemple, dans l'industrie des détergents, les amylases bactériennes sont efficaces, et les amylases thermostables sont utilisées pour éliminer les tâches difficiles (Niyonzima et More, 2014).

L'objectif de notre travail est de rechercher et caractériser des amylases à intérêt industriel chez 8 isolats bactériens provenant de divers types de sols. **Le Tableau 7** récapitule les différents résultats obtenus de cette étude. Ces résultats montrent la présence d'activité amylasique chez les 8 isolats testés. Cependant, chaque amylase des isolats testés présentent des caractéristiques distinctes (la vitesse initiale de dégradation de l'amidon, le pH optimal, la température optimale et la thermostabilité). Certaines de ces amylases possèdent des propriétés qui les rendent particulièrement adaptées à des applications industrielles, comme résumé dans le tableau suivant

Tableau 7 : tableau récapitulatif des résultats de la recherche et de la caractérisation des amylases chez les 8 isolats bactériens.

Isolats	Activité enzymatique			Thermostabilité de l'enzyme	
	Vitesse initiale	pH optimal	Température optimale	1h	2h
SV1	14.095 µg/min	7	25°C /30°C/35°C	Faible	Faible
SV2	6.44 µg/min	7	30°C	Forte	Faible
SRZ1	10.787 µg/min	6 et 7	30°C	Forte	Forte
SRZ2	38.706 µg/min	6, 7 et 8	20°C/ 30°C/ 40°C	Forte	Moyenne
SRZ1m 1	16.001 µg/min	7 et 8	25°C/30°C / 35°C	Forte	Forte
SRZ1m 2	18.031 µg/min	7	25°C/30°C/ 35°C/ 40°C	Moyenne	Moyenne
SS1	12.169 µg/min	6 et 7	20°C/25°C/30°C/ 40°C	Forte	Forte
SS2	55.514 µg/min	8	20°C/25°C/35°C/ 40°C	Forte	Forte

Comme mentionné dans la partie bibliographique, les amylases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons glycosidiques internes présentes dans l'amidon (Quax, 2006). Ces enzymes sont largement utilisées dans diverses industries, notamment l'industrie alimentaire, textile, papetière et des détergents (Khannous *et al.*, 2014).

Selon le **Tableau 7**, qui résume les différentes caractéristiques des amylases produites par les différents isolats, celles des isolats **SRZ1**, **SRZ2**, **SRZ 1m1**, **SS1**, **SS2** (qui sont montrées en gras dans le tableau), elles attirent plus l'attention que les autres en raison de leurs caractéristiques particulièrement recherchées dans le domaine industriel (plusieurs pH optimaux, plusieurs températures optimales, une forte thermostabilité)

Les résultats de cette étude (**Tableau 7**) montrent que les amylases des 8 isolats sont dotées d'une excellente activité à pH 7 et d'une bonne activité à pH 6, ce qui leur donne la possibilité d'être appliquées dans des industries qui nécessitent un pH neutre et/ou un pH acide telles que les industries du textile, alimentaires et des détergents (Lu *et al.*, 2016 ; Zafar *et al.*, 2019).

Pour les amylases avec une activité optimale à pH 8 peuvent être appliquées dans les industries nécessitant un pH basique, comme les industries alimentaires et les industries de détergents (Al-dhabi *et al.*, 2020 ; Kherouf *et al.*, 2021).

Exceptionnellement, les amylases produites par l'isolat SRZ2, qui ont maintenu une stabilité de leurs activités aux différents pHs testés leur permet d'être utilisées dans diverses applications industrielles, telles que l'industrie du textile, des détergents, du papier et l'industrie pharmaceutique (Miao *et al.*, 2021 ; Souza et Mgalhaães, 2010).

Concernant les températures optimales, selon les résultats résumés dans **Tableau 7**, les amylases de la majorité des isolats ont montré une bonne activité à 30°C, ce qui les rend efficaces pour éliminer les taches de chocolat lorsqu'elles sont combinées à un détergent commercial (Saini *et al.*, 2017), de plus certaines des amylases sont dotées d'une activité élevée voire même optimale à 40 °C, les rendant ainsi adaptées à être utilisées dans des processus industriels tels que les industries des détergents (Carrasco *et al.*, 2017).

Concernant la thermostabilité, les amylases stables aux températures élevées sont des enzymes très polyvalentes pour diverses applications industrielles. Leur résistance à ces conditions extrêmes, les rend adaptées aux industries du textile, du papier, de l'alimentation, de l'agriculture et des détergents (Arıkan, 2008). Selon les résultats résumés dans le **tableau 7**, certaines amylases (SRZ1, SRZ1m1, SS1, SS2) présentent une stabilité qui persiste jusqu'à 2 h de traitement thermique à 90°C, ce qui les rend utilisables dans diverses industries telles que l'industrie des détergents pour éliminer les taches tenaces (Niyonzima et More, 2014). Elles peuvent également être utilisées dans l'industrie alimentaire (Srivastava, 1991), dans l'industrie du textile pour éliminer l'amidon des tissus en coton (Aggarwal *et al.*, 2019), et dans les industries de l'éthanol et pharmaceutiques en raison de leur résistance à la dénaturation (Azad *et al.*, 2009 ; Abdel-Mageed *et al.*, 2019).

Pour les amylases ayant une activité amylasique moyenne à faible ou perdant leur

Résultats et discussions

stabilité comme même être utiles dans l'industrie de la boulangerie et la fabrication du glucose (Lee *et al.*, 2006).

Conclusion et perspectives

conclusion et perspective

Dans cette étude une recherche et une caractérisation ont été effectuées sur l'activité amylasique à importance industrielle de 8 isolats bactériens récupérés à partir de différents sols :sol vierge (SV1 et SV2) sol rhizosphérique,(SRZ1 et SRZ2), sol rhizosphérique à 1m de distance de la végétation (SRZ1m1 et SRZ1m2) et un sol salin (SS1 et SS2).

Ensuite, les amylases ont été recherchées par étude de la capacité des surnageants des 8 isolats à dégrader l'amidon. Une fois leurs activités détectées, ces amylases ont été caractérisées par dosage de leurs activités à différents pHs (6, 7 et 8) et à différentes températures (20°C, 25°C, 30°C, 35°C et 40°C). Ensuite, la thermostabilité de ces amylases a été étudiée par le dosage de l'activité résiduelle après traitement thermique à 90°C pendant 1h et 2h.

- Les résultats ont montré que les surnageants des 8 isolats sont capables de dégrader l'amidon, c'est-à-dire qu'ils sont dotés d'une activité amylasique.
- Ces capacités de dégradation de l'amidon ainsi que leurs vitesses initiales diffèrent selon le surnageant de chaque isolat, les amylases produites par l'isolat SS2 ont le taux d'activité le plus élevé.
- La majorité des enzymes amylases ont montré bonne activité à pH7 et à une température optimale de 30°C, cependant, différentes valeurs d'activité enzymatique ont été obtenues, lorsque les pHs ou les températures des réactions ont été changées.
- Les amylases des différents isolats montrent une bonne stabilité après 1h de traitement thermique à 90°C, à l'exception de l'enzyme de l'isolat SV1. Après 2 heures de traitement thermique, Les amylases des isolats SRZ1, SRZ1m1, SS1 et SS2 ont maintenu leurs stabilité, celles des isolats SRZ2 et SRZ1m2 se sont affaiblies et celles des isolats SV1 et SV2 se sont fortement affectées.

Ces résultats montrent que certaines des amylases possèdent des propriétés qui leurs ouvrent la possibilité d'être utilisées en industrie.

D'autres travaux peuvent être effectués pour compléter ce travail comme par exemple

conclusion et perspective

- Identifier les gènes qui codent pour ces amylases et grâce aux progrès de la biotechnologie, il est possible de modifier ces gènes afin d'accroître leurs résistance aux conditions extrêmes et d'augmenter leurs productivité en un temps réduit.
- La purification des amylases (précipitation au sulfate d'ammonium, le dialyse, et la précipitation à l'acétone) à partir des surnageants de chaque isolat pour mieux les caractériser et étudier leurs stabilité face aux changements de température ou de pH, et en présence de facteurs affectant son activité tels que la présence des sels (CaCl_2 et NaCl) et la présence de métaux lourds... etc.
- Tester la possibilité d'application de ces amylases dans différents secteurs industriels tels que le secteur pharmaceutique, alimentaire ou encore le secteur de l'industrie détergent.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abdel-Fattah, Y. R., Soliman, N. A., El-Toukhy, N. M., El-Gendi, H., & Ahmed, R. S. (2013).** Production, purification, and characterization of thermostable α -amylase produced by *Bacillus licheniformis* isolate AI20. *Journal of Chemistry*, 2013.
- **Abdel-Mageed, H., Radwan, R., Abuelezz, N., Nasser, H., Shamy, A., Abdelnaby, R., & Gohary, N. (2019).** Bioconjugation as a smart immobilization approach for α -amylase enzyme using stimuli-responsive Eudragit-L100 polymer: a robust biocatalyst for applications in pharmaceutical industry. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47, 2361-2368.
- **Abdullah, R., Naeem, N., Aftab, M., Kaleem, A., Iqtedar, M., Iftikhar, T., & Naz, S. (2018).** Enhanced production of alpha amylase by exploiting novel bacterial co-culture technique employing solid state fermentation. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 42, 305-312.
- **Adeniran, H., Abiose, S., & Ogunsua, A. (2010).** Production of Fungal β -amylase and Amyloglucosidase on Some Nigerian Agricultural Residues. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 693- 698.
- **Affifi AF, Kamel EM, Foaad MA, Fwwzi EM, Housay MM. (2008).** Purification and Characterization of alpha amylase from *pencillium olsonii* under the effect of some Antioxidents vitamins. *Glob. I. J of Biotech.*,3(1),14-21.
- **Aggarwal, R., Dutta, T., & Sheikh, J. (2019).** Extraction de l'amylase du micro-organisme isolé des effluents d'usines textiles vis-à-vis du désencollage du coton. *Chimie et pharmacie durables*, 14, 100178.
- **Ahmad, R., Jaafar, N., Manas, N., Azelee, N., Illias, R., & Nawawi, N. (2019).** BIOCONVERSION OF STARCH TO MALTOOLIGOSACCHARIDES (MOS) BY THE REACTION OF MALTOGENIC AMYLASE. , 82.
- **Aiyer, P. D. (2004).** Effect of C: N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. *African Journal of Biotechnology*, 3(10), 519-522.
- **Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., Arasu, M. V., Duraipandiyan, V., & Ponmurugan, K. (2020).** Isolation and purification of starch hydrolysing amylase from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 obtained from the Jazan region of Saudi Arabia with industrial applications. *Journal Of King Saud University-Science*, 32(1), 1226-1232.

Références bibliographiques

- **Alikhajeh, J., Khajeh, K., Naderi-Manesh, M., Ranjbar, B., Sajedi, R., & Naderi-manesh, H. (2007).** Analyse cinétique, études structurelles et prédiction des valeurs pKa de l' α -amylase de Bacillus KR-8104 : les déterminants du profil d'activité pH. *Technologie enzymatique et microbienne*, 41, 337-345.
- **Alpers, D., & Solin, M. (1970).** The characterization of rat intestinal amylase. *Gastroenterology*, 58(6), 833-842.
- **Al-Quadan, F., Akel, H. and Natshi, R. (2009).** Characteristics of a novel highly thermostable and Extremely thermophilic alkalitolerant amylase from Hyperthermophilic Bacillus strain HUTBS7J. *Online Journal of Biological Sciences* 9 : 67-74.
- **Alrumman, S., Yasser, S., Mostafa, M., Al-Qahtani, S., Tarek, H &Taha, T. (2018).** Hydrolytic Enzyme Production by Thermophilic Bacteria Isolated from Saudi Hot Springs. *Open Life Sci*, 13 : 470-480.
- **Ammar, Y.B., Matsubara, T., Ito, K. (2002).** Nouveau schéma d'action d'une α -amylase formant du maltose provenant de Streptomyces sp. et son application possible en boulangerie. *Journal de biochimie et de biologie moléculaire*, 35(6), 568-575.
- **Antranikian, G. (1992).** Microbial degradation of starch. *Microbial degradation of natural products*, 27-56.
- **Applebaum, S. W., Jankovic, M., & Birk, Y. (1961).** Studies on the midgut amylase activity of Tenebrio molitor L. larvae. *Journal of Insect Physiology*, 7(2), 100-108.
- **Aravind, L., and Eugene V. Koonin. (1999).** "DNA polymerase β -like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history." *Nucleic acids research* 27.7 (1999): 1609-1618.
- **Arbige, Michael V., and Wayne H. Pitcher.(1989).** "Industrial enzymology: a look towards the future." *Trends in Biotechnology*, 7.12 .1989: 330-335.
- **Areekijserree, M., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Thongpan, A., Mingmuang, M., Pakkong, P., & Rungruangsak-Torrissen, K. (2004).** Caractéristiques de température et de pH de l'amylase et de la protéinase de la moule perlière d'eau douce adulte, Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus Simpson 1900. **Aquaculture**, 234(1-4), 575-587.

Références bibliographiques

- **Arikan, B. (2008).** Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresource Technology*, 99(8), 3071-3076.
- **Asanuma-Date K, Hirano Y, Le N, Sano K, Kawasaki N, Hashii N, Hiruta Y, Nakayama K, Umemura M, Ishikawa K, Sakagami H, Ogawa H. (2012).** Functional regulation of sugar assimilation by N-glycan-specific interaction of pancreatic α -amylase with glycoproteins of duodenal brush border membrane. *J Biol Chem*. 2012 Jun 29;287(27):23104-18.
- **Ashraf, M.A., Arshad, M.I., Rahman, S., & Khan, A. (2018).** Characterization of moderately thermostable α -amylase-producing *Bacillus licheniformis* from decaying potatoes and sweetpotatoes. *BioResources* 13(3), 4931-4945. DOI: 10.15376/biores.13.3.4931-4945.
- **Assamoi A.A., Destain J., Thonart P. (2009).** Aspects microbiologiques de la production Par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium Canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(2), 281–294.
- **Avwioroko, O. J., Anigboro, A. A., Unachukwu, N. N., & Tonukari, N. J. (2018).** Isolement, identification et analyse in silico du gène de l'alpha-amylase de la souche *Aspergillus niger* CSA35 obtenu à partir de manioc en cours d'altération. *Rapports Biochimie et Biophysique*, 14, 35-42.
- **Aygan, A., Arikan, B., Korkmaz, H., Dinçer, S., & Çolak, Ö. (2008).** Highly thermostable And alkaline α -amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 39, 547-553.
- **Azad, M., Bae, J., Kim, J., Lim, J., Song, K., Shin, B., & Kim, H. (2009).** Isolement et caractérisation d'une nouvelle alpha-amylase thermostable à partir de graines de pin coréen. *Nouvelle biotechnologie*, 26(3-4), 143-149.
- **Baker, F. et Silverton, R. (1976).** PRÉPARATION DES SUPPORTS DE CULTURE. *Technologie de laboratoire médical* , 481-509.
- **Bartoli, F. (1986).** Les cycles biogéochimiques dans les écosystèmes forestiers tempérés. The biogeochemical cycles in temperate forest ecosystems. *Sciences Géologiques, bulletins et mémoires*, 39(2), 195-209.

Références bibliographiques

- **Bebenek. K, TA Kunkel . (2004).** Fonctions des ADN polymérase Av. Chimie des protéines, 69(2004), pages 137 à 165.
- **Behel, A., Singh, M. K., Sharma, M. K., Puri, P. and Batra, N. (2006).** Characterization of alkaline α -amylase from Bacillus sp. AB 04. International Journal of Agricultural Biology 8: 80-83.
- **Bertoldo C, Antranikian G. (2002).** Enzymes hydrolysant l'amidon provenant d'archées et de bactéries thermophiles. Opinion actuelle en biologie chimique , 2002 ; 6 (2) : 151-160.
- **Bhosale, Snehalata H., Mala B. Rao, and Vasanti V. (1996).** Deshpande. "Molecular and industrial aspects of glucose isomerase." Microbiological reviews, 60.2 (1996): 280-300.
- **Bornscheuer, U. T. (2002).** Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. FEMS microbiology reviews, 26(1), 73-81.
- **Bousseboua H. (2002) .** Eléments de Microbiologie Générale. Programmes de Graduation. Editions de l'Université Mentouri. Constantine Algerie .230-231p.
- **Bradford, M. (1976) .** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry [en ligne], 72, 248–254.
- **Brady, P.N., & Macnaughtan, M.A. (2015).** Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: Biases and mechanistic insights. Analytical Biochemistry, 491, 43-51.
- **Bugg, T. D. (2012).** Introduction to enzyme and coenzyme chemistry. John Wiley & Sons.
- **Bukhari, S. I., Al-Agamy, M. H., Kelany, M. S., Al Hazani, M. R., & Hamed, M. M. (2021).** Production optimization using Plackett-Burman and Box-Behnken designs with partial Characterization of amylase from marine actinomycetes. Family. J. Biotechnol., 94 : 137-155.
- **Buonocore, V., Poerio, E., Silano, V. & Tomaso, M. (1976).** Physical and catalytic properties of α -amylase from Tenebrio molitor. Biochem. J., 153: 621-625.
- **Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A., Gülnaz O. (2003).** Enzymatic Properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant

Références bibliographiques

- amylase from An alkaliphilic Bacillus sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem*, 38 : 1397-1403.
- **Carrasco, M., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2017).** Purification and characterization of a novel α -glucosidase from an Antarctic yeast *Dioszegia fristingensis* isolate. *Amylase*, 1, 50-58.
 - **Cernia, E., Milana, G., Ortaggi, G., Palocci, C., & Soro, S. (1998).** Functionalised Cross-Linked Polyvinyl Alcohol As New Matrix For Lipase Immobilization. In *Progress in Biotechnology*, Elsevier, (Vol. 15, pp. 667-671).
 - **Chandra AK, Medda S, Bhadra AK (1980).** Production of extracellular Thermostable alpha amylase by *Bacillus licheniformis*. *J. Ferment. Technol.* 58 : 1 - 10.
 - **Charnock, S. J., & McCleary, B. V. (2005).** Les enzymes: Applications industrielles et analytiques. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle*, 32(116), 11-15.
 - **Chellapandi P. (2010).** Production and preliminary characterisation of alkaline protease from *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. *J. Chem.* 7 (2) : 479-482.
 - **Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Keshwani, D., & Chen, C. (2007).** Potential of agricultural Residues and hay bioethanol production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 142(3), 276-290.
 - **Choi JM, Han SS, Kim HS (2015).** Applications industrielles de la biocatalyse enzymatique : état actuel et aspect futur. *Biotechnologie Adv* 33 : 1443-1454.
 - **Cooper, directeur général (2000).** La cellule : une approche moléculaire. Sunderland (MA) Sinauer Associés. *Structure et organisation des filaments d'actine*.
 - **Cuvier-Péres, A., & Kestemont, P. (2001).** Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24, 279-285.
 - **Dahiya, P. and Rathi (2015).** B.Characterization and application of alkaline α -amylase from *Bacillus licheniformis* MTCC1483 as a detergent additive, *International Food Research Journal* 22(3): 1293-1297.
 - **Damaris, R., Lin, Z., Yang, P., & He, D. (2019).** L'Alpha-Amylase du Riz, Régulateur Conservé de la Maturation et de la Germination des Graines. *Journal international des sciences moléculaires*, 20.

Références bibliographiques

- **Das, K., Ooley, R. and Mukherjee, A. K., (2004).** Purification And biochemical characterization of a thermostable, Alkaliphilic, extracellular alpha amylase from Bacillus Subtilis DM-03, a strain isolated from the traditional Fermented food of India. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 40 : 291-298.
- **Dash, Rahman et Sarker (2015).** Dash BK, Rahman MM, Sarker PK. Identification moléculaire d'un Bacillus subtilis BI19 nouvellement isolé et optimisation des conditions de production pour une production améliorée d'amylase extracellulaire. *BioMed Recherche Internationale*.
- **Date, K., Satoh, A., Iida, K., et amp; Ogawa, H. (2015).** Pancreatic α -Amylase Controls Glucose Assimilation by Duodenal Retrieval through N-Glycan-specific Binding, Endocytosis, and Degradation*. *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 17439-17450.
- **Davet, P. (1996).** Activité des micro-organismes dans les sols et la production végétale. Retrieved from cabdirect.org.
- **De Souza, P. M., & de Oliveira Magalhães, P. (2010).** Application of microbial α -amylase in industry—A review. *Brazilian journal of microbiology*, 41(4), 850.
- **Debnath, T., Kujur, R. R. A., Mitra, R., & Das, S. K. (2019).** Diversity of microbes in hot springs and Their sustainable use. In *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*. Springer, Singapore, 159-186.
- **Desikachar, H. S. R. (1980).** Development of weaning foods with high caloric density and low hot-paste viscosity using traditional technologies. *Food and nutrition bulletin*, 2(4), 21-23.
- **Dienes, D.; Egyhazi, A.; Reczey, K. (2004).** Treatment of recycled fiber with Trichoderma cellulases. *Industrial Crops and Products*, 20, 11-21.
- **Elamary R, Salem WM. (2020).** Optimizing and purifying extracellular amylase from soil bacteria to inhibit clinical biofilm-forming bacteria. *PeerJ*. 2020 Nov 2;8:e10288.
- **El-Aty, A. A. A., & Mostafa, F. A. (2015).** Production and characterization of fungal α -amylase from marine Alternariaalternatautilizinglignocellulosicwastes and its application. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(3), 813-825.

Références bibliographiques

- **El-Fallal, A., Dohara, M.A., El-Sayed, A., & Omar, N. (2012).** Amidon et α -amylases microbiennes : des concepts aux applications biotechnologiques. Dans *Glucides : études approfondies sur la glycobiologie et la glycotechnologie* (pp. 459-488).
- **Elyasi Far, B., Ahmadi, Y., Yari Khosroshahi, A., & Dilmaghani, A. (2020).** Production microbienne d'alpha-amylase : progrès, défis et perspectives. *Bulletin Pharmaceutique Avancé*, 10(3), 350.
- **Elyasi Far, B., Yassin Ahmadi, Ahmad Yari Khosroshahi, & Azita Dilmaghani. (2020).** Production microbienne d'alpha-amylase: progrès, défis et perspectives. *Advances in Pharmaceutical Bulletin*, 10(3), 350-358.
- **Emanuel G., Lorrence H. G.(2009).** *Practical handbook of microbiology*. CRC Press. USA. 13 : 978-0-8493-9365-5.
- **Enez, B. (2021).** Purification et caractérisation de l' α -amylase thermostable de la bactérie du sol *Bacillus* sp. *Lettres de protéines et de peptides* , 28 (12), 1372-1378.
- **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.
- **Ferreira, A., Cahú, T., Xu, J., Blennow, A., & Bezerra, R. (2021).** A highly stable raw starch Digesting α -amylase from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera. *Food Chemistry*, 354, 129513.
- **Fogarty W. M., Kelly C.T. (1994).** *Microbial Enzymes and Biotechnology Applied Science*, London, New York. (43) :71-132p.
- **Fry, J. et Day, M. (1990).** Génétique bactérienne dans les milieux naturels. *Journal d'écologie appliquée* , 29, 261. 4 .
- **Gabriela Vasile, Elena Ciornea (2008),** ÉTUDES EXPÉRIMENTALES SUR L'ACTIVITÉ ALPHA-AMYLASE ET LA STRUCTURE DU SEGMENT MÉDIA DU TRACTUS DIGESTIF CHEZ HYPOPHTALMICHTHYS MOLITRIX DE DIFFÉRENTS ÂGES.
- **Gangwar, P., Alam, S. I., Bansod, S., & Singh, L. (2009).** Bacterial diversity of soil samples from the western Himalayas, India. *Canadian journal of microbiology*, 55(5), 564-577.

Références bibliographiques

- **Garske, A. L., Kapp, G., & McAuliffe, J. C. (2017).** Industrial enzymes and biocatalysis. In Handbook Of industrial chemistry and biotechnology. Springer, Cham, 1571-1638.
- **Gatenby, R. et Frieden, B. (2016).** Enquête sur la dynamique de l'information dans les systèmes vivants à travers la structure et la fonction des enzymes. PLoS ONE , 11. journal.pone.0154867.
- **Gaur, S., Agrahari, S., & Wadhwa, N. (2010).** Purification of protease from *Pseudomonas thermaerum* GW1 isolated from poultry waste site. *The Open Microbiology Journal*, 4, 67.
- **Gianfreda, L. (2015).** Enzymes of importance to rhizosphere processes. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(2), 283-306.
- **Gopaldas, T., Deshpande, S., & John, C. (1988).** Studies on a wheat-based amylase-rich food. *Food and Nutrition Bulletin*, 10(3), 1-5.
- **Gopaldas, T., Deshpande, S., & John, C. (1988).** Studies on a wheat-based amylase-rich food. *Food and Nutrition Bulletin*, 10(3), 1-5.
- **Gopaldas, T., Mehta, P., & John, C. (1988).** La réduction du volume des gruaux de sevrage traditionnels en Inde. *Improving Young Child Feeding in Eastern and Southern Africa: Household Level Food Technology. Ottawa: IDRC*, 375-85.
- **Gopaldas, T., Mehta, P., & John, C. (1988).** La réduction du volume des gruaux de sevrage traditionnels en Inde. *Improving Young Child Feeding in Eastern and Southern Africa: Household Level Food Technology. Ottawa: IDRC*, 375-85.
- **GRANNER D.K., MURRAY R.K., RODWELL V.W.(2008).** Biochimie de HARPER. 3e édition. De Boeck. Bruxelles, pp. 49-51, 483.
- **Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003).** Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- **Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V., & Chauhan, B. (2003).** Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38, 1599-1616.
- **Gurtis T.P., Sloan W.T., Scannell J.W. (2002).** Estimating prokaryotic diversity and its Limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6(99): 10494-10499p.

Références bibliographiques

- **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.
- **Hall, D., Zhu, H., Zhu, X., Royce, T., Gerstein, M., & Snyder, M. (2004).** Regulation of Gene Expression by a Metabolic Enzyme. *Science*, 306, 482 - 484.
- **Hannah, L., & James, M. (2008).** The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms.. *Current opinion in biotechnology*, 19 2, 160-5 .
- **Hasan F, Shah AA, Hameed A. (2006).** Applications industrielles des lipases microbiennes. *Technologie enzymatique microbienne*, 2006 ; 39 : 235-251.
- **Haussner, K., Hilgendor, P., Hofbauer, C., Demeester, J. & Lauwers, A. (1996).** New international F.I.P. method for the determination of the activity of *Aspergillus Oryzae* proteases. *Pharmazie*. 51 (12) : 946-50.
- **Hii SL, Tan JS, Ling TC, Ariff AB. (2012) a.** Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Res*, 2012;2012:921362.
- **Hii, Y. L., Zhu, H., Ng, N., Ng, L. C., & Rocklöv, J. (2012) b.** Forecast of dengue incidence using temperature and rainfall. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(11), e1908.
- **Hill, G., Macdonald, D., & Lang, X.,(1997).** α -Amylase inhibition and inactivation in barley malt during cold starch hydrolysis. *Biotechnology Letters*, 19, 1139-1141.
- **Hitchens, A. (1921).** Avantages des milieux de culture contenant de faibles pourcentages d'agar. *Le Journal des maladies infectieuses* , 29, 390-407.
- **Hmidet N., El Hadj A, N., Haddar A., Kanoun S., Alya S., Nasri M. (2009).** Alkaline Proteases and thermostable α - amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1 :Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*. 47 : 71-79p.
- **Homaei, A., Ghanbarzadeh, M., & Monsef, F. (2016).** Caractéristiques biochimiques et propriétés cinétiques des α -amylases d'organismes marins. *Revue internationale des macromolécules biologiques*, 83, 306-14.
- **Horner-Devine M.C., Leibold M.A., Smith V.H., Bohannon B.J.M. (2003).** Bacterial Diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*. 6(7): 613-622p.

Références bibliographiques

- **Iwatsubo, Motohiro.(1963).** "Potentiel d'oxydoréduction de la d-2-hydroxyacide:(accepteur) oxydoréductase de la levure anaérobie." *Biochimica et Biophysica Acta* 77 (1963): 568-576.
- **Jacobsen, N., Lyche Melvaer, K., & Hensten-Pettersen, A. (1972).** Some properties of salivary amylase: A survey of the literature and some observations. *Journal of Dental Research*, 51(3), 825-832.
- **Jaeger K. E., Eggert T. (2002).** Lipases for biotechnology. *Current opinion in Biotechnology*. 13 :390-397p.
- **Jamil, B., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2007).** Isolement de *Bacillus subtilis* MH-4 du sol et son potentiel de production d'antibiotiques polypeptidiques. *Journal Pakistanais des Sciences Pharmaceutiques*, 20(1), 26-31.
- **Janeček, Štefan.(2005).** "Amylolytic families of glycoside hydrolases: focus on the family GH-57." *Biologia* 60.Suppl 16 (2005): 177-184.
- **Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019).** Cellulases microbiennes: aperçu et applications. *Cellulose*, 22(92).
- **Karp, G. (2010).** Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts et expériences. De Boeck Supérieur.
- **Kelly C.T., Bolton D. J., Fogarty W.M. (1997).** Bi-phasic production of α -amylase of *Bacillus flavothermus* in batch fermentation *Biotechnology*. 19-7:675-677.
- **Khannous, L., Jrad, M., Dammak, M., Miladi, R., Chaaben, N., Khemakhem, B., Gharsallah, N. et Fendri, I. (2014).** Isolement d'une nouvelle souche de *Pseudomonas luteola* productrice d'amylase et de lipase : étude des conditions de production d'amylase. *Lipides dans la santé et la maladie* , 13, 9 - 9.
- **Kherouf, M., Habbeche, A., Benamia, F., Saoudi, B., Kerouaz, B. et Ladjama, A. (2021).** Optimisation statistique d'une nouvelle production d'amylase extracellulaire alcaline et thermostable à partir d'*Actinomadura keratinilytica* sp thermophile. Cpt29 et son application potentielle dans l'industrie des détergents. *Biocatalyse et biotechnologie agricole* , 35 , 102068.
- **Kingsley, L. J., & Lill, M. A. (2015).** Substrate tunnels in enzymes: structure–function relationships and computational methodology. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 83(4), 599-611.

Références bibliographiques

- **Kiran, S., Singh, A., Prabha, C., Kumari, S., & Kumari, S. (2018).** Isolation and characterization of thermostable amylase producing bacteria from hot springs of Bihar, India. *Intl J Pharma Med BiolSci*, 7(2), 28-34.
- **Kochhar, S., & Dua, R. (1984).** An active-site carboxyl group in liquefying alpha-amylase: specific chemical modification. *Bioscience Reports*, 4(7), 613-619.
- **Krishnan, T. et Chandra, A. (1983).** Purification et caractérisation de l'alpha-amylase de *Bacillus licheniformis* CUMC305.. *Microbiologie appliquée et environnementale* , 46 2, 430-7.
- **Kuddus, M. (2017).** Strain improvement studies on *Microbacterium foliorum* GA2 for production of α -amylase in solid state fermentation: Biochemical characteristics and wash performance analysis at low temperatures. *The Journal of general and applied microbiology*, 63(6), 347-354.
- **Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A. (2011)** . Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res*, 2011.
- **Kumar P., Satyanarayana T. (2004).** Aspects biotechnologiques des glucoamylases fongiques thermophiles, dans *Emerging Trends in Mycology, Plant Pathology and Microbial Biotechnology*, eds Bagyanarayana G., Bhadraiah B., Kunwar IK (Hyderabad : BS Publications;), 539-563.
- **Larreta-Garde, V. (1997).** *Enzymes en agroalimentaire.*
- **Lee, H., Jeon, H., Choi, H., Kim, N., Chung, W., Koo, Y., Ko, D., You, S., & Shim, J. (2016).** Characterization and Application of BiLA, a Psychrophilic α -Amylase from *Bifidobacterium longum*.. *Journal of agricultural and foodchemistry*, 64 13, 2709-18 .
- **Lee, S., Mouri, Y., Minoda, M., Oneda, H. et Inouye, K. (2006).** Comparaison de l'alpha-amylase de type sauvage et de ses enzymes variantes chez *Bacillus amyloliquefaciens* en termes d'activité et de stabilité thermique, et aperçu de l'ingénierie de la stabilité thermique de l'alpha-amylase de bacille.. *Journal of biochemistry* , 139 6, 1007-15.
- **Leschine, S. (1995).** Cellulose degradation in anaerobic environments.. *Annual review of microbiology*, 49, 399-426 .
- **Li S, Yang X, Yang S et al (2012).** Prospection technologique sur les enzymes : application, marketing et ingénierie. *Comput Struct Biotechnologie J* 2:1-11.

Références bibliographiques

- **Lu, Z., Wang, Q., Jiang, S., Zhang, G., & Ma, Y. (2016).** La troncature du domaine N-terminal unique a amélioré la thermostabilité et l'activité spécifique de l' α -amylase alcaline Amy703. *Scientific Reports*, 6(1), 22465.
- **Luo, L., Meng, H., & Gu, J. (2017).** Microbial extracellular enzymes in biogeochemical cycling of ecosystems.. *Journal of environmental management*, 197, 539-549 .
- **Mack, D., Siemssen, N., & Laufs, R. (1992).** Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infection and immunity*, 60, 2048-2057.
- **Mahdavi, A., Sajedi, R., Asghari, S., Taghdir, M., & Rassa, M. (2011).** Une analyse de l'adaptation à la température dans les *Bacillus* α -amylases actives au froid, mésophiles et thermophiles. *Revue internationale des macromolécules biologiques*, 49(5), 1038-1045.
- **Mamo G et Gessesse, A. (1999).** Effet des conditions de culture sur la croissance et la production d' α -amylase par un *Bacillus* sp. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 61-65.
- **Mantiri, F. R., Rumende, R. R. H., & Sudewi, S. (2019).** Identification du gène de l' α -amylase par PCR et activité de l' α -amylase thermostable d'*Anoxybacillus thermarum* thermophile isolée de la source chaude de Remboken en Indonésie. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 217, 012045.
- **Marc, J. E. C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002).** Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of biotechnology*, 94(2), 137-155.
- **Martin M.T., Plou F.J., Alcade M., Ballasteros A. (2003).** Immobilization on Eupergit Cof cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of Immobilized biocatalyst, *J. Mol. Catal.* 21 :299-308.
- **Masuda, H., Takahashi, T., & Sugawara, S. (1987).** Purification and properties of starch hydrolyzing enzymes in mature roots of sugar beets. *Plant physiology*, 84(2), 361-365.
- **McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2014).** Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. *The FEBS journal*, 281(2), 583-592.

Références bibliographiques

- **McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2023).** Enzyme nomenclature and classification: The state of the art. *The FEBS journal*, 290(9), 2214-2231. Bancercz R. Przemysłowe zastosowania lipaz [Industrial application of lipases]. *Postepy Biochem*, 2017;63(4):335-341.
- **Megahati, R. R. P., Mansyurdin, Agustien, A., Tjong, D. H. (2017).** Optimization of bacteria amylase activity from *Bacillus licheniformis* strain SEM11. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 2938-2946.
- **Mehta, D., & Satyanarayana, T. (2016).** α -amylases bactériennes et archéennes : diversité et amélioration des caractéristiques souhaitables pour les applications industrielles. *Frontières en microbiologie*, 7, 210297.
- **Meier, H., & Reid, J. (1982).** Reserve Polysaccharides Other Than Starch in Higher Plants. , 418-471.
- **Meunier, N. (1999).** Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à Partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. 168 pages.
- **Miao, H., Jiang, R., Han, N., Yu, M., Wu, Q., Mu, Y., & Huang, Z. (2021).** Enhanced extracellular expression of α -Amylase DL3-4-1 in *Bacillus subtilis* via systematic screening of optimal signal peptides. *Process Biochemistry*, 108, 176-184.
- **Milner, J. A., Martin, D. J., & Smith, A. (1997).** Two-stage inocula for the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and microbial technology*, 21(5), 382-386.
- **Misslin, R. (2003).** Une vie de cellule: Forme et espace. *Revue de synthèse*, 124, 205-221.
- **Mitidieri S., Souza Martinelli AH, Schrank A., Vainstein MH. (2006).** Formulation de détergent enzymatique contenant de l'amylase d' *Aspergillus niger* : une étude comparative avec des formulations de détergents commerciales. *Technologie des bioressources*, 2006 ; 97 : 1217-1224.
- **Mohamed, S. A., Azhar, E. I., Ba-Akdah, M. M., Tashkandy, N. R., & Kumosani, T. A. (2011).** Production, purification et caractérisation de l' α -amylase de *Trichoderma harzianum* cultivée sur écorce de mandarine. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 930-940.

Références bibliographiques

- **Mojsov, Kiro (2011).** Application of enzymes in the textile industry: a review. In: II International Congress "Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry", Proceedings, 2011, 09-11 March, pp.230-239.
- **Morel, F., Rousset, F., Nguyen, M. V. C., Trocme, C., Grange, L., et Lardy, B.(2015).** La NADPH oxydase Nox4, une cible thérapeutique potentielle dans l'arthrose. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 199(4_5), 673-687.
- **Morgan, F. J., & Priest, F. G. (1981).** Characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. Journal of Applied Bacteriology, 50(1), 107-114.
- **Mosha, A. C., & Svanberg, L. (1983).** Preparation of weaning foods with high nutrient density using flour of germinated cereals. Food and Nutrition Bulletin, 8(1), 10-14.
- **Mukhtar, S., Shahid, I., Mehnaz, S., & Malik, K. A. (2017).** Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum*L). Microbiological research, 205, 107-117.
- **Nag, A., Lunacek, M., Graf, P., & Chang, C. (2011).** Kinetic modeling and exploratory numerical simulation of chloroplastic starch degradation. BMC Systems Biology, 5, 94 - 94.
- **Naik B, Kumar V, Goyal SK, Dutt Tripathi A, Mishra S, Joakim Saris PE, Kumar A, Rizwanuddin S, Kumar V, Rustagi S. (2023).** Pullulanase: unleashing the power of enzyme with a promising future in the food industry. Front Bioeng Biotechnol, 2023 Jun 28;11:1139611.
- **Nakamura, H.; Kubota, H.; Kono, T.; Isogai, A.; Onabe, F. (2001).** Modification of pulp properties by cellulase treatment and application of cellulase to wastepaper deinking and mechanical pulp refining. In: 68th Pulp and Paper Research Conference. Proceedings of the Pulp and Paper Research Conference, 18-19/06, Japan, p. 2-5.
- **Nannipieri, P. (2006).** Role of Stabilised Enzymes in Microbial Ecology and Enzyme Extraction from Soil with Potential Applications in Soil Proteomics. , 75-94.
- **Nielsen J. E. and Borchet T. V. (2000).** Biochim. Biophys. Acta. 1543 : 253-274p.
- **Nigam, P. S. (2013).** Enzymes microbiennes aux caractéristiques particulières pour les applications biotechnologiques. Biomolécules, 3(3), 597-611.

Références bibliographiques

- **Nikitkova, A., Haase, E., & Scannapieco, F. (2012).** Effect of starch and amylase on the expression of amylase-binding protein A in *Streptococcus gordonii*. *Molecular oral microbiology*, 27 4, 284-94 .
- **Niyonzima, F. et More, S. (2014).** Detergent-Compatible Bacterial Amylases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174, 1215-1232.
- **Ouahidi, I., Barakat, A., El Hamsas, A. E. Y., & Aarab, L. (2011).** Variation de l'immunoréactivité des IgE et des IgG vis-à-vis des gliadines sous l'effet du pH et de la température. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 26(2), 68-75.
- **Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000).** Review-Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31, 135-152.
- **Parales, R., & Haddock, J. (2004).** Biocatalytic degradation of pollutants.. *Current opinion in biotechnology*, 15 4, 374-9 .
- **Penna, Claudia, Maria-Giulia Perrelli, and Pasquale Pagliaro. (2013).** "Mitochondrial pathways, permeability transition pore, and redox signaling in cardioprotection: therapeutic implications." *Antioxidants & redox signaling* , 18.5 (2013): 556-599.
- **Perez, E. (1990).** Les formulations successives du savoir: le concept de récepteur et le modèle clé-serrure. *Aster: Recherches en didactique des sciences expérimentales*, 10(1), 97-128.
- **Pervin, M., Jahan, H., Akter, R., Omri, A., & Hossain, Z. (2020).** Appraisal of different levels of soybean meal in diets on growth, digestive enzyme activity, antioxidation, and gut histology of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 46, 1397 - 1407.
- **Petit J. and Jobin P. (2005).** La fertilisation organique des cultures Les bases. Fédération d'agriculture biologique du Québec . PGPR : Biocontrol and Biofertilization. 1–38p.
- **Peyrot des Gachons, C., & Breslin, P. A. S. (2016).** Amylase salivaire : Digestion et syndrome métabolique. *Rapports Actuels sur le Diabète*, 16, 1-7.
- **Pierre F., (2000).** Livre le grain de blé : Composition et Pierzynowska, K., Oredsson, S., & Pierzynowski, S. (2020). Amylase-dependent regulation of glucose metabolism

Références bibliographiques

and insulin/glucagon secretion in the streptozotocin-induced diabetic pig model and in a rat pancreatic beta-cell line, BRIN-BD11. *Journal of Diabetes Research*, 2020.

- **Planchot, V., Colonna, P., Gallant, D., & Bouchet, B. (1995).** Extensive degradation of native starch granules by alpha-amylase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Cereal Science*, 21, 163-171.
- **Pollegioni, L., Tonin, F., & Rosini, E. (2015).** Lignin-degrading enzymes. *The FEBS Journal*, 282.
- **Poolman, B. (1993).** Transduction d'énergie dans les bactéries lactiques. *Revue de microbiologie FEMS*, 12 1-3, 125-47.
- **Pratima, B., & Umender, S. (1989).** Production d' α -amylase dans un milieu à faible coût par *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 67, 422-423.
- **Prescott, LM, Willey, JM, Sherwood, LM et Woolverton, CJ (2018).** *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.
- **Quax, W. J. (2006).** Bacterial enzymes. *Prokaryotes*, 1, 777-796.
- **Rai S. K. et Mukherjee A. K. (2010).** Statistical optimization of production, purification and Industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine Protease (Alzziprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochem. Eng. J.* (48) : 173-180.
- **Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M.S., & Deshpande, V.V. (1998).** Molecular And biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3) : 597-653.
- **Rashid, N., Shehzad, A., Ahmad, N., Hussain, Z., & Haider, M. S. (2018).** Valorization of waste foods using pullulan hydrolase from *Thermococcus kodakarensis*. *Amylase*, 2(1), 39-43.
- **Rasooli, I., Astaneh, S. D. A., Borna, H., & Barchini, K. A. A. (2008).** A-Amylase thermostable produisant une variante naturelle du *Bacillus* spp. Isolée du sol en Iran. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3(3), 591-596.
- **Rathore, D. S., & Singh, S. P. (2021).** Kinetics of growth and co-production of amylase and protease in novel marine actinomycete, *Streptomyces lopnurensis* KaM5. *Folia Microbiologica*, 66(3), 303-316.

Références bibliographiques

- **Reddy P. L., and. Sreeramulu A. (2012).** Isolation and screening of amylolytic fungi from Different soil samples of Chittoor district, India. *Int.J. Curr.Microbiol. Appl Scis.* 1(3), 187-193.
- **Richard JP. (2013).** Enzymatic Rate Enhancements: A Review and Perspective, *Biochemistry-Us* ,52, 2009–2011.
- **Robinson, P. (2015).** Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1-41.
- **Rodríguez-Viera, L., Perera, E., Martos-Sitcha, JA, Perdomo-Morales, R., Casuso, A., Montero-Alejo, V., ... et Mancera, JM (2016).** Caractéristiques de régulation moléculaire, biochimique et alimentaire de l' α -amylase chez un crustacé carnivore, la langouste *Panulirus argus*. *PLoS One* , 11 (7), e0158919.
- **Rolland, Laurence, and Xavier Rolland. (1997).** Bactéries, virus et champignons: un exposé pour comprendre, un essai pour réfléchir. *FeniXX*.
- **Rouzé, M. (1969).** L'homme et les enzymes. *Raison présente*, 11(1), 110-110.
- **Saadoun, I., Rawashdeh, R., Dayeh, T., Ababneh, Q., & Mahasneh, A. (2007).** Isolement, caractérisation et criblage des streptomycètes producteurs d'enzymes hydrolytiques de fibres des sols forestiers jordaniens. *Biotechnologie*, 6(1), 120-128.
- **Saboury, A., Miroliaie, M., Nemat-Gorgani, M., & Moosavi-Movahedi, A. (1999).** Kinetics denaturation of yeast alcohol dehydrogenase and the effect of **temperature** and trehalose. An isothermal microcalorimetry study. *Thermochimica Acta*, 326, 127-131.
- **Saini, R., Saini, H., & Dahiya, A. (2017).** Amylases: Characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6, 1865-1871.
- **Saito N, Yamamoto K (1975).** Regulatory factors affecting alpha Amylase in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 121 : 848 – 856. Trevelyan WE, Procter DP, Harrison JG (1950). Detection of sugars on Paper chromatograms. *Nature (London)* 166 : 444 – 445.
- **Sajedi, R. H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A., & Moradian, F. (2005).** A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(5-6), 666-671.

