

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 Biologiques



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 d'activités phytasiques chez des bactéries isolées
à partir de différents sols**

Présenté Par :

- 1) Melle LAHMER fatima zahra
- 2) M BOUNEFISSA Wanis

Devant le jury composé de :

Dr Nassima BRIXI GORMAT	MCA	U.A.T. B. B (Ain Temouchent)	Présidente
Dr Yamina OUADAH	MCB	U.A.T.B.B (Ain Temouchent)	Examinatrice
Dr Sofiane Mourad BENYAMINA	MCB	U.A.T.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant

Année Universitaire 2024/2025

Remerciements

Ce mémoire marque la fin d'un parcours, mais aussi l'aboutissement de plusieurs mois de travail, d'efforts, de doutes parfois, et de belles découvertes. À ce titre, nous remercions Dieu, Allah le Tout-Puissