

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  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Microbiologie Appliquée  
Thème

**Recherche et caractérisation d'activités enzymatiques à intérêt industriel chez des souches de référence bactériennes**

**Présenté Par :**

Melle Attia Fatima Zahra

**Devant le jury composé de :**

Dr Mohamed AMARA (MCA)

UAT.B.B (Ain Temouchent)

Président

Dr Mahfoud BAKLI (MCA)

UAT.B.B (Ain Temouchent )

Examineur

Dr Sofiane Mourad BENYAMINA (MCB)

UAT.B.B (Ain Temouchent )

Encadrant

*Année Universitaire 2020/2021*

## ***Remerciements***

Je remercie en premier lieu Dieu de m'avoir donné la vie, la santé et d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui, c'est grâce à lui que ce travail a vu le jour.

J'adresse toute ma reconnaissance à mon encadrant de mémoire, monsieur Sofiane Mourad BENYAMINA, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, son orientation, son aide, et ces critiques qui ont contribué à alimenter ma réflexion, et de devenir la meilleur version de moi.

Je désire aussi à remercier monsieur AMARA Mohamed président de jury et monsieur Mahfoud BAKLI d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier spécialement mes parents mes frères ADEL et TAREK et toute ma famille pour leur soutien et leurs confiance.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Enfin, je tiens à témoigner toute ma gratitude aux professeurs de l'Université d'Ain Témouchent qui mon enseigné, et aux personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

***ATTIA FATIMA ZAHRA***

# Sommaire

## Remercîments

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1</b>	<b>Les enzymes .....</b>	<b>2</b>
1.1	La réaction catalysée par les enzymes .....	2
1.2	Classification des enzymes.....	3
1.3	Localisation cellulaire des enzymes .....	4
1.3.1	Les enzymes intracellulaires .....	5
1.3.2	Les enzymes extracellulaires.....	6
1.4	L'importance industrielle des enzymes .....	7
1.4.1	Importance industrielles des enzymes d'origine végétale .....	8
1.4.2	Importance industrielles des enzymes d'origine animale .....	9
1.4.3	Importance industrielles des enzymes d'origine microbienne .....	10
1.4.4	Importance industrielles des enzymes d'origine fongiques .....	12
1.4.5	Importance industrielles des enzymes d'origine bactérienne.....	13
<b>2</b>	<b>Les hydrolases.....</b>	<b>14</b>

### MATÉRIALS ET MÉTHODES

<b>1</b>	<b>Préparation des milieux de culture .....</b>	<b>15</b>
1.1	Préparation du Bouillon nutritif.....	15
1.2	Préparation de la gélose nutritive .....	15
<b>2</b>	<b>Purification des souches de références et préparation de leurs extraits bruts enzymatiques .....</b>	<b>15</b>
2.1	Recherche et caractérisation d'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques des 3 souches de référence .....	15

2.1.1	Influence de la température sur l'activité lipasique des extraits enzymatiques bruts des 3 souches de référence .....	16
2.1.2	Influence du pH sur l'activité lipasique des 3 souches de référence.....	17
2.1.3	Test de la stabilité thermique des lipases des extraits enzymatiques bruts des 3 souches de référence .....	17
<b>2.2</b>	<b>Recherche et caractérisation d'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques des 3 souches de référence .....</b>	<b>17</b>
2.2.1	Courbe d'étalonnage de l'amidon .....	18
2.2.2	Influence de la température sur l'activité amylasique des extraits enzymatiques bruts des 3 souches de référence .....	19
2.2.3	Influence du pH sur l'activité amylasique des extraits enzymatiques bruts des 3 souches de référence .....	19
2.2.4	Test de la stabilité thermique des amylases des extraits enzymatiques bruts des 3 souches de référence .....	19

## RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

<b>1</b>	<b>Recherche et caractérisation d'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques des 3 souches de référence.....</b>	<b>20</b>
1.1	Influence de la température sur l'activité lipasique des extraits enzymatiques bruts des souches de référence .....	20
1.2	Influence du pH sur l'activité lipasique des souches de référence.....	22
1.3	Test de la stabilité thermique des lipases des extraits enzymatiques bruts des souches de référence .....	23
<b>2</b>	<b>Recherche et caractérisation d'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques des 3 souches de référence.....</b>	<b>24</b>
2.1	Influence du pH sur l'activité amylasique des extraits enzymatiques bruts des souches de référence.....	27
2.2	Test de la stabilité thermique des amylases des extraits enzymatiques bruts des souches de référence.....	28
<b>3</b>	<b>Discussion générale .....</b>	<b>29</b>
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIV.....</b>	<b>32</b>
	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>33</b>
	<b>RÉSUMÉ</b>	

## LISTE DES ABREVIATIONS

% : pourcentage

° C : Degré Celsius

ADN : L'acide désoxyribonucléique

ADP : L'adénosine diphosphate

ATP : L'adénosine triphosphate

DO : Densité Optique

EC : Classe d'enzyme

g : gramme

h: heure

HCl : Acide Chlorhydrique

IKI : Iodine-Potassium Iodide

L : litre

M : Molaire

min : minute

mL : Millilitre

mM : Millimolaire

NaOH : Hydroxyde de sodium

nm : Nanomètre

pH : Potentiel d'Hydrogène

rpm : rotations par minute

μL : Microlitre

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> modeles d'interaction enzyme-substrat. ....	3
<b>Figure 2:</b> parts de marche occupees par les enzymes dans les differents secteurs industriels ..	7
<b>Figure 3 :</b> repartition des enzymes industrielles par origine de l'organisme donneur sur la base des donnees de l'AMFEP. ....	8
<b>Figure 4:</b> influence de la temperature sur l'activite lipasique des extraits bruts enzymatiques des trois souches de reference. ....	21
<b>Figure 5:</b> influence des differents pH sur l'activite lipasique des extraits bruts enzymatiques des trois souches de reference. ....	23
<b>Figure 6:</b> courbe etalon de l'amidon.....	25
<b>Figure 7:</b> influence de la temperature sur l'activite amylasique des extraits bruts enzymatiques des trois souches de reference. ....	26
<b>Figure 8:</b> influence des differents pH sur l'activite amylasique des extraits bruts enzymatiques des trois souches de reference. ....	27
<b>Figure 9:</b> effet du traitement thermique sur la stabilite des amylases des 3 souches de reference. ....	28

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> :exemples d'enzymes d'origine vegetale et leur application dans des secteurs industriels. ....	9
<b>Tableau 2</b> :exemples d'enzymes d'origine animale et leur application dans des secteurs industriels .....	10
<b>Tableau 3</b> : l'application de certaines enzymes microbiennes en industrie .....	12
<b>Tableau 4</b> : Différentes concentrations utilisée pour la préparation de la courbe étalon de l'amidon.....	18
<b>Tableau 5</b> : tableau recapitulatif des resultats de la caracterisation de l'activite et de la stabilite des lipases et des amylases de 3 souches de reference. ....	31

# *Introduction générale*



Chez les organismes vivants, chaque réaction biochimique est catalysée par sa propre enzyme. Les enzymes présentent une spécificité élevée, car elles sont capables de différencier entre des molécules de substrat même que légèrement différentes (Quax, 2006) et elles sont capables d'accélérer les réactions biochimiques par des facteurs de centaine de millions (Assamoi., 2009). Les enzymes sont cruciales pour la croissance et le développement durables de toute les formes de vie (Ahlawat *et al.*, 2018).

En plus de leur importance au niveau cellulaire, les enzymes sont importantes dans un large éventail d'applications et dans différentes industries, telles que les industries de l'alimentation, du textile, et de la médecine (Gurung *et al.*, 2013). Parmi ces enzymes celles d'origine microbiennes sont connues pour être utilisées dans diverses industries et applications (Adrio et Demain., 2014).

75% des enzymes utilisées dans les industries sont des hydrolases comme par exemple les amylases, les cellulases, les hémicellulases et les pectinases (Assamoi *et al.*, 2009) les protéases, les lipases (Enache *et al.*, 2010). Les hydrolases sont les enzymes les plus populaires en raison de leur potentiel d'utilisation dans une large gamme d'applications industrielles et biotechnologiques (Abd Latip *et al.*, 2019).

Pour cela l'objectif de notre travail est de rechercher et caractériser 2 hydrolases (les lipases et les amylases) chez 3 souches bactériennes de référence : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Les résultats obtenus ont montré la présence d'une activité enzymatique des 2 enzymes testées chez les 3 souches de référence. Les résultats de caractérisation ont montré que les lipases des 3 souches de référence ne possèdent pas de caractéristiques industrielles, en raison de la perte de leur stabilité suite au traitement thermique. Les amylases de ces souches ont montré une bonne thermostabilité ce qui leur donne une possibilité d'être utilisée en industrie.

---

*Synthèse  
bibliographique*

## 1 Les enzymes

Les enzymes sont des macromolécules biologiques produites par les cellules des différents organismes vivants (Gurung *et al.*, 2013). Ces enzymes possèdent un rôle central dans presque tous les processus biologiques et les réactions biochimiques nécessaires au maintien de la vie (Herschlag et Natarajan, 2013) telles que les réactions des voies métaboliques comme par exemple la fermentation (Gopinath *et al.*, 2013) et la glycolyse (Li *et al.*, 2019).

Ces enzymes peuvent être aussi utilisées dans un large éventail de processus industriels importants tels que ceux des industries des détergents, des produits fermentés, des produits pharmaceutiques, du textiles et du cuir (Singh *et al.*, 2016) et dans l'industrie agroalimentaire (Raveendran *et al.*, 2018). L'utilisation des enzymes comme biocatalyseurs, dans les procédés industriels, est devenue une méthode alternative, efficace et écologique (Cabrera et Blamey, 2018) comparé aux procédés industriels qui utilisent des composés chimiques comme catalyseurs qui peuvent générer des sous-produits toxiques (Cabrera et Blamey, 2018).

En raison de leur importance, au niveau cellulaire et industriel, les enzymes ont été minutieusement étudiées, théoriquement et expérimentalement, pendant de nombreuses décennies (Herschlag et Natarajan, 2013).

### 1.1 La réaction catalysée par les enzymes

Les enzymes sont définies comme des molécules qui agissent sur le substrat et qui catalysent sa conversion en un produit selon la réaction suivante :

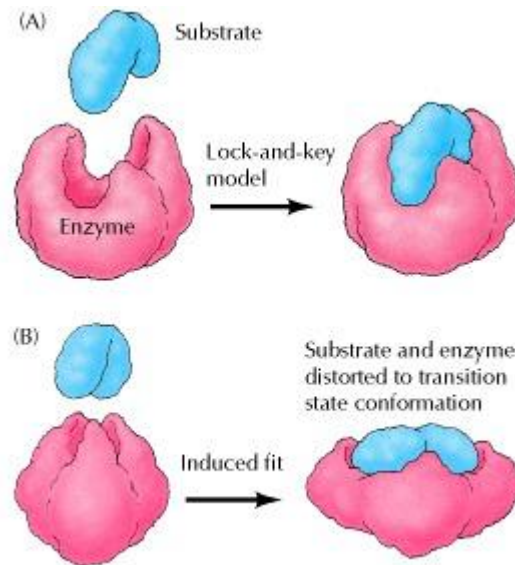


**E** : Enzyme, **S** : Substrat, **P** : Produit

Pendant la réaction catalytique, l'enzyme se lie au substrat grâce à son site actif ou site catalytique (Figure 1), formant un complexe Enzyme – Substrat (ES) et permettant ainsi à l'enzyme de convertir le Substrat (S) en un Produit (P) (Robinson, 2015; Einav *et al.*, 2016).

Il existe des modèles d'interaction entre l'enzyme et le substrat comme par exemple le modèle d'interaction clé-serrure, dans lequel le substrat s'insère précisément dans le site actif de l'enzyme (Figure 1A) et le modèle d'ajustement induit, dans lequel les conformations

du substrat et de l'enzyme se déforment afin de permettre la liaison entre l'enzyme et le substrat, (Figure 1B) (Cooper, 2000).



**Figure 1** : modèles d'interaction Enzyme-Substrat. (A) : Liaison Enzyme-Substrat selon le modèle clé-serrure, (B) : Liaison Enzyme-Substrat selon le modèle d'ajustement induit (Cooper, 2000).

## 1.2 Classification des enzymes

Les enzymes peuvent, selon le type de réactions catalysées, être classées en 7 classes différentes (Tao *et al.*, 2020 ; Concu et Cordeiro, 2019). En 1961, l'IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) a publié la première version de la classification enzymatique (EC) (Robinson.,2015 ; Concu et Cordeiro, 2019).

Dans un premier temps, l'IUBMB a regroupée les enzymes en 6 classes principales : les oxydoréductases (EC1), les transférases (EC2), les hydrolases (EC3), les lyases (EC4), les isoméras (EC5), et les ligases (EC6) (Gurung *et al.*, 2013 ; Concu et Cordeiro, 2019 ; Tao *et al.*, 2020). Une 7<sup>ème</sup> classe d'enzymes (EC 7) a été récemment ajoutée aux 6 classes déjà existantes, et elle regroupe les translocases (Concu et Codeiro, 2019; Tao *et al.*, 2020)

**EC1:** les oxydoréductases, les enzymes de cette classe catalysent le transfert d'électrons d'une molécule à une autre.(Gurung *et al.*, 2013), selon la réaction suivante :



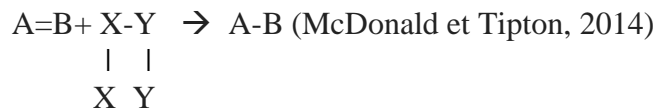
**EC 2 :** les transférases, les enzymes de cette classe catalysent le transfert des radicaux d'une molécule à une autre. (Gurung *et al.*, 2013), selon la réaction suivante :



**EC 3 :** les hydrolases, les enzymes de cette classe catalysent l'hydrolyse de substrat, par son clivage avec une molécule d'eau (Gurung *et al.*, 2013), selon la réaction suivante :

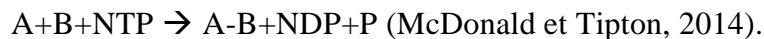


**EC 4 :** les lyases, les enzymes de cette classe catalysent les réactions d'addition et d'élimination. Les réactions catalysées par la lyase rompent la liaison entre un atome de carbone et un autre atome (Paul *et al.*, 2019). Ces enzymes catalysent l'ajout de groupements chimiques à des doubles liaisons ou la formation de doubles liaisons en supprimant des groupements chimiques (Gurung *et al.*, 2013), selon la réaction suivante :

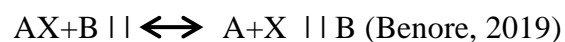


**EC 5 :** les isomérase, catalyse le transfert de groupes dans la même molécule d'une position à une autre (Gurung *et al.*, 2013), selon la réaction suivante :  $A \rightarrow B$  (McDonald et Tipton, 2014).

**EC 6 :** les ligases relient les molécules différentes avec des liaisons covalentes (Gurung *et al.*, 2013), selon la réaction suivante :



**EC 7 :** les translocases, les enzymes de cette classe, catalysent le mouvement ou la séparation des ions ou des molécules à travers les membranes (Concu et Codeiro, 2019) selon la réaction suivante :



### **1.3 Localisation cellulaire des enzymes**

Bien que de nombreuses enzymes restent à l'intérieur de la cellule, d'autres sont libérés dans le milieu extérieur. Donc, selon leur localisation cellulaire, les enzymes peuvent être regroupées soit en enzymes intracellulaires ou enzymes extracellulaires (Robinson, 2015 ; Zumstein et Helbling, 2019).

### **1.3.1 Les enzymes intracellulaires**

Ces enzymes sont produites et interviennent dans l'environnement interne des cellules (Robinson, 2015). Ces enzymes jouent un rôle clé dans la régulation des voies métaboliques dans les cellules (Schmitt et An, 2017), aussi elles peuvent être impliquées dans la régulation de la croissance cellulaires et dans la différenciation cellulaire (Kenny, 1986 in Iji *et al.*, 2001).

Ces enzymes sont aussi impliquées dans des processus essentiels à la survie des cellules, tels que la biosynthèse de l'ADN et l'ARN (Schmitt et An, 2017), qui implique, entre autres, l'ADN polymérase et l'ARN polymérase (Ghadessy *et al.*, 2001).

Chez les plantes, les enzymes intracellulaires sont aussi importantes dans divers processus biologiques (Linka et weber, 2010), les différents organites contiennent un ensemble spécifique d'enzymes (Linka et weber, 2010), qui peuvent jouer un rôle très important dans des réactions importantes telles que celles impliquées dans le métabolisme (Mintz-Oron *et al.*, 2012). Ces enzymes intracellulaires peuvent aussi, intervenir dans la protection de la membrane cellulaire contre des dommages oxydatifs graves causés par Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) (Das et Roychoudhury, 2014), comme c'est le cas de l'enzyme ascorbate peroxydase (APX) qui permet l'élimination du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Iqbal, 2018). Aussi, ces enzymes interviennent dans des réactions et processus très important pour la cellule végétale comme c'est le cas de l'enzyme Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase) qui intervient dans le cycle de réduction photosynthétique du carbone (Calvin), (Raines, 2003).

Chez les mammifère, elles sont impliquées dans les réactions de catabolismes des molécules, comme par exemple le catabolisme des protéines intracellulaires (Trivedi *et al.*, 2020 ; Carillo *et al.*, 1995) lors du processus de protéolyse qui permet l'élimination des protéines mal repliées (Carillo *et al.*, 1995). Il existe aussi, une série d'enzymes dans le lysosome telles que les protéases, la sulfatases, les nucléases, les lipases, les phosphatases, les glycosidases qui permettent la dégradation des macromolécules complexes (Trivedi *et al.*, 2020).

Chez les microorganismes, les enzymes intracellulaires présentent aussi leur importance par exemple lors de la glycolyse, la pyruvate décarboxylase est impliquée dans la fermentation du glucose en pyruvate, et après elle le décarboxyle en acétaldéhyde et en

dioxyde de carbone (Müller, 2001). Aussi, chez les bactéries lactiques la lactate déshydrogénase réduit le pyruvate formé en acide lactique (Müller, 2001).

Chez les bactéries, de nombreuses réactions importantes font intervenir des enzymes intracellulaires telles que l'ADN ligase qui est impliquée dans la réplication, la réparation de l'ADN endommagé et dans divers événements de recombinaison au niveau de la cellule (Weller et Doherty, 2001) ou bien l'ATP synthase, qui intervient dans la production de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique (Walker, 2013 ; Guo et Suzuki, 2019).

### **1.3.2 Les enzymes extracellulaires**

Ces enzymes sont excrétées par les cellules dans le milieu extracellulaire. Les enzymes extracellulaires sont produites par les cellules des différents organismes vivants (végétaux, animaux et microorganismes). (Chrost, 1991 in Romaní *et al.*, 2006 ; Forestier, 1992; Gianfreda, 2016).

Chez les plantes, les cellules des racines sécrètent aussi des enzymes extracellulaires dans l'environnement extérieur (Gianfreda, 2015). L'azote de poids moléculaire élevé contenu dans la matière organique du sol, est indisponible pour les plantes et cette ressource doit être hydrolysée pour qu'elle soit soluble et disponible pour les plantes (Schulten et Schnitzer, 1997 in Greenfield *et al.*, 2020).

Chez l'homme, les enzymes extracellulaires existent aussi, par exemple, au niveau de l'épiderme, la couche cornée est composée de cellules «mortes», elle est le lieu d'activités métaboliques très importantes, les principales activités des enzymes extracellulaires trouvées correspondent à la glycosidase, la phospholipase, la phosphatase, l'estérase, la sulfatase et la protéase qui sont responsables de la dégradation des cellules mortes du derme (Forestier, 1992). L'absence de certaines de ces enzymes extracellulaires indique la présence de maladies génétiques (Forestier, 1992 ; Bonnart *et al.*, 2010).

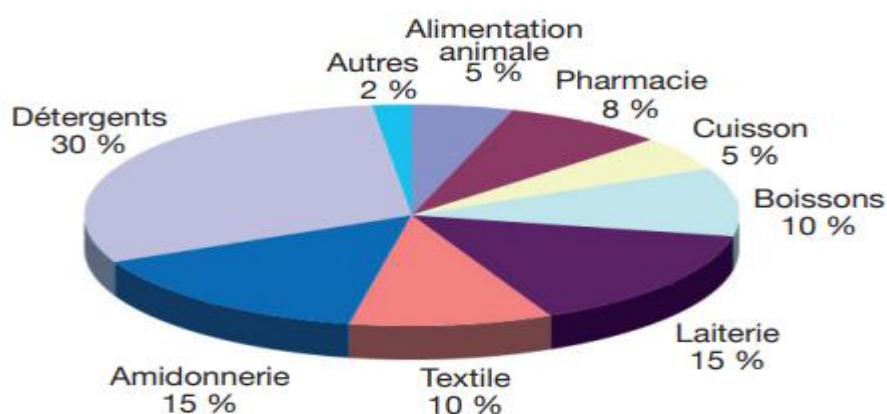
Le pancréas produit aussi des enzymes digestives qui seront libérées vers l'extérieur et transportées par la suite vers l'intestin grêle afin d'hydrolyser les nutriments complexes (Whitcomb et Lowe, 2007). Ces enzymes intestinales, jouent aussi un rôle essentiel dans la régulation de la quantité de nutriments pouvant être absorbée (Iji *et al.*, 2001).

Chez les microorganismes les enzymes extracellulaires permettent par exemple la reminéralisation de la matière organique par hydrolyse des substrats à des tailles suffisamment petites pour être transportées à travers les membranes cellulaires (Arnosti, 2011). Par exemple, des microorganismes les produisent afin de convertir des composés de poids moléculaire élevé (tels que la cellulose, l'hémicellulose et la lignine) en molécules plus petites et facilement assimilables (Chrost, 1991 in Romaní *et al.*, 2006).

Aussi, les enzymes extracellulaires peuvent intervenir dans l'inactivation des antibiotiques comme c'est le cas de l'hydrolase  $\beta$ -lactamase qui permet l'inactivation des pénicillines, des céphalosporines, des carbapénèmes et des monobactames (Jacoby, 2005 in Liu *et al.*, 2019 ).

#### **1.4 L'importance industrielle des enzymes**

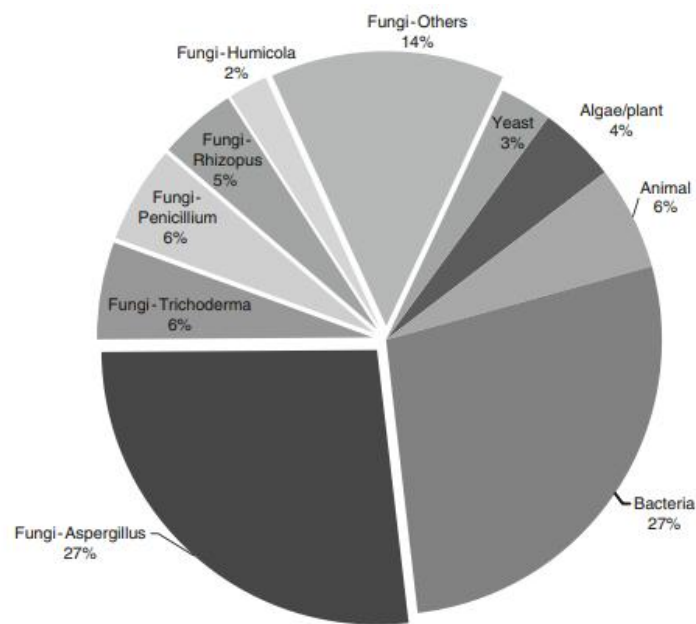
En plus de leur importance au niveau cellulaire (voir partie localisation cellulaire des enzymes), les enzymes présentent aussi une importance industrielle, dans divers secteurs d'industrie tels que le secteur des industries pharmaceutiques (RL Morlighem *et al.*, 2018 ), des industries agroalimentaires (Gurung *et al.*, 2013), dans les industries du textile, des détergents des boissons (Cabrera et Blamey , 2018), et dans l'industrie biomédicale (Assamoi *et al.*, 2009). La figure suivante représente les parts d'utilisation des enzymes dans les différents secteurs industriels.



**Figure 2:** Parts de marché occupées par les enzymes dans les différents secteurs industriels (Larreta-Garde, 1997 in Assamoi *et al.*, 2009).



Les levures et les moisissures contribuent davantage à plus de 50% des enzymes industrielles et environ 30% des enzymes industrielles sont produites à partir de bactéries, 8% à partir de cellules animales et environ 4% de proviennent de sources végétales (Thapa *et al.*, 2019). La figure suivante représente la contribution des différents organismes dans la production des enzymes industrielles.



**Figure 3 :** Répartition des enzymes industrielles par origine de l'organisme donneur sur la base des données de l'AMFEP (2009) (Østergaard et Olsen, 2011).

#### 1.4.1 Importance industrielle des enzymes d'origine végétale

La plupart des matières premières utilisées dans la production des enzymes industrielles sont des produits agricoles adaptés à la consommation humaine et animale (Falch, 1991). Par exemple, l'intérêt pour les lipases végétales, en industrie, n'a cessé d'augmenter depuis certaines années (Fickers *et al.*, 2008), comme c'est le cas des lipases du blé, de l'orge, du maïs et du colza qui sont utilisées dans les industries alimentaires afin de libérer des acides gras dans les aliments en hydrolysant les huiles et les graisses présentes dans les aliments (Liaquat et Apent, 2000 in Barros *et al.*, 2010).

La bromélaïne, une protéase isolée de l'ananas, et en raison de sa forte activité, elle est utilisée dans de nombreuses applications, principalement dans les industries de l'attendrissement, de l'alimentation, des détergents et du textile (Arshad *et al.*, 2014).

Aussi, la papaïne une autre protéase végétale utilisée depuis longtemps pour traiter les blessures sportives, des traumatismes et des allergies (Dietrich, 1965 in Mamboya, 2012). Le tableau suivant regroupe des exemples d'enzymes végétales utilisées en industrie.

**Tableau 1:**exemples d'enzymes d'origine végétale et leur application dans des secteurs industriels.

L'enzyme	L'origine	Application	fonction	références
Proteases	Citrouille	pharmaceutique	Inhibitor	Krishnamoorthi <i>et al.</i> , 1990
Ficine (une cystéine protéase endoprotéolytique)	Figue	industrie pharmaceutique <i>et alimentaire</i>	dégradation des protéines	Zare <i>et al.</i> , 2013
Pepsine	Brucea javanica	Pharmaceutique	antibactérien	Ahmad <i>et al.</i> , 2018
exoglucanase	Nicotiana tabacum	Détergeant, textile	élimination des brins de fibres horizontaux	Kumari <i>et al.</i> , 2019

#### 1.4.2 Importance industrielle des enzymes d'origine animale

Jusque dans les années 1970, la plupart des applications commerciales des enzymes impliquaient, en plus des plantes, l'utilisation des animaux (Robinson, 2015). En effet, les enzymes d'origine industrielle, animale et végétale étaient le premier choix (Robinson, 2015). Les enzymes d'origine animales sont utilisées dans diverses industries, par exemple la pepsine (généralement extraite de l'estomac Porc), une enzyme proche de la présure, est utilisée dans la production de fromage comme le cheddar (Alais et Novak, 1968). Le tableau suivant regroupe des exemples d'enzymes animales utilisées en industrie.

**Tableau 2** :exemples d’enzymes d’origine animale et leur application dans des secteurs industriels (Singu et Annapure, 2018 ; Kunamneni *et al.*, 2008)

L'enzyme	La source (l'organe)	Application	Fonction
Catalase	foie	Industrie Alimentaire	Réduit le peroxyde d'hydrogène dans les aliments
Serine protéase	Jus pancréatique	Nourriture, cuir	Enzyme sérine protéase utilisée dans la production de protéines hydrolysées de sources végétales et animales
Lipase	Jus pancréatique	Aliments (gras et industries pétrolières)	Hydrolyse, transestérification, estérification
Présure	Caillette	Fromage	C'est une enzyme protéase qui caille la caséine dans lait
L'urokinase	rein humain	Médecine	l'élimination des caillots de fibrine de la circulation sanguine, utilisées comme médicaments anticancéreux humains
Trypsine	Jus pancréatique	biotechnologies	Utilisé pour convertir la proinsuline en insuline

### 1.4.3 Importance industrielle des enzymes d'origine microbienne

Les microorganismes ont été, longtemps, utilisés dans des applications commerciales, la levure a été utilisée pour la première fois chez les Babyloniens et les Sumériens (6000 avant J.C) pour la production des boissons alcoolisées à partir de l'orge (Singh *et al.*, 2016).

La plupart des enzymes utilisées dans l'industrie sont des protéines extracellulaires dérivées de sources fongiques (par exemple les espèces d'*Aspergillus*) ou bactériennes (par exemple les espèces de *Bacillus*) (Robinson, 2015).

En raison de leurs nombreux avantages, tels que l'extraction facile, la production rentable et stables, les enzymes des microorganismes sont la source préférée des enzymes par rapport aux plantes ou aux animaux (Raveendran *et al.*, 2018). Aussi, les enzymes produites par les microorganismes ont des rendements élevés et sont faciles à modifier et à optimiser (Liu et Kokare, 2017).

Les enzymes microbiennes présentent des intérêts commerciaux et sont utilisées dans de nombreuses applications industrielles. En raison de leurs propriétés spécifiques, qui comprennent la thermotolérance, la stabilité à une gamme de pH extrêmes et la stabilité de l'activité enzymatique sous d'autres conditions extrêmes telles que la stabilité en présence de solvants organiques et de métaux lourds (Nigam, 2013 ; Cabrera et Blamey, 2018). Les enzymes thermostables ont trouvé de nombreuses applications commerciales (Gurung *et al.*, 2013), par exemple, lorsque le procédé doit être exécuté à des températures élevées (comme pendant le traitement de l'amidon), la stabilité à haute température des enzymes provenant de micro-organismes thermophiles est souvent utile (Robinson, 2015).

Aussi, les enzymes de certains microorganismes halophiles comme *Halobacterium halobium* (Ryu *et al.*, 1994) ont une très bonne activité sous des conditions de salinité, ce qui permet leur utilisation dans de nombreux procédés industriels utilisant des conditions de salinité à haute concentration (la salinité peut inhiber plusieurs réactions enzymatiques) (Gurung *et al.*, 2013). Aussi, les enzymes des microorganismes thermophiles comme celles de *Bacillus stearothermophilus* (Gurung *et al.*, 2013) et celles des archées hyperthermophiles comme *Desulfurococcus*, *Staphylothermus* (Cabrera et Blamey, 2018) présentent une stabilité élevée sous condition de haute température, comparé aux enzymes d'origine animale et végétale, ce qui les rend plus adaptées à un usage commercial (Robinson, 2015).

Le tableau suivant démontre des exemples d'enzymes microbiennes et leur application en industrie :

**Tableau 3:** l'application de certaines enzymes microbiennes en industrie

L'enzyme	L'espèce microbienne	L'application industrielle	Références
Cellulose	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium funiculosum</i>	Adoucissement du coton, finition denim	Singh <i>et al.</i> , 2016
L-Asparaginase	<i>E.coli</i>	Chimiothérapie anticancéreuse (injections), en particulier pour le leucémie	Robinson, 2015 Ohnuma <i>et al.</i> , 1970
Transglutaminase	<i>Streptomyces</i> sp.	Modifier la viscoélasticité	Ahlawat <i>et al.</i> , 2018
Alcaline proteases	<i>Bacillus</i>	Détergents et lessives	Robinson, 2015
Lipases	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Industries de l'alimentation, des graisses, des produits laitiers, de la pharmacie et de la boulangerie	Ahlawat <i>et al.</i> , 2018

#### 1.4.4 Importance industrielle des enzymes d'origine fongiques

Pour de nombreuses raisons, les enzymes d'origine fongique sont particulièrement adaptées aux applications industrielles (Østergaard et Olsen, 2011), en effet, ces enzymes ont également évolué naturellement pour fonctionner sous des conditions difficiles, ce qui les rend idéales pour les catalyseurs industriels (Østergaard et Olsen, 2011).

Les enzymes des champignons et des levures sont largement utilisées dans plusieurs préparations alimentaires par exemple pour améliorer le goût et la texture des aliments (Raveendran *et al.*, 2018), pour l'amélioration de la qualité de la boisson et pour la stabilisation de produits contenant des huiles végétales( Ahlawat *et al.*, 2018). Par exemple, la laccase, est importante dans diverses applications industrielles, telles que le blanchiment des colorants textiles le blanchiment de la pâte et la biorestauration, ce qui a fait de la laccase fongique une alternative plus respectueuse de l'environnement aux méthodes chimiques actuellement utilisées (Desai *et al.*, 2011).

Aussi, la laccase isolée du champignons filamenteux *Aspergillus* et de plusieurs autres espèces de basidiomycètes, notamment *Agaricus bisporus*, *Cerrena unicolor* est utilisée dans l'industrie alimentaire, pour stabiliser le vin ( Ahlawat *et al.*, 2018).

Les enzymes fongiques sont aussi utilisées dans les produits pharmaceutiques (Ghorai *et al.*, 2009), par exemple, la pénicillin acylase issu de *Penicillium* sp est utilisée dans la production de l'antibiotique pénicilline (Gurung *et al.*, 2013) et les xylanases extraire de *Penicillium canescens* sont utilisées dans l'industrie du papier (Assamoi *et al.*, 2009).

Les enzymes issues des champignons peuvent aussi participer dans la dégradation des matériaux indésirables tels que les déchets d'égouts provenant des parcs domestiques et industriels, les déchets végétaux, animaux et agricoles, les déversements d'hydrocarbures (Gopinath *et al.*, 2013).

#### **1.4.5 Importance industrielle des enzymes d'origine bactérienne**

Les bactéries sont des organismes très utilisées pour la production à grande échelle de protéines commercialement importantes en raison, entre autres, de leur taux de croissance rapide et de leur capacité élevée à synthétiser les protéines (Quax, 2006).

Les enzymes bactériennes sont utilisées dans les industries alimentaires, comme par exemple dans la préparation des produits céréaliers, du chocolat et du sirop et dans les industries du nettoyage (Underkofler *et al.*, 1958). Elles ont aussi un rôle dans la bioremédiation et en médecine (Mukherjee et Roy, 2013).

Les espèces de *Bacillus* telles que *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus licheniformis* sont utilisées dans les cultures microbiennes industrielles pour la production d'une variété d'enzymes (Deb *et al.*, 2013) comme par exemple la  $\beta$ -amylase dérivée de *Bacillus licheniformis*, de *Bacillus stearothermophilus* et *Bacillus amyloliquefaciens* a de nombreuses applications dans différentes industries telles que l'alimentation, la fermentation, le textile et la fabrication du papier (Gurung *et al.*, 2013 ; Konsoula et Liakopoulou-Kyriakides, 2007). Aussi, elle est utilisée dans les industries de la boulangerie, de la brasserie, de la pâtisserie, des jus de fruits, du sirop d'amidon et dans la préparation des aides digestives (Ahlawat *et al.*, 2018).

Aussi, les lipases microbiennes sont produites par des levures, des champignons et des bactéries (Raveendran *et al.*, 2018). *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina* et *Burkholderia cepacia* sont les producteurs majeurs de lipases microbiennes utilisées dans différentes industries comme par exemple, les industries alimentaires, les industries des graisses et des huiles et les industries pharmaceutiques (Ahlawat *et al.*, 2018).

La protéase bactérienne est l'une des enzymes les plus importantes et peut être utilisée dans divers processus industriels (Hamza, 2017). La protéase alcaline extracellulaire bactérienne est très importante en raison de sa large application en industrie des détergents, industrie alimentaire, transformation du cuir et dégradation du biofilm (Bholay *et al.*, 2012), Parmi ces bactéries, *Bacillus* est une source intéressante de protéases industrielles (Hamza, 2017).

La majorité des enzymes industrielles actuellement utilisées ont une action hydrolytique (des hydrolases), qui sont utilisées pour la dégradation de diverses molécules (Gurung *et al.*, 2013). Les hydrolases ont un large éventail d'utilisations industrielles telles que la transformation des denrées alimentaires et des aliments pour animaux, synthèse de polymères, productions pharmaceutiques, fabrication de détergents, de papier et de textiles, et raffinerie de biocarburants (Thapa *et al.*, 2019).

## **2 Les hydrolases**

Les hydrolases sont des enzymes qui appartiennent à la classe (EC3) (voir la partie classification des enzymes), leur rôle est de catalysées la dégradation des molécules en coupant les liaisons covalentes (Ravindran et Jaiswal, 2018). telles que les liaisons peptidiques présentent dans les molécules protéiques (Bett *et al.*, 2015), les liaisons glycosidiques présentent par exemple dans les polysaccharides (Davies *et al.*, 1997), les liaisons ester présentent dans le cholestérol (Fickers *et al.*, 2008).

Le marché mondial des enzymes est actuellement dominé par les hydrolases (Robinson, 2015), 75% des enzymes sont des hydrolases (amylases, cellulases, hémicellulases, pectinases) et au niveau commercial, les protéases sont les plus importantes et représentent environ 40 % du total des ventes (Assamoi *et al.*, 2009). Les protéases sont toujours les enzymes dominantes en raison de leur utilisation répandue dans les industries des détergents et des produits laitiers (Gurung *et al.*, 2013).

Les enzymes de cette famille sont largement distribuées chez les procaryotes et les eucaryotes avec une diversité fonctionnelle importante (Sathya et Khan, 2014).

Parmi les hydrolases, les lipases par exemple et les amylases présentent des caractéristiques à intérêt industriel qui font d'elles des enzymes très recherchées dans

différentes industries et différentes applications industrielles (Mobini-Dehkordi et Javan, 2012 ; Ravindran et Jaiswal, 2018).

Les lipases forment une famille hétérogène d'enzymes capables d'hydrolyser les triglycérides à longues chaînes d'acides gras en glycérol et en acides gras correspondants (Fickers *et al.*, 2008 ). Les lipases sont essentielles dans l'industrie alimentaire, notamment l'industrie des huiles, des boissons, mais aussi dans l'industrie pharmaceutique (Chandra *et al.*, 2020 ). Les lipases microbiennes ont reçues une attention particulière en raison de leur stabilité dans les solvants organiques (Kumar *et al.*, 2012).

Les amylases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de l'amidon en produits de faible poids moléculaire (Konsoula et Liakopoulou-Kyriakides, 2007) Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent les molécules d'amidon pour produire une variété de produits, notamment des dextrans et des polymères de plus en plus petits composés d'unités de glucose (Naidu et Saranraj, 2013). Les amylases ont des applications dans de nombreux procédés industriels, tels que les industries alimentaires, pharmaceutiques les industries de la boulangerie, du papier, du textile et des détergents (Souza et Magalhães, 2010 ; Naidu et Saranraj, 2013). Ces enzymes peuvent être obtenues à partir de plantes, d'animaux et des microorganismes. Cependant, les enzymes d'origine fongique et bactérienne dominent les applications dans le secteur industriel (Souza et Magalhães, 2010).

Pour cela l'objectif de notre travail et de rechercher et caractériser des lipases et des amylases à intérêt industriel chez 3 souche de références *E.coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).



# *Matériels et méthodes*

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie de l'Université Belhadj Bouchaib - Ain Temouchent (UBBAT) durant le second semestre du Master 2 de l'année universitaire 2020/2021.

## **1 Préparation des milieux de culture**

### **1.1 Préparation du Bouillon nutritif**

Le Bouillon Nutritif (BN) a été préparé par la dissolution de 8g de la poudre de ce milieu (Conda Nutrient Broth) dans 1L d'eau distillée.

### **1.2 Préparation de la gélose nutritive**

La gélose nutritive (GN) a été préparée par la dissolution de 23 g de la poudre de ce milieu (Conda Nutrient Agar) dans 1L d'eau distillée.

## **2 Purification des souches de références et préparation de leurs extraits bruts enzymatiques**

Pour la recherche et la caractérisation des activités lipasique et amylasique, 3 souches de référence ont été utilisées à savoir *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Les extraits bruts enzymatiques des 3 souches de références ont été testés pour leurs activité lipasique et amylasique. Ces extraits sont préparés par ensemencement de 50 mL de BN avec 1 mL d'une pré-culture de 24h.

Après incubation de 24h à 37° C, les surnageants ont été récupérés par centrifugation des suspensions bactériennes à 6000 rpm pendant 5 min. Les surnageants sont conservés à 4°C.

### **2.1 Recherche et caractérisation d'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques des 3 souches de référence**

Dans cette étude l'activité enzymatique lipolytique des différentes souches de références a été déterminée par la méthode Titration par NaOH (Schnatz, 1964).

Les lipases (triacylglycérol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) appartiennent à la famille des hydrolases et agissent sur les liaisons esters d'acides carboxyliques. La fonction naturelle de lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, graisses acides et glycérol (Houde *et al.*, 2004) selon la réaction suivante :



La recherche et la caractérisation de l'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques ont été effectuées par étude de l'influence des différentes températures et des différents pH. Ensuite la stabilité des lipases au traitement thermique a été étudiée.

L'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques des 3 souches de références a été recherchée selon la méthode de Rajeswari *et al.*, (2010) et Selvam *et al.*, (2011). Le milieu réactionnel a été préparé comme suit :

à 3 mL d'huile d'olive (substrat) sont ajoutées 2,5 mL d'eau distillée et 1 mL de solution tampon phosphate à 0,2 M et pH 7,2. Ensuite, 1 mL d'extrait brut enzymatique des 3 souches ont été ajoutées. Après incubation de 30 min à 37 ° C, la réaction est arrêtée par l'ajout de 3 mL d'éthanol (95%) (Kermasha *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 2015).

Le blanc a été préparé dans la même condition que le test sauf que l'extrait enzymatique a été ajouté après que la réaction enzymatique soit arrêtée par l'éthanol.

La quantité des acides gras libérés par l'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques est mesurée par titration avec du NaOH à 200 mM, après l'ajout de 4 gouttes de phénophtaléine (indicateur de virage de couleur) (Kermasha *et al.*, 1993 ; Ginalska *et al.*, 2004; Prazeres *et al.*, 2006 ).

### **2.1.1 Influence de la température sur l'activité lipasique des extraits enzymatiques bruts des 3 souches de référence**

Dans le but de déterminer l'effet de la température d'incubation sur l'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques, le mélange réactionnel est incubé à différentes température (4 °C, 20 °C, 37 °C, 45 °C) pendant 30 min.

Ensuite, la quantité des acides gras libérés par l'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques est mesurée comme décrit précédemment.

### **2.1.2 Influence du pH sur l'activité lipasique des 3 souches de référence**

Afin d'évaluer l'influence du pH de la réaction sur l'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques, les pHs 5, 7,2 et 8,4 ont été testés. Ensuite, la quantité des acides gras libérés par l'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques est mesurée comme décrit précédemment.

### **2.1.3 Test de la stabilité thermique des lipases des extraits enzymatiques bruts des 3 souches de référence**

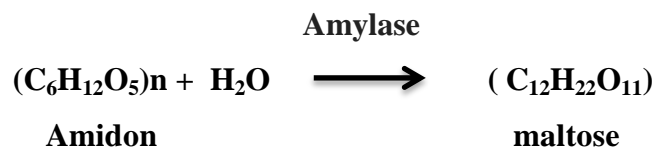
L'étude de la stabilité thermique est déterminée par la mesure de l'activité lipasique résiduelle des extraits bruts enzymatiques des 3 souches de référence après traitement thermique au bain marie à 90 °C pendant 1h et 2h (Ginalska *et al.*, 2004 ).

La quantité des acides gras libérés par l'activité résiduelle lipasique des extraits bruts enzymatiques est mesurée comme décrit précédemment.

## **2.2 Recherche et caractérisation d'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques des 3 souches de référence**

La recherche et la caractérisation de l'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques ont été effectuées par étude de l'influence des différentes températures et des différents pH. Ensuite la stabilité des lipases au traitement thermique a été étudiée.

L'hydrolyse de l'amidon par les amylases permet la rupture des liaisons glycosidiques en ajoutant une molécule d'eau pour chaque liaison rompue (Kameda *et al.*, 2009 ) ce qui conduit à la formation de maltose (disaccharide) (Park *et al.*, 2018 ;Anbu *et al.*, 2017) selon la réaction suivante :



L'activité amylasique des extraits bruts a été déterminée selon la méthode de (Caraway., 1959) qui utilise l'iode/iodure de potassium (IKI) (Lugol) comme révélateur et l'amidon comme substrat.

La préparation du substrat se fait par liquéfaction de l'amidon, en ajoutant 40 mL d'une solution d'amidon soluble à 1 % à 50 mL d'eau bouillante. Après agitation, la solution d'amidon est laissée refroidir, ensuite un volume d'eau distillée est ajouté pour arriver à un volume final de 100 mL (Afiukwa *et al.*, 2009).

1 volume de cette solution d'amidon préparée est dilué 10 fois avec de l'eau distillée pour être utilisé comme solution substrat dans la recherche et la caractérisation de l'activité amylasique (Afiukwa *et al.*, 2009).

Le milieu réactionnel a été préparé comme suit :

A 0,1 mL de la solution d'amidon préparée, sont ajoutés 750 µL de tampon phosphate (pH 7,2 et 0,1 M) et 0,4 mL de l'extrait brut enzymatique. Le mélange est incubé à 37 °C pendant 30 min.

Ensuite, 750 µL de Lugol sont ajoutés au milieu réactionnel, ensuite à 1 mL de ce mélange réactionnel, sont ajoutés 1,5 mL d'HCl à 10% afin de stopper la réaction (Afiukwa *et al.*, 2009 ), et les DO sont mesurées à 620 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions afin de déterminer la quantité d'amidon dégradée.

### 2.2.1 Courbe d'étalonnage de l'amidon

Afin d'établir la courbe étalon  $DO=f([\text{amidon}])$  et déterminer la quantité d'amidon dégradée par les amylases des trois souches de référence, une gamme étalon est préparée (20 à 100 µg/mL) à partir d'une solution mère d'amidon (400 µg/mL)

**Tableau4** : Différentes concentrations utilisée pour la préparation de la courbe étalon de l'amidon

Solutions étalons d'amidon 20 à 100 µg/mL	0	20	40	60	80	100	120	140
Solution mère d'amidon 400µg/mL	0	0,1 mL	0,2 mL	0,3 mL	0,4 mL	0,5 mL	0,6 mL	0,7 mL
Eau distillé	2 mL	1,9 mL	1,8 mL	1,7 mL	1,6 mL	1,5 mL	1,7mL	1,8mL

### **2.2.2 Influence de la température sur l'activité amylasique des extraits enzymatiques bruts des 3 souches de référence**

Dans le but de déterminer l'effet de la température d'incubation sur l'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques, le mélange réactionnel est incubé à différentes températures (4 °C, 20 °C, 37 °C, 45 °C) pendant 30 min. La quantité d'amidon dégradée par l'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques est mesurée comme décrit précédemment.

### **2.2.3 Influence du pH sur l'activité amylasique des extraits enzymatiques bruts des 3 souches de référence**

Afin d'évaluer l'influence du pH de la réaction sur l'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques, les pHs 5, 7,2 et 8,4 ont été testés. La quantité d'amidon dégradée par l'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques est mesurée comme décrit précédemment.

### **2.2.4 Test de la stabilité thermique des amylases des extraits enzymatiques bruts des 3 souches de référence**

L'étude de la stabilité thermique est déterminée par la mesure de l'activité amylasique résiduelle des extraits bruts enzymatiques des 3 souches de référence après traitement thermique au bain marie à 90 °C pendant 1h et 2h (Kiran *et al.*, 2018).

La quantité d'amidon dégradée par l'activité résiduelle amylasique des extraits bruts enzymatiques est mesurée comme décrit précédemment.

## *Résultats et discussions*

## **1 Recherche et caractérisation d'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques des 3 souches de référence**

La recherche d'activité lipasique de l'extrait brut enzymatique des souches de référence a été effectuée selon la méthode de quantification des acides gras libérés par les lipases en utilisant du NaOH pour la titration (Schnatz, 1964).

Le résultat obtenu a révélé la présence d'activité lipasique avec une libération, à 37° C et pH 7, de 205,3333 mM/mL d'acides gras pour l'extrait enzymatique de la souche *Escherichia coli*, 74,66667 mM/mL pour l'extrait enzymatique de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* et 56 mM/mL pour l'extrait enzymatique de la souche de *Staphylococcus aureus*.

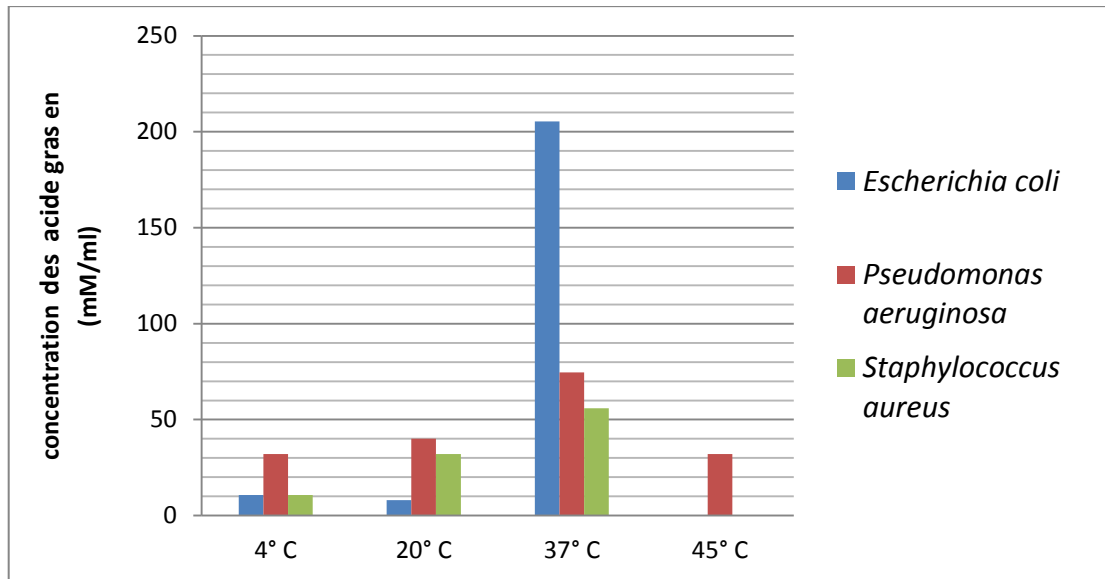
Ensuite cette activité a été caractérisée par étude de l'influence de la température et du pH sur son activité et le traitement thermique sur sa stabilité.

### **1.1 Influence de la température sur l'activité lipasique des extraits enzymatiques bruts des souches de référence**

L'effet de la température sur l'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques des trois souches de référence a été déterminé par incubation des milieux réactionnels à différentes températures (4° C, 20° C, 37° C et 45° C).

Les résultats obtenus (Figure 4) montrent que les extraits enzymatiques des trois souches possèdent une activité lipasiques optimale à 37° C. Des résultats proches, d'activité enzymatique optimale à 37° C ont été aussi trouvés pour ces souches. En effet, il a été montré, par exemple, que les lipases d'une souche de *Pseudomonas* sp. possédait une activité optimale à 35° C (Rashid *et al.*, 2001), aussi, une lipase de *Staphylococcus aureus* possédait un éventail optimal d'activité entre 33° C et 39° C (O'Leary et Weld., 1964). Pour la souche d'*Escherichia coli* il a été montré que certaines enzymes comme Trans-Succinylase possédaient une activité optimale à 37° C (Ron et Shani., 1971).





**Figure 4:** influence de la température sur l'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques des trois souches de référence.

Les 3 souches de référence possèdent une température optimale de croissance ou une température de bonne croissance de 37° C (Doyle et Schoeni 1984, Onyango *et al.*, 2012 ; LaBauve et Wargo, 2012), et qui peut expliquer le résultat de cette température optimale de 37° C, pour l'activité lipasique des 3 souches de référence.

Les résultats montrent aussi que cette activité lipasique est moins forte aux 3 autres températures testées (4° C, 20° C et 45° C) comparé à l'activité à 37° C et ceci pour les extraits des 3 souches testées. Des résultats similaires trouvés pour les lipases de la levure *Yarrowia lipolytica*, indiquent que ces enzymes possèdent une activité plus faible à des températures inférieures et supérieures à 37° C (Destain *et al.*, 1997).

Pour l'extrait de la souche de référence *Escherichia coli*, à la température 45° C d'incubation, l'activité lipasique est nulle. Cependant, l'étude de Ron et Shani (1971) sur l'enzyme Trans-Succinylase d'*Escherichia coli* a montré que lorsque la température atteint une valeur comprise entre 42 et 45 ° C, l'activité enzymatique dans la cellule chute soudainement. Aussi aux températures de 4 et 20° C l'extrait de la souche *Escherichia coli* présente une activité presque nulle.

Pour l'extrait de la souche *Pseudomonas aeruginosa*, on remarque que l'activité lipasique est détectée à toutes les températures testées. Les résultats des travaux de Gügi *et al* (1991) sur l'effet de la température de croissance sur plusieurs activités enzymatiques, chez la

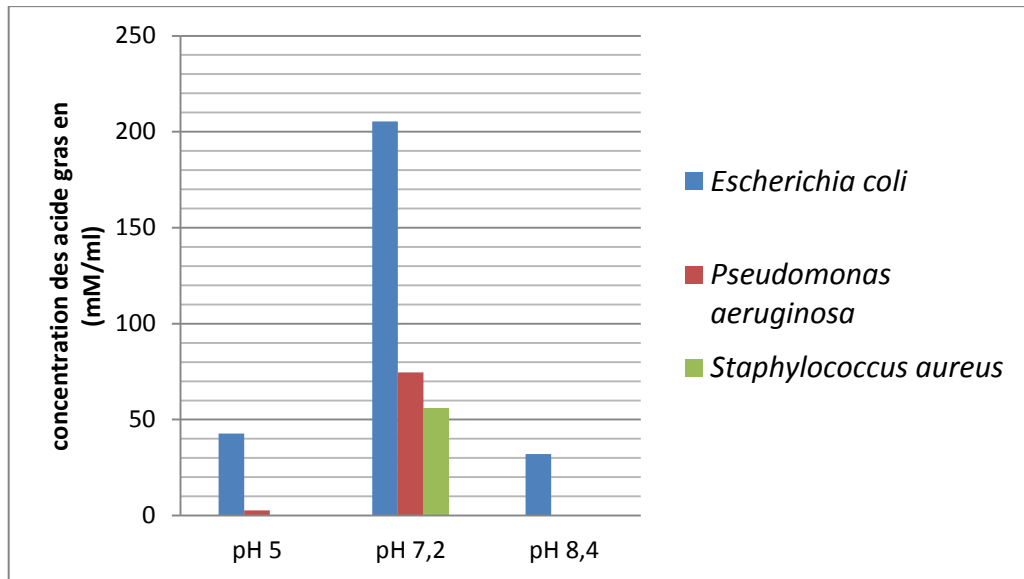
bactérie *Pseudomonas fluorescens*, ont indiqué que les changements observés dans les activités enzymatiques sont dus à l'influence spécifique de la température de croissance.

Comme il est montré dans la Figure 04 la température optimale de l'activité lipasique de la souche *Pseudomonas aeruginosa* est de 37° C, une température à laquelle cette souche pousse bien (LaBauve et Wargo., 2012), ce qui peut expliquer le résultat de cette température optimale. Aussi, cette souche peut survivre à un large éventail de températures de 4° C à 42° C (LaBauve et Wargo., 2012), ce qui peut expliquer la présence d'activité lipasique aux températures de 4° C à 45° C. De plus, un large éventail de températures d'activité a été aussi montré chez d'autres bactéries par exemple, les lipases de *bacterium Chryseobacterium polytrichastri* possèdent un éventail de températures allant de 5 à 65 ° C avec une température optimale de 37 ° C (Kumar *et al.*, 2020). Par contre, pour l'extrait de la souche *Escherichia coli*, l'activité n'est qu'à la température d'incubation de 37° C.

L'extrait de la souche de *Staphylococcus aureus*, présente une faible activité à 4° C et une activité nulle à 45° C, alors qu'il a été montré que la lipase de *Staphylococcus aureus*, présente une activité sur un large éventail de température, allant de 4° C à 45° C (O'Leary et Weld., 1964).

## **1.2 Influence du pH sur l'activité lipasique des souches de référence**

Pour déterminer l'effet du pH sur l'activité lipasique des extraits enzymatiques bruts des trois souches des tests d'activité à différentes valeurs de pH 5, 7,2, 8,4 ont été utilisés.



**Figure 5:** influence des différents pH sur l'activité lipasique des extraits bruts enzymatiques des trois souches de référence.

Les résultats obtenus (Figure 05) montrent que les extraits enzymatiques des trois souches possèdent une activité lipasique optimale à pH 7,2. Des résultats proches ont été trouvés pour les activités lipasiques optimales des bactéries. Par exemple, les lipases de la souche *Staphylococcus epidermidis* atteignent leurs activités maximales à pH 7 (Esakkiraj *et al.*, 2010), et celles de *Pseudomonas cepacia* possède un pH optimal à pH 6,5 (Sugihara *et al.*, 1992).

On remarque que pour la souche *Escherichia coli*, l'activité lipasique est présente aux différents pHs testés, mais elle a diminué drastiquement à pH 5 et pH 8,4. Tandis que cette activité disparaît complètement pour les extraits enzymatiques des deux souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, les résultats obtenus ne sont pas en accord avec les résultats de Dharmstithi et Kuhasuntisuk (1998), qui ont montré que la lipase de *Pseudomonas aeruginosa* garde une bonne activité à pH 8 et un éventail de pH qui varie de 3 à 9.

### 1.3 Test de la stabilité thermique des lipases des extraits enzymatiques bruts des souches de référence

Pour tester la stabilité thermique des lipases des extraits bruts enzymatiques des trois souches de référence, des traitements ont été effectués à 90° C pendant 1 h et 2 h.

Les résultats du traitement thermique à 90° C des extraits bruts enzymatiques des trois souches de références montrent qu'aucune activité résiduelle n'a été détectée après 1 h et 2 h de traitement. Ce qui montre que les lipases des trois souches de référence sont thermosensibles. Des lipases thermosensibles ont été déjà trouvées chez des bactéries, par exemple, la lipase de *Serratia marcescens* a été complètement inactivée à 90° C (Abdou, 2003), aussi l'étude de Guncheva *et al.*, (2013) indique l'absence de l'activité de la lipase de *Bacillus Stearothermophilus* après son incubation à 90° C pendant une heure. La lipase purifiée de *Bacillus pumilus* perdait 52 % de sa stabilité après traitement à 70 ° C (Kumar *et al.*,2012).

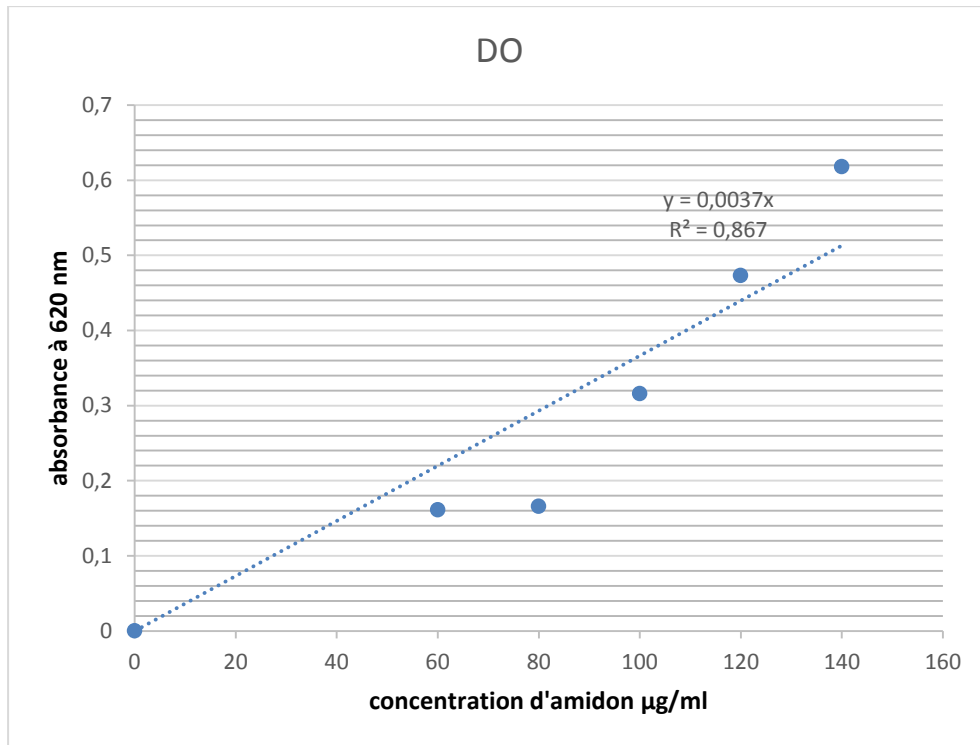
Les lipases microbiennes sont d'une grande importance commerciale grâce à leur grande polyvalence et leur grande stabilité (Bacha *et al.*, 2018), En général, les lipases ont des applications prometteuses dans le traitement chimique organique, la formulation de détergents, synthèse de biosurfactants, industrie agrochimique, papeterie, nutrition, cosmétique et traitement pharmaceutique (Shariff *et al.*, 2011).

Les résultats obtenus montrent que les lipases des extraits bruts enzymatiques des trois souches de référence ne sont pas thermostables ce qui les rend inutilisables dans les applications industrielles nécessitant des températures élevées telles que l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie chimique (Fickers *et al.*, 2008).

## **2 Recherche et caractérisation d'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques des 3 souches de référence**

La recherche d'activité amylasique de l'extrait brut enzymatique des souches de référence a été effectuée selon la méthode de Caraway, (1959), qui utilise l'iode/iodure de potassium (IKI) (Lugol) comme révélateur et l'amidon comme substrat.

L'activité amylasique des extraits bruts des trois souches de référence a été mesurée par détermination de la quantité de l'amidon dégradée par les amylases présentes dans l'extrait brut enzymatique des 3 souches de référence. Les DO obtenues à 620 nm sont ensuite converties en concentration en utilisant la courbe étalon de l'amidon (Figure 07).



**Figure 6:** Courbe étalon de l'amidon

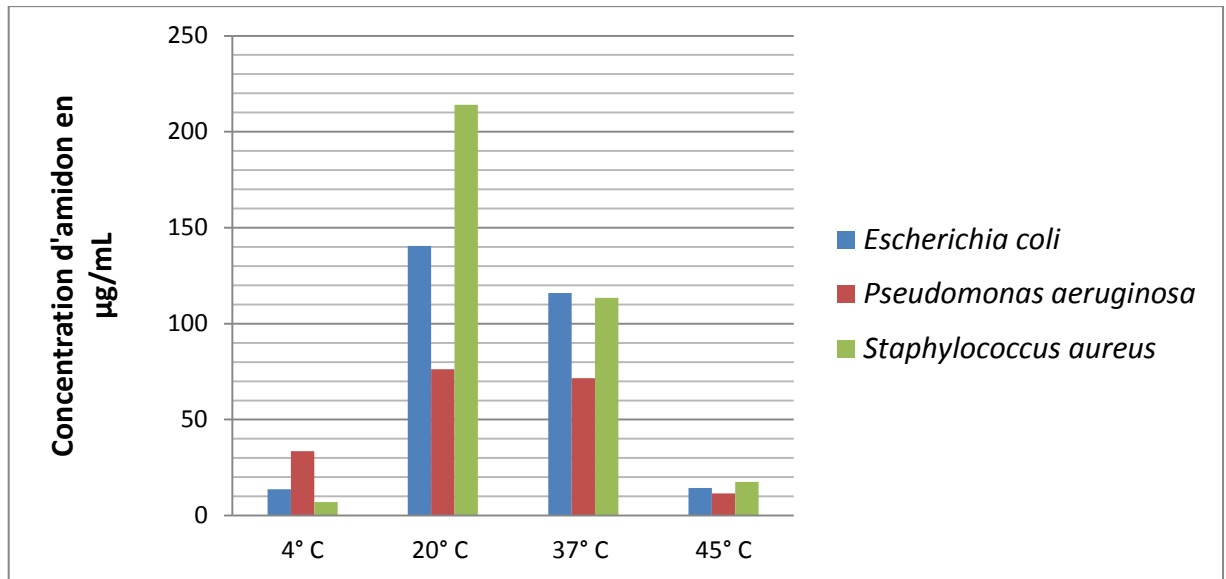
Les résultats obtenus (Figure 07) montrent la présence d'activité amylasiques avec une dégradation, à la température de 37 ° C et pH 7,2 de 115,945 µg/mL d'amidon par l'extrait brut enzymatique de la souche *Escherichia coli*, de 71,621 µg/mL d'amidon par l'extrait brut enzymatique de la souche *Pseudomonas aeruginosa* et de 113,513 µg/mL d'amidon par l'extrait brut enzymatique de la souche *Staphylococcus aureus*.

Ensuite cette activité a été caractérisée par étude de l'influence de la température et du pH sur son activité et le traitement thermique sur sa stabilité.

### **2.1. Influence de la température sur l'activité amylasique des extraits enzymatiques bruts des souches de référence**

L'effet de la température sur l'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques des trois souches de référence a été déterminé par incubation des milieux réactionnels à différentes températures (4° C, 20° C, 37° C et 45° C).

Les résultats obtenus (Figure 07) montrent que les extraits enzymatiques des trois souches de référence possèdent le même profil de l'influence de la température sur leur activité amylasique.