Références bibliographiques

- **Salahuddin, K., Prasad, R., Kumar, S., & Visavadia, M. D. (2011).** Isolation of soil thermophilic strains of actinomycetes for the production of α -amylase. *African Journal of Biotechnology*, 10(77), 17831-17836.
- **Samanta Amalesh , Debmalya Mitra, Sudipendra Nath Roy, Chandrima Sinha, Pinaki Pal (2013).** Caractérisation et optimisation des bactéries productrices d'amylase isolées des déchets solides, *Journal de protection de l'environnement* ,Vol. 4 n° 6 (2013) , ID d'article : 33416 , 6 pages.
- **Sánchez, S., & Quinto, C. M. (1975).** D-glucose isomérase : mutants constitutifs et résistants à la répression catabolique de *Streptomyces phaeochromogenes*. *Microbiologie Appliquée*, 30(5), 750-754.
- **Sathya, R., & Ushadevi, T. (2014).** Enzymes d'importance industrielle produisant des espèces de *Streptomyces* à partir de sédiments de mangrove. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(10), 233-237.
- **Shukla, G., & Varma, A. (Eds.). (2010).** *Soil enzymology* (Vol. 22). Springer Science & Business Media.
- **Simpson CL, Russell RR. (1998).** Intracellular alpha-amylase of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 1998 Sep;180(17):4711-7.
- **Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2017).** A-Amylases. In *Current developments in biotechnology and bioengineering*. Elsevier, 3-24.
- **Singh, K. D., Schmalisch, M. H., Stülke, J., & Görke, B. (2008).** Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 7275-7284.
- **Srivastava, R. (1991).** Studies on stabilization of amylase by covalent coupling to soluble polysaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 13, 164-170.
- **Srivastava, R., & Mathur, S. (1984).** Regulation of amylase bio-synthesis in growing and non-growing cells of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 57, 147-151.
- **Subin, S. R., & Bhat, S. G. (2016).** Enzymes: concepts, nomenclature, mechanism of action and kinetics, characteristics and sources of food-grade enzymes. *Enzymes in food and beverage processing* , 3-38.
- **Sundarram, A., & Murthy, T. P. K. (2014).** α -amylase production and applications: a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166-175.

Références bibliographiques

- **Syn MJ, Chen YH. (1997).** A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus liquefaciens* J Chem. Eng, 65:247-273.
- **Szász, G. (1974).** The Effect of Temperature on Enzyme Activity and on the Affinity of Enzymes to their Substrates. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 12(4), 166-170.
- **Tallapragada, P., Rayavarapu, B., Purushothama Rao, P., Ranganath, N. N., & Veerabhadrapa, P. P. (2018).** Criblage de bactéries lactiques probiotiques potentielles et production d'amylase et sa purification partielle. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 357-362.
- **Tanasupawat S, Komagata K. (2001).** Bactéries lactiques dans les aliments fermentés en Asie du Sud-Est. *Diversité microbienne en Asie : technologie et perspectives*, Singapour : World Scientific , 2001 p. 43-59.
- **Tanyildizi MS, Ozer D., Elibol M.(2005).** Optimisation de la production d' α -amylase par *Bacillus sp.* en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse. *Processus Biochimie*, 2005 ; 40 : 2291-2296.
- **Tomasik, P., & Horton, D. (2012).** Enzymatic conversions of starch. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 68, 59-436.
- **Trincone,A. (2002).** Isomérases marines orientées application en biocatalyse. *Drogues marines* , 18(11),580.
- **Usey, MM et Huet, D. (2023).** Les protéines contenant le domaine CHCH (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix) associées à l'ATP synthase sont essentielles à la fonction mitochondriale chez *Toxoplasma gondii*. *Mbio* , 14 (5), e01769-23.
- **UTTER, MF, & SCRUTTON, MC (1969).** Pyruvate carboxylase. Dans *Thèmes actuels de la régulation cellulaire* (Vol. 1, pp. 253-296). Presse académique.
- **Valaparla, V. K. (2010).** Purification and properties of a thermostable [α]-amylase by *acremonium sporosulcatum*. *International Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 6(1), 25-35.
- **Vasile, G., & Ciornea, E. (2008).** Études expérimentales sur l'activité alpha-amylase et la structure du segment média du tractus digestif chez *Hypophthalmichthys molitrix* de différents âges. *Analele Științifice ale Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași*, Secția IIa. Genetica și Biologie Moleculară, 9(1).

Références bibliographiques

- **Vidyalakshmi R. (2009).** Amylase production on Submerged fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry*, 2009 ; 4 (1) : 89-91.
- **Vieille, C., & Zeikus, G. (2001).** Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 1 - 43.
- **Vihinen M., Mantasala P. (1989).** Enzymes amylolytiques microbiennes . Critique. *Révérend Biochem. Mol. Biol.* 24, 329-418.
- **Wang, Y., Hu, H., Ma, J., Yan, Q., Liu, H., & Jiang, Z. (2020).** A novel high maltose- forming α -amylase from *Rhizomucor miehei* and its application in the food industry. *Food Chemistry*, 305, 125447.
- **Wei K, Zhao J, Sun Y, Lopez IF, Ma C and Zhang Q. (2024).** Optimizing nitrogen And phosphorus application to improve Soil organic carbon and alfalfahayYield in alfalfafields. *Front. Plant Sci.* 14 :1276580.
- **Wohlgemuth, R. et Littlechild, J. (2022).** Réduction de la complexité et opportunités dans la conception, l'intégration et l'intensification de processus biocatalytiques pour la synthèse de métabolites. *Frontières de la bio-ingénierie et de la biotechnologie* , 10 , 958606.
- **Zafar, A., Aftab, M., Iqbal, I., Din, Z., & Saleem, M. (2019).** Pilot-scale production of a highly thermostable α -amylase enzyme from *Thermotoga petrophila* cloned into *E. coli* and its application as a desizer in textile industry. *RSC Advances*, 9, 984 – 992.
- **Zeng, L. R., Park, C. H., Venu, R. C., Gough, J., & Wang, G. L. (2008).** Classification, expression pattern, and E3 ligase activity assay of rice U-box-containing proteins. *Molecular Plant*, 1(5), 800-815.

Annexes

Annexes

Il existe deux types de milieux de culture pour la culture et la prolifération des différents micro-organismes au laboratoire : Le GN (Gélose Nutritive) et le BN (Bouillon Nutritif) sont considérés comme des milieux de culture généraux ou « non sélectifs » En raison de leur capacité à permettre la prolifération de divers types de micro-organismes sans favoriser ni inhiber spécifiquement d'autres micro-organismes (. Pashirova et al., 2015).