**Figure 7:** influence de la température sur l'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques des trois souches de référence.

Ces résultats montrent aussi que les extraits enzymatiques des trois souches possèdent une activité amylasique optimale à 20° C, des résultats proches ont été trouvés pour les amylases de *Pseudomonas balearica* avec une température optimale d'activité à 25° C  $2 \pm ^\circ$  C (Kizhakedathil, 2021). Une température optimale de 20 ° C a été aussi trouvée pour une enzyme (lipase) produite par la souche *Staphylococcus epidermidis* (Joseph *et al.*, 2006).

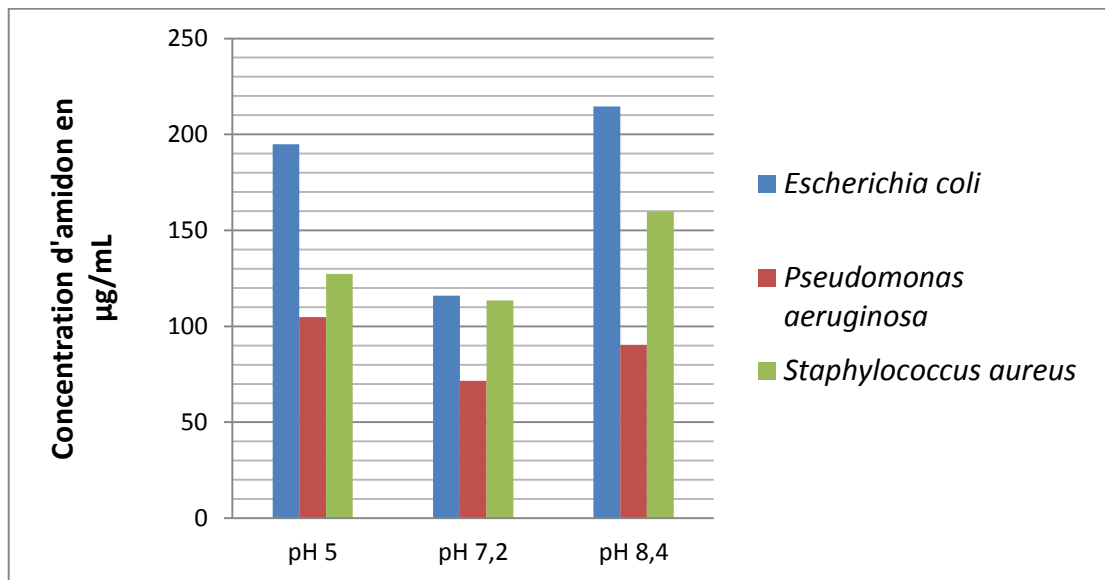
On remarque que l'activité amylasique reste bonne à 37° C et ceci pour les extraits enzymatique des trois souches de référence, l'activité à cette température est proche de celle de la température optimale (20° C). Des résultats ont montré que la température optimale des amylases est de 37° C pour la souche *Pseudomonas luteola* (Khannous *et al.*, 2014), et aussi les amylases de *Halomonas meridiana* qui ont montré un maximum d'activité à la température 37° C (Coronado *et al.*, 2000).

Pour les 2 autres températures testées 4° C et 45 ° C, l'activité amylasique est fortement affectée et ceci pour les extraits enzymatique des trois souches de référence.

Contrairement aux résultats obtenus dans cette étude et qui montrent que les amylases des 3 souches perdent leurs activités à 45° C, il existe des amylases thermophiles qui montrent une activité maximale à des températures élevées comme le cas des amylases produites par *Aspergillus niger* qui possède une bonne activité à 60° C (Weerasooriya et Piyarathne, 2019).

## 2.1 Influence du pH sur l'activité amylasique des extraits enzymatiques bruts des souches de référence

Pour déterminer l'effet du pH sur l'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques des 3 souches, des mesure d'activité à différents pHs (pH 5, pH 7,2, pH 8,4) ont été effectuées.



**Figure 8:** Influence des différents pH sur l'activité amylasique des extraits bruts enzymatiques des trois souches de référence.

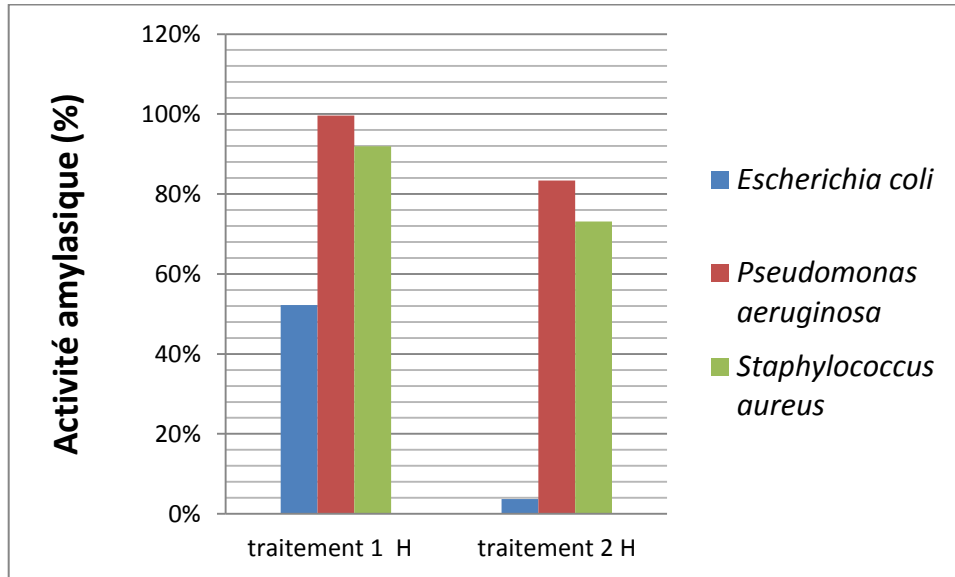
Les résultats obtenus (Figure 08) montrent que les extraits enzymatiques des trois souches de référence ont une bonne activité amylasique aux différents pHs testés.

Les deux souches de références *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* possèdent une activité amylasique optimale à pH 8,4 avec une bonne activité détectée aux autres pH testés (5 et 8,4). Des amylases avec une large gamme de pHs d'activité a été déjà montré comme par exemple les amylases de *Pseudomonas stutzeri* qui possèdent un éventail de pH de 5 à 12 avec pH optimal à 8 (Maalej *et al.*, 2013).

La souche *Pseudomonas aeruginosa* montre une activité optimale à pH 5 et aussi avec une bonne activité détectée aux autres pH testés. Des amylases avec des pH acides optimaux ont été déjà trouvés comme par exemple les amylases trouvé chez *Bacillus* sp avec un pH optimal de 4 à 6 (Sajedi *et al.*, 2005).

## 2.2 Test de la stabilité thermique des amylases des extraits enzymatiques bruts des souches de référence

Pour tester la stabilité thermique des amylases des extraits bruts enzymatiques des trois souches de référence, des traitements ont été effectués à 90° C pendant 1 h et 2 h.



**Figure 9:** Effet du traitement thermique sur la stabilité des amylases des 3 souches de référence.

Les résultats obtenus (Figure 09) montrent que les amylases des extraits bruts enzymatiques des 2 souches de référence *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* maintiennent leurs stabilités lors des deux traitements de 1h et de 2h. Les amylases de la souche *Staphylococcus aureus* ont préservé 92% de leurs activités après 1h et 73% après 2h de traitement et les amylases de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ont préservé presque 100 % de leurs activités après 1h de traitement et 83% de leurs activités après 2h de traitement.

Concernant les amylases de la souche de référence *Escherichia coli*, les plus sensibles, n'ont préservé que 52% de leurs activités après 1 h de traitement et 4 % de leurs activités après 2 h de traitement.

Des travaux sur la stabilité des amylases des bactéries ont montré que les amylases extracellulaires des souches de *Bacillus licheniformis* sont thermostables et conservent plus de 98% de l'activité d'origine après traitement d'une heure à 85° C (Morgan et Priest, 1981),



des résultats proches de ce qu'on a trouvé pour les amylases des souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Par contre d'autres travaux ont montré par exemple que les amylases de la souche *Bacillus subtilis* (Kiran *et al.*, 2018 ) et de *Pseudomonas stutzeri* (Maalej *et al.*, 2013) sont moins stables que les amylases de nos souches de référence, et ces amylases ne gardent, respectivement, que 51% de leurs activités après traitement à 90° C et 6% de leur activité d'origine après traitement à 60° C (Kiran *et al.*, 2018 ).

Les résultats trouvés montrent que les amylases des extraits bruts des 2 souches de référence *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont thermostables ce qui permet leur utilisation potentielle dans les industries nécessitant des enzymes thermostables telles que l'industrie des sucres liquides (Kiran *et al.*, 2018) la production de sirop de glucose et de maltose, clarification des jus de fruits et saccharification de l'amidon (Christopher et Kumbalwar 2015 in (Ahlawat *et al.*, 2018).

### **3 Discussion générale**

Dans cette étude les lipases et les amylases de 3 souches de référence ont été recherchées et caractérisées.

Les lipases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons ester des lipides (Singh *et al.*, 2016), qui sont utilisées dans une variété d'industries, telles que les industries de l'alimentation, des biocarburants, des détergents et de l'alimentation animale (Raveendran *et al.*, 2018).

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent liaisons glucosidiques internes de l'amidon, du glycogène et des polysaccharides (Quax, 2006) qui sont utilisées dans une variété d'industries, telles que les industries de l'alimentation, du textile, du papier, des détergents (Khannous *et al.*, 2014).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent la présence des activités lipasiques et amylasiques dans les extraits bruts enzymatiques chez les 3 souches de référence testées.

Pour la souche de référence *Escherichia coli*, ces deux enzymes (lipases et amylases) ont montré une bonne activité dans les conditions standards c'est-à-dire 37 ° C et pH 7,2.

Par ailleurs ils ont montré différents profils lorsqu'ils ont été testés à différentes températures (4° C, 20 ° C et 45 ° C) et pHs (5, 8,4), par exemple, les lipases ont montré

une diminution d'activité à 20° C et à 4 ° C et une absence totale d'activité à 45 ° C, tandis que les amylases ont montré une meilleure activité à 20 ° C et une diminution à 4 ° C et 45 ° C.

Aussi dans les tests de pHs les lipases ont subi des diminutions d'activité à pH 5 et à pH 8,4 contrairement aux amylases qui ont montré de bonne activité à pH 5 et une activité maximale à pH 8,4.

Concernant le teste stabilité thermique les résultats montrent que les lipases de *Escherichia coli* sont thermosensible et ils ont perdu toutes leur activité après 1h de traitement à 90 ° C, alors que les amylases de cette souche ont gardé 52% de leurs activité après 1 h de traitement.

Comme c'est le cas pour *Escherichia coli*, les lipases et les amylases de la souche *Pseudomonas aeruginosa*, ont montré une bonne activité à 37° C et à pH 7,2 et des profils d'activités différents aux autres températures testées (4° C, 20 ° C, et 45 ° C) et aux autres pHs testés (5, 8,4). L'activité des lipases a diminué à ces 3 températures testées, alors que les amylases montrent une diminution seulement à 4° C et à 45° C, par contre, à 20 ° C l'activité est presque similaire que celle trouvé à 37 ° C.

Dans les tests de pHs les lipases ont montré une bonne activité à pH 7,2 et une activité nulle à pH 5 et pH 8,4, par contre les amylases ont montré une excellente activité à pH 5 et à pH 8,4.

Pour les tests de stabilité, les lipases de cette souche sont aussi thermosensibles et perdent leurs activités après le traitement thermique à 90° C. Par contre, les amylases de cette souche présentent une forte stabilité à ce traitement et conservent presque la totalité de leur activité après 1h de traitement.

Comme c'est le cas des 2 autres souches, les lipases et les amylases de la souche *Staphylococcus aureus* montrent une bonne activité dans les conditions standards (37° C et pH 7,2) et des profils différents aux autres températures testées (4° C, 20° C, et 45° C), ainsi qu'aux autres pHs testés (5 et 8,4).

L'activité des lipases diminue à 4 ° C et 20° C et disparaît carrément à 45° C, alors que les amylases montrent une meilleure activité à 20° C et diminue à 4° C et 45° C.

Ainsi que les tests de pHs influencent fortement les lipases de cette souche, l'activité des lipases à pH 5 et à pH 8,4 est nulle, alors que ce n'est pas le cas pour les amylases de cette souche qui montrent une bonne activité à pH 5, et une excellente activité à pH 8,4.

Comme c'est le cas des autres souches, les lipases de la souche *Staphylococcus aureus* sont thermosensibles, et perdent la totalité de leur activité suite au traitement thermique à 90° C, alors que les amylases présentent une bonne thermostabilité à 90° C et conservent 92% de leurs activités après 1h de traitement

**Tableau 5:** Tableau récapitulatif des résultats de la caractérisation de l'activité et de la stabilité des lipases et des amylases de 3 souches de référence.

	Souches	Activité enzymatique		Stabilité enzymatique (activité résiduelle)
		pH optimale	Température optimale	Stabilité à 90° C
<b>Lipases</b>	<i>E. coli</i>	7,2	37° C	Nulle
	<i>S. aureus</i>	7,2	37° C	Nulle
	<i>P. aeruginosa</i>	7,2	37° C	Nulle
<b>Amylases</b>	<i>E. coli</i>	8,4	20° C	Moyenne
	<i>S. aureus</i>	8,4	20° C	Forte
	<i>P. aeruginosa</i>	5	20° C	Forte

# *Conclusion et perspectives*

Afin de rechercher des activités enzymatique a intérêt industriel chez des souches de référence bactériennes, les activités lipasiques et amylasiques de l'extrait brut enzymatique de 3 souches de référence *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* ont été caractérisées en fonction de différentes températures (4° C, 20° C, 37° C, 45° C) et différents pHs (5, 7,2, 8,4). Leur stabilité thermique a été testée après traitement thermique.

- Les résultats obtenus de cette études ont montré que les extraits bruts enzymatiques des 3 souches de référence possèdent les activités lipasiques et amylasiques.

- Les extraits bruts enzymatiques des 3 souches de référence ont montré une bonne activité lipasique à 37° C et à pH 7,2 et une activité amylasique optimale à 20° C et à pH 8,4 pour les amylases d'*E. coli* et de *S. aureus* et une activité amylasique optimale à 20° C et à pH 5 pour les amylases de *P. aeruginosa*.

- Le test de stabilité au traitement thermique à 90° C a montré que les lipases des 3 souches de référence sont thermosensibles par contre les amylases de ces souches possèdent une bonne thermostabilité.

- Afin de trouver des enzymes d'origine bactérienne et qui présentent un intérêt industriel, des enzymes de souches bactériennes *extrêmophiles* peuvent être recherchées et caractérisées.

- Ensuite, ces enzymes doivent être purifiées afin de mieux les caractériser et pour les identifier et déterminer leurs structures.

- Les enzymes doit être testées en présence d'autres conditions industrielles comme par exemple une plus large gamme de pHs, de températures, en présence des ions, des solvants, des métaux lourd,..., etc.

# *Références bibliographiques*

1. **Abd Latip, M. A., Hamid, A. A. A., & Nordin, N. F. H. (2019).** Microbial hydrolytic enzymes: in silico studies between polar and tropical regions. *Polar Science*, 20, 9-18.
2. **Abdou, A. M. (2003).** Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratiamarcescens* lipase. *Journal of dairy science*, 86(1), 127-132.
3. **Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014).** Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
4. **Afiukwa, C. A., Ibiam, U. A., Edeogu, C. O., Nweke, F. N., & Chukwu, U. E. (2009).** Determination of amylase activity of crude extract from partially germinated mango seeds (*Mangifera oraphila*) T. *African Journal of Biotechnology*, 8(14).
5. **Ahlawat, S., Kumawat, M., & Babele, P. K. (2018).** Microbial enzymes in food technology. In *Enzymes in Food Technology* (pp. 1-17). Springer, Singapore.
6. **Ahmad, I. Z., Tabassum, H., Ahmad, A., & Kuddus, M. (2018).** Food Enzymes in Pharmaceutical Industry: Perspectives and Limitations. In *Enzymes in Food Technology* (pp. 41-62). Springer, Singapore.
7. **Alais, C., & Novak, G. (1968).** Étude d'un enzyme coagulant microbien dérivé de *Endothia parasitica*. I.-Propriétés biochimiques de l'enzyme coagulant Pfizer et propriétés rhéologiques des caillés formés dans le lait. *Le lait*, 48(477), 393-418.
8. **Anbu, P., Gopinath, S. C., Chaulagain, B. P., & Lakshmpriya, T. (2017).** Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2016.
9. **Arnosti, C. (2011).** Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle. *Annual review of marine science*, 3, 401-425.
10. **Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., & Loke, S. P. (2014).** Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(17), 7283-7297.
11. **Assamoi, A. A., Destain, J., & Thonart, P. (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1, 4-xylanases de moisissures: le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(2), 281-294.
12. **Bacha, A. B., Al-Assaf, A., Moubayed, N. M., & Abid, I. (2018).** Evaluation of a novel thermo-alkaline *Staphylococcus aureus* lipase for application in detergent formulations. *Saudi journal of biological sciences*, 25(3), 409-417.
13. **Barros, M., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. (2010).** Seed lipases: sources, applications and properties-a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(1), 15-29.

14. Bett, J. S., Ritorto, M. S., Ewan, R., Jaffray, E. G., Virdee, S., Chin, J. W., & Hay, R. T. (2015). Ubiquitin C-terminal hydrolases cleave isopeptide- and peptide-linked ubiquitin from structured proteins but do not edit ubiquitin homopolymers. *Biochemical Journal*, 466(3), 489-498.
15. Bholay, A. D., More, S. Y., Patil, V. B., & Niranjana, P. (2012). Bacterial extracellular alkaline proteases and its industrial applications. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(7), 1-5.
16. Bonnart, C., Deraison, C., Lacroix, M., & Hovnanian, A. (2010). L'élastase 2, une nouvelle protéase épidermique impliquée dans l'établissement de la barrière cutanée. *médecine/sciences*, 26(8-9), 681-685.
17. Cabrera, M. Á., & Blamey, J. M. (2018). Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. *Biological research*, 51.
18. Caraway, W. T. (1959). A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *American Journal of Clinical Pathology*, 32, 97-99.
19. Carillo, S., Pariat, M., Jariel-Encontre, I., Steff, A. M., & Piechaczyk, M. (1995). Le catabolisme protéique intracellulaire: une fonction biologique majeure. Partie I: les mécanismes de dégradation.
20. Chandra, P., Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1-42.
21. Concu, R., & Cordeiro, M. N. D. S. (2019). Alignment-free method to predict enzyme classes and subclasses. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5389.
22. Cooper, G. M. (2000). The central role of enzymes as biological catalysts. Sinauer Associates.
23. Coronado, M. J., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A., & Nieto, J. J. (2000). Production and biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS microbiology letters*, 183(1), 67-71.
24. Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*, 2, 53.
25. Davies, G. J., Wilson, K. S., & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321(Pt 2), 557.
26. Deb, P., Talukdar, S. A., Mohsina, K., Sarker, P. K., & Sayem, S. A. (2013). Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *SpringerPlus*, 2(1), 1-12.



27. Desai, S. S., Tennali, G. B., Channur, N., Anup, A. C., Deshpande, G., & Murtuza, B. A. (2011). Isolation of laccase producing fungi and partial characterization of laccase. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng*, 1(4), 543-549.
28. Destain, J., Roblain, D., & Thonart, P. (1997). Improvement of lipase production from *Yarrowialipolytica*. *Biotechnologyletters*, 19(2), 105-108.
29. Dharmsthiti, S., & Kuhasuntisuk, B. (1998). Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 75-80.
30. Doyle, M. P., & Schoeni, J. L. (1984). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 855-856.
31. Einav, T., Mazutis, L., & Phillips, R. (2016). Statistical mechanics of allosteric enzymes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(26), 6021-6037.
32. Enache, M. A. D., L. I. N., & Kamekura, M. A. S. A. H. I. R. O. (2010). Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Rom J Biochem*, 47(1), 46-59.
33. Esakkiraj, P., Rajkumarbharathi, M., Palavesam, A., & Immanuel, G. (2010). Lipase production by *Staphylococcus epidermidis* CMST-Pi 1 isolated from the gut of shrimp *Penaeus indicus*. *Annals of microbiology*, 60(1), 37-42.
34. Falch, E. A. (1991). Industrial enzymes—developments in production and application. *Biotechnology advances*, 9(4), 643-658.
35. Fickers, P., Destain, J., & Thonart, P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 12(2), 119-130.
36. Forestier, J. P. (1992). Les enzymes de l'espace extra-cellulaire du stratum corneum. *International journal of cosmetic science*, 14(2), 47-63.
37. Ghadessy, F. J., Ong, J. L., & Holliger, P. (2001). Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4552-4557.
38. Ghorai, S., Banik, S. P., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S., & Khowala, S. (2009). Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food research international*, 42(5-6), 577-587.
39. Gianfreda, L. (2015). Enzymes of importance to rhizosphere processes. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(2), 283-306.

40. **Ginalska, G., Bancercz, R., & Kornilowicz-Kowalska, T. (2004).** A thermostable lipase produced by a newly isolated Geotrichum-like strain, R59. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(4), 177-182.
41. **Gopinath, S. C., Anbu, P., Lakshmipriya, T., & Hilda, A. (2013).** Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed Research International*, 2013.
42. **Greenfield, L. M., Hill, P. W., Paterson, E., Baggs, E. M., & Jones, D. L. (2020).** Do plants use root-derived proteases to promote the uptake of soil organic nitrogen?. *Plant and soil*, 456(1), 355-367.
43. **Gügi, B., Orange, N., Hellio, F., Burini, J. F., Guillou, C., Leriche, F., & Guespin-Michel, J. F. (1991).** Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of bacteriology*, 173(12), 3814-3820
44. **Guncheva, M., Dimitrov, M., & Kambourova, M. (2013).** Excellent stability and synthetic activity of lipase from *B. stearothermophilus* MC7 immobilized on tin dioxide in environmentally friendly medium. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(6), 4317-4322.
45. **Guo, H., Suzuki, T., & Rubinstein, J. L. (2019).** Structure of a bacterial ATP synthase. *Elife*, 8, e43128.
46. **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.
47. **Hamza, T. A. (2017).** Bacterial protease enzyme: Safe and good alternative for industrial and commercial use. *Int. J. Chem. Biomol. Sci*, 3(1), 1-10.
48. **Herschlag, D., & Natarajan, A. (2013).** Fundamental challenges in mechanistic enzymology: progress toward understanding the rate enhancements of enzymes. *Biochemistry*, 52(12), 2050-2067.
49. **Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004).** Lipases and their industrial applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 118(1), 155-170.
50. **Iji, P. A., Saki, A., & Tivey, D. R. (2001).** Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 2. Development and characteristics of intestinal enzymes. *British Poultry Science*, 42(4), 514-522.
51. **Iqbal, M. J. (2018).** Role of osmolytes and antioxidant enzymes for drought tolerance in wheat. *Global Wheat Production*, 51.

- 52. Joseph, B., Ramteke, P. W., & Kumar, P. A. (2006).** Studies on the enhanced production of extracellular lipase by *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of general and applied microbiology*, 52(6), 315-320.
- 53. Kameda, E., Langone, M. A. P., de Queiroz Neto, J. C., & Coelho, M. A. Z. (2009).** Removal of polymeric filter cake in petroleum wells by enzymatic treatment. In *2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, Rio de Janeiro*.
- 54. Kermasha, S., Bisakowski, B., Ramaswamy, H., & Voort, F. V. D. (1993).** Comparison of microwave, conventional and combination heat treatments on wheat germ lipase activity. *International journal of food science & technology*, 28(6), 617-623.
- 55. Khannous, L., Jrad, M., Dammak, M., Miladi, R., Chaaben, N., Khemakhem, B., ...&Fendri, I. (2014).** Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions. *Lipids in health and disease*, 13(1), 1-9.
- 56. 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.
- 57. Kizhakedathil, M. P. J. (2021).** Acid stable  $\alpha$ -amylase from *Pseudomonas balearica* VITPS19—Production, purification and characterization. *Biotechnology Reports*, 30, e00603.
- 58. Konsoula, Z., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007).** Co-production of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98(1), 150-157.
- 59. Krishnamoorthi, R., Gong, Y., & Richardson, M. (1990).** A new protein inhibitor of trypsin and activated Hageman factor from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seeds. *FEBS letters*, 273(1-2), 163-167.
- 60. Kumar, A., Mukhia, S., Kumar, N., Acharya, V., Kumar, S., & Kumar, R. (2020).** A broad temperature active lipase purified from a psychrotrophic bacterium of sikkim himalaya with potential application in detergent formulation. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 642.
- 61. Kumar, R., Sharma, A., Kumar, A., & Singh, D. (2012).** Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production, purification and some properties. *World Appl. Sci. J*, 16(7), 940-948.

- 62. Kumari, U., Singh, R., Ray, T., Rana, S., Saha, P., Malhotra, K., & Daniell, H. (2019).** Validation of leaf enzymes in the detergent and textile industries: launching of a new platform technology. *Plant biotechnology journal*, 17(6), 1167-1182.
- 63. Kunamneni, A., Ravuri, B. D., Ellaiah, P., Prabhakar, T., & Saisha, V. (2008).** Urokinase-A strong plasminogen activator. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3(3), 58-70.
- 64. LaBauve, A. E., & Wargo, M. J. (2012).** Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protocols in microbiology*, 25(1), 6E-1.
- 65. Li, J., Wang, T., Xia, J., Yao, W., & Huang, F. (2019).** Enzymatic and nonenzymatic protein acetylations control glycolysis process in liver diseases. *The FASEB Journal*, 33(11), 11640-11654.
- 66. Linka, N., & Weber, A. P. (2010).** Intracellular metabolite transporters in plants. *Molecular plant*, 3(1), 21-53.
- 67. Liu, X., & Kokare, C. (2017).** Microbial enzymes of use in industry. In *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 267-298). Academic Press.
- 68. Liu, Y., Li, R., Xiao, X., & Wang, Z. (2019).** Molecules that inhibit bacterial resistance enzymes. *Molecules*, 24(1), 43.
- 69. Maalej, H., Hmidet, N., Ghorbel-Bellaaj, O., & Nasri, M. (2013).** Purification and biochemical characterization of a detergent stable  $\alpha$ -amylase from *Pseudomonas stutzeri* AS22. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(5), 878-887.
- 70. Mamboya, E. A. F. (2012).** Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(2), 99-104.
- 71. McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2014).** Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. *The FEBS journal*, 281(2), 583-592.
- 72. Mintz-Oron, S., Meir, S., Malitsky, S., Ruppin, E., Aharoni, A., & Shlomi, T. (2012).** Reconstruction of Arabidopsis metabolic network models accounting for subcellular compartmentalization and tissue-specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1), 339-344.
- 73. Mobini-Dehkordi, M., & Javan, F. A. (2012).** Application of alpha-amylase in biotechnology. *Journal of Biology and today's world*, 1(1), 39-50.
- 74. Morgan, F. J., & Priest, F. G. (1981).** Characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. *Journal of Applied Bacteriology*, 50(1), 107-114.