La gélose nutritive (GN) : est un milieu solide polyvalent servant à la culture d'un grand nombre de microorganismes bactériens. Qui ne présentant pas d'exigences particulières (Hitchens,1921). ce milieu contient principalement de l'agar, un agent gélifiant, qui permet au milieu de rester solide à température ambiante et légèrement en dessous, Pour la préparer, 23 grammes de poudre de (GN), (Conda Nutrient agar ISO-6579 ISO-10273 ISO 19250), sont dissous dans un 1L d'eau distillée ,Après avoir été agitée sur une plaque chauffante, la préparation est autoclavée pendant 1h.

Le bouillon nutritif (BN) : est un milieu liquide largement utilisé pour la culture des microorganismes peu exigeants (Baker et Silverton,1976). Le BN (Conda Nutrient Broth) contenant des ingrédients similaires à ceux de la gélose nutritive mais sans l'agar. Sa préparation se fait en dissolvant 13 grammes de poudre de Bouillon Nutritif (BN) dans 1L d'eau distillée, Le mélange est ensuite agité puis stérilisé pendant 1 h en autoclave. Ces milieux s'avèrent très efficaces pour le maintien et la multiplication des cultures microbiennes en laboratoire. Ils sont aussi employés pour effectuer des tests de stabilité, vérifier la pureté des cultures, et pour diverses autres applications en recherche microbiologique.

Résumé

Résumé

Les enzymes sont des macromolécules qui catalysent et accélèrent les réactions biochimiques impliquées dans divers processus biologiques importants pour les cellules des différents organismes vivants. Ces enzymes présentent aussi une très grande importance dans divers secteurs industriels. Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases, telles que les amylases, les lipases et les protéases. Les amylases sont particulièrement importantes et elles permettent la dégradation de l'amidon et du glycogène. Les amylases sont utilisées dans de nombreux secteurs industriels, tels que le secteur de l'agroalimentaire, du textile, du papier, des adhésifs et dans le secteur pharmaceutique. Ces amylases sont présentes chez les différents organismes vivants mais celles des bactéries présentent un intérêt particulier en industrie. Pour cela, notre travail consistait à rechercher et à caractériser l'activité enzymatique des amylases chez 8 souches bactériennes isolées à partir de différents sols, par une étude de la cinétique enzymatique ainsi que l'influence de la température et du pH sur leur activité. Aussi, la thermostabilité des ces amylases a été étudiée. Les résultats obtenus ont montré que les 8 souches bactériennes présentaient une activité amylasique. Les vitesses enzymatiques variaient entre les souches, avec l'isolat SS2 présentant une activité amylasique la plus élevée. En ce qui concerne le pH, les amylases des isolats SRZ1, SS1 et SRZ2 ont montré une activité optimale à pH 6 et pH 7, tandis que les amylases de l'isolat SS2 ont montré une activité optimale à un pH 8. En ce qui concerne la température, les amylases des isolats SS1, SS2 et SRZ1m2 ont montré une activité optimale à la plupart des températures testées comparé aux autres isolats. En ce qui concerne la thermostabilité des enzymes, après le traitement thermique à 90°C, la plupart des amylases des isolats étaient plus stables après 1h de ce traitement qu'après 2h de ce même traitement, à l'exception des amylases des isolats SRZ1m1, SS1 et SS2 qui sont restées stables même après 2h de traitement.

Mots clés : bactéries, sols, enzymes industrielles, hydrolases, amylases, activité enzymatique, thermostabilité.

Enzymes are macromolecules that catalyze and accelerate biochemical reactions involved in various important biological processes for the cells of different living organisms. These enzymes also hold great significance in various industrial sectors. Approximately 75% of industrial enzymes are hydrolases, such as amylases, lipases, and proteases. Amylases are particularly important as they facilitate the degradation of starch and glycogen. They are utilized in numerous industrial sectors, including the agri-food, textile, paper, adhesive, and pharmaceutical sectors. While amylases are present in various living organisms, those found in bacteria are of particular interest in industry. Hence, our work aimed to research and characterize the enzymatic activity of amylases in 8 bacterial strains isolated from different soils, through a study of enzymatic kinetics as well as the influence of temperature and pH on their activity. Additionally, the thermostability of these amylases was studied. The results obtained showed that all 8 bacterial strains exhibited amylase activity. Enzyme velocities varied among the strains, with isolate SS2 showing the highest amylase activity. Regarding pH, amylases from isolates SRZ1, SS1, and SRZ2 showed optimal activity at pH 6 and pH 7, whereas amylases from isolate SS2 showed optimal activity at pH 8. Concerning temperature, amylases from isolates SS1, SS2, and SRZ1m2 showed optimal activity at most tested temperatures compared to other isolates. Regarding enzyme thermostability, after thermal treatment at 90°C, most amylases from isolates were more stable after 1 hour of treatment than after 2 hours of the same treatment, except for amylases from isolates SRZ1m1, SS1, and SS2, which remained stable even after 2 hours of treatment.

Keywords: bacteria, soils, industrial enzymes, hydrolases, amylases, enzymatic activity, thermostability.

الإنزيمات هي ماكروموليكيولات تحفز وتسرع التفاعلات الكيميائية الحيوية المتضمنة في عمليات حيوية مهمة بالنسبة لخلايا الكائنات الحية المختلفة. كما تمتاز هذه الإنزيمات أيضاً بأهمية كبيرة في قطاعات صناعية متعددة. حوالي 75% من الإنزيمات الصناعية هي هيدرولازات، مثل الأميلازات والليبازات والبروتيازات. الأميلازات لها أهمية خاصة حيث تسمح بتحلل النشا والغلوكوجين. تستعمل الأميلازات في العديد من القطاعات الصناعية مثل قطاع الأغذية والغذاء والنسيج والورق والمواد اللاصقة وفي القطاع الصيدلاني. تتواجد هذه الأميلازات لدى الكائنات الحية المختلفة لكن تلك الموجودة لدى البكتيريا تمتاز بأهمية خاصة في الصناعة. لذلك، كان موضوع عملنا البحث عن النشاط الإنزيمي للأميلازات لدى 8 سلالات بكتيرية معزولة من تربة مختلفة، من خلال دراسة حركية الإنزيم بالإضافة إلى تأثير درجة الحرارة ودرجة الحموضة على نشاطها. كما تمت دراسة ثباتية الحرارة لهذه الأميلازات. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن السلالات الثمانية تمتلك نشاطاً أميلازياً. واختلفت معدلاتها الإنزيمية بين السلالات، حيث كان للعزلة SS2 أعلى نشاط أميلازي. أما بالنسبة لدرجة الحموضة، فقد أظهرت الأميلازات في العزلتين SRZ1 و SS1 و SRZ2 أقصى نشاط عند درجة حموضة 6 و 7، بينما أظهرت أميلازات العزلة SS2 أقصى نشاط عند درجة حموضة 8. أما بالنسبة لدرجة الحرارة، فقد أظهرت الأميلازات في العزلات SS1 و SS2 و SRZ1m2 أعلى نشاط عند معظم درجات الحرارة المجربة مقارنة بالعزلات الأخرى. وبالنسبة لثباتية الحرارة للإنزيمات، فبعد المعالجة الحرارية عند 90°C، ظلت معظم الأميلازات في العزلات أكثر استقراراً بعد ساعة من هذا المعالجة مقارنة بعد ساعتين من نفس المعالجة، باستثناء الأميلازات في العزلات SRZ1m1 و SS1 و SS2 التي بقيت ثابتة حتى بعد ساعتين من المعالجة.

الكلمات المفتاحية : بكتيريا، تربة، إنزيمات صناعية، إنزيمات هيدروليزية، أميلازات، نشاط إنزيمي، استقرار حراري.