- 75. Mukherjee, P., & Roy, P. (2013).** Copper enhanced monooxygenase activity and FT-IR spectroscopic characterisation of biotransformation products in trichloroethylene degrading bacterium: *Stenotrophomonas maltophilia* PM102. *BioMed research international*, 2013.
- 76. Müller, V. (2001).** Bacterial fermentation. e LS.
- 77. Naidu, M. A., & Saranraj, P. (2013).** Bacterial amylase: a review. *Int J Pharm Biol Arch*, 4(2), 274-287.
- 78. Nigam, P. S. (2013).** Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, 3(3), 597-611.
- 79. O'Leary, W. M., & Weld, J. T. (1964).** Lipolytic activities of staphylococcus aureus: I. Nature of the Enzyme Producing Free Fatty Acids From Plasma Lipids. *Journal of bacteriology*, 88(5), 1356-1363.
- 80. Onyango, L. A., Dunstan, R. H., Gottfries, J., Von Eiff, C., & Roberts, T. K. (2012).** Effect of low temperature on growth and ultra-structure of *Staphylococcus* spp. *PLoS One*, 7(1), e29031.
- 81. Østergaard, L. H., & Olsen, H. S. (2011).** Industrial applications of fungal enzymes. In *Industrial applications* (pp. 269-290). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 82. Park, S. H., Na, Y., Kim, J., Dal Kang, S., & Park, K. H. (2018).** Properties and applications of starch modifying enzymes for use in the baking industry. *Food science and biotechnology*, 27(2), 299-312.
- 83. Paul, P. E. V., Sangeetha, V., & Deepika, R. G. (2019).** Emerging trends in the industrial production of chemical products by microorganisms. In *Recent developments in applied microbiology and biochemistry* (pp. 107-125). Academic Press.
- 84. Prazeres, J. N. D., Cruz, J. A. B., & Pastore, G. M. (2006).** Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 505-509.
- 85. Quax, W. J. (2006).** Bacterial enzymes. *Prokaryotes*, 1, 777-796.
- 86. Raines, C. A. (2003).** The Calvin cycle revisited. *Photosynthesis research*, 75(1), 1-
- 87. Rajeswari, T., Palaniswamy, M., Raphy, P., & Padmapriya, B. (2010).** Utilization of mixed agroindustrial by-products for alkaline lipase production from *Penicillium chrysogenum*.
- 88. Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H., & Imanaka, T. (2001).** Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4064-4069.

- 89. Raveendran, S., Parameswaran, B., Beevi Ummalya, S., Abraham, A., Kuruvilla Mathew, A., Madhavan, A., ... & Pandey, A. (2018).** Applications of microbial enzymes in food industry. *Food technology and biotechnology*, 56(1), 16-30.
- 90. Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2018).** Enzymes in bioconversion and food processing. In *Enzymes in Food Technology* (pp. 19-40). Springer, Singapore.
- 91. RL Morlighem, J. É., Huang, C., Liao, Q., Braga Gomes, P., Daniel Pérez, C., De Brandão Prieto-da-Silva, Á., ... & Radis-Baptista, G. (2018).** The holo-transcriptome of the zoantharian protopalpythoa variabilis (cnidaria: Anthozoa): A plentiful source of enzymes for potential application in green.
- 92. Robinson, P. K. (2015).** Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1.
- 93. Romani, A. M., Fischer, H., Mille-Lindblom, C., & Tranvik, L. J. (2006).** Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. *Ecology*, 87(10), 2559-2569.
- 94. Ron, E. Z., & , M. (1971).** Growth rate of Escherichia coli at elevated temperatures: reversible inhibition of homoserine trans-succinylase. *Journal of bacteriology*, 107(2), 397-400.
- 95. Ryu, K., Kim, J., & Dordick, J. S. (1994).** Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. *Enzyme and microbial technology*, 16(4), 266-275.
- 96. Sajedi, R. H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A., & Moradian, F. (2005).** A Ca-independent  $\alpha$ -amylase that is active and stable at low pH from the Bacillus sp. KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(5-6), 666-671.
- 97. Sathya, T. A., & Khan, M. (2014).** Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry. *Journal of food science*, 79(11), R2149-R2156.
- 98. Schmitt, D. L., & An, S. (2017).** Spatial organization of metabolic enzyme complexes in cells. *Biochemistry*, 56(25), 3184-3196.
- 99. Schnatz, J. D. (1964).** Automatic titration of free fatty acids. *Journal of lipid research*, 5(3), 483-486.
- 100. Selvam, K., Vishnupriya, B., & Bose, V. S. C. (2011).** Screening and quantification of marine actinomycetes producing industrial enzymes amylase, cellulase and lipase from south coast of India. *Int J Pharma Biol*, 2, 1481-1487.



101. **Shariff, F. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M., & Salleh, A. B. (2011).** A newly isolated thermostable lipase from *Bacillus* sp. *International journal of molecular sciences*, 12(5), 2917-2934.
102. **Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016).** Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 1-15.
103. **Singu, B., & Annapure, U. (2018).** Role of enzymes in pharmaceutical and biotechnology industries. In *Enzymes in Food Technology* (pp. 167-185). Springer, Singapore.
104. **Souza, P. M. D., & Magalhães, P. D. O. (2010).** Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*, 41, 850-861.
105. **Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S., & Tominaga, Y. (1992).** thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. *The Journal of Biochemistry*, 112(5), 598-603.
106. **Tao, Z., Dong, B., Teng, Z., & Zhao, Y. (2020).** The classification of enzymes by deep learning. *IEEE Access*, 8, 89802-89811.
107. **Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F. C., Al Nasr, K., ... & Zhou, S. (2019).** Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular biotechnology*, 61(8), 579-601.
108. **Trivedi, P. C., Bartlett, J. J., & Pulinilkunnil, T. (2020).** Lysosomal biology and function: modern view of cellular debris bin. *Cells*, 9(5), 1131.
109. **Underkofler, L. A., Barton, R. R., & Rennert, S. S. (1958).** Production of microbial enzymes and their applications. *Applied microbiology*, 6(3), 212.
110. **Walker, J. E. (2013).** The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 1-16.
111. **Weerasooriya, M. K. B., & Piyarathne, S. A. P. M. (2019).** Production of extracellular amylase by *Aspergillus niger* under submerged fermentation using jack fruit rag as the carbon source. *Indian Journal of Traditional Knowledge (IJTK)*, 19(1), 158-163.
112. **Weller, G. R., & Doherty, A. J. (2001).** A family of DNA repair ligases in bacteria?. *FEBS letters*, 505(2), 340-342.
113. **Whitcomb, D. C., & Lowe, M. E. (2007).** Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive diseases and sciences*, 52(1), 1-17.
114. **Xu, B., Liu, Y. X., Miao, W. J., Zhou, S. L., & Gao, C. (2015).** A modified titrimetric method for measuring the activity of wheat germ lipase. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 7(3), 327-334.

- 115. Zare, H., Moosavi-Movahedi, A. A., Salami, M., Mirzaei, M., Saboury, A. A., & Sheibani, N. (2013).** Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. *Phytochemistry*, 87, 16-22.
- 116. Zumstein, M. T., & Helbling, D. E. (2019).** Biotransformation of antibiotics: exploring the activity of extracellular and intracellular enzymes derived from wastewater microbial communities. *Water research*, 155, 115-123.



## Résumé

Les enzymes sont des macromolécules biologiques produites par les cellules des différents organismes vivants. Ces enzymes possèdent un rôle central dans presque tous les processus biologiques et les réactions biochimiques nécessaires au maintien de la vie. Les enzymes présentent aussi une importance industrielle, dans divers secteurs industriels tels que le secteur pharmaceutique et agroalimentaire. Les bactéries sont des organismes très utilisées pour la production à grande échelle d'enzymes commercialement importantes.

Pour cela l'objectif de ce travail est la recherche et la caractérisation de 2 hydrolases (lipases et amylases) à intérêt industriel chez des souches de référence bactérienne. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Escherichia coli* (ATCC 25922). L'influence des températures et des pHs sur l'activité de ces enzymes et le traitement thermique à 90° C sur leur stabilité a été étudiée. Les résultats obtenus montrent que les lipases des 3 souches possèdent une activité optimale à 37° C et pH 7,2 et une sensibilité au traitement thermique. Les amylases des 3 souches ont montré une activité optimale à 20° C. Les résultats de l'étude de l'influence des pHs ont montré que les amylases des souches *E. coli* et *S. aureus* possèdent un pH optimal à 8,4 et celles de la souche *P. aeruginosa* possèdent un pH optimal de 5. Les amylases des souches *P. aeruginosa* et *S. aureus* ont montré une bonne stabilité au traitement thermique à 90 ° C, en effet, ces amylases ont gardé, respectivement, 83% et 73% de leur activité après 2h de traitement. Les amylases de la souche *E. coli* ont gardées seulement 4% de leur activité après 2h de traitement.

**Mots clés :** hydrolases, souches de référence, secteurs industriels, bactéries, amylases, lipases.

## Abstract

Enzymes are biological macromolecules produced by cells of different living organisms. These enzymes have a central role in almost all biological processes and biochemical reactions necessary for the maintenance of life. Enzymes are also of industrial importance, in various industrial sectors such as the pharmaceutical and agrifood sector. Bacteria are organisms that are widely used for the large-scale production of commercially important enzymes.

For this, the objective of this work is the research and characterization of 2 hydrolases (lipases and amylases) of industrial interest in bacterial reference strains. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). The influence of temperatures and pHs on the activity of these enzymes and heat treatment at 90 ° C on their stability was studied. The results obtained show that the lipases of the 3 strains have optimal activity at 37 ° C and pH 7.2 and sensitivity to heat treatment. The amylases of the 3 strains showed optimal activity at 20 ° C. The results of the study of the influence of pHs showed that the amylases of the *E. coli* and *S. aureus* strains have an optimal pH at 8.4 and those of the *P. aeruginosa* strain have an optimum pH of 5. The amylases of the *P. aeruginosa* and *S. aureus* strains showed good stability to heat treatment at 90 ° C, in fact, these amylases retained, respectively, 83% and 73% of their activity after 2 hours of treatment. The amylases of the *E. coli* strain kept only 4% of their activity after 2 hours of treatment.

**Keywords:** hydrolases, reference strains, industrial sectors, bacteria, amylases, lipases.

## ملخص:

الإنزيمات هي جزيئات بيولوجية كبيرة تنتجها خلايا من كائنات حية مختلفة. تلعب هذه الإنزيمات دورًا مركزيًا في جميع العمليات البيولوجية والتفاعلات الكيميائية الحيوية اللازمة للحفاظ على الحياة. تعتبر الإنزيمات أيضًا ذات أهمية صناعية في مختلف القطاعات الصناعية مثل قطاع الأدوية والأغذية الزراعية. البكتيريا هي كائنات حية تستخدم بشكل كبير لإنتاج الإنزيمات المهمة تجاريًا على نطاق واسع. الهدف من هذا العمل هو البحث وتوصيف اثنين من هيدرولاز (الليباز والأميلاز) ذات الأهمية الصناعية في السلالات المرجعية البكتيرية *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)، *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و *Escherichia coli* (ATCC 25922). تمت دراسة تأثير درجات الحرارة ودرجات الحموضة على نشاط هذه الإنزيمات والمعالجة الحرارية عند 90 درجة مئوية على ثباتها. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الليباز في السلالات الثلاثة لها نشاط مثالي عند 37 درجة مئوية ودرجة الحموضة 7.2 وحساسية للمعالجة الحرارية. أظهرت الأميليز في السلالات الثلاثة نشاطًا مثاليًا عند 20 درجة مئوية. أظهرت نتائج دراسة التأثير الهيدروجيني أن الأميليز لسلالات *E. coli* و *S. aureus* لها درجة حموضة مثالية تبلغ 8.4 وأن سلالة *P. aeruginosa* لها درجة حموضة مثالية تبلغ 5. أظهرت الأميليز لسلالات *P. aeruginosa* و *S. aureus* ثباتًا جيدًا في المعالجة الحرارية عند 90 درجة مئوية، في الواقع، احتفظت هذه الأميليزات بنسبة 83% و 73% على التوالي من نشاطها بعد ساعتين من العلاج. *E. coli* سلالة الأميليز من *E. coli* فقط على 4% من نشاطها بعد ساعتين من العلاج. **الكلمات المفتاحية:** هيدرولاز، سلالات مرجعية، قطاعات صناعية، بكتيريا، أميليز، ليباز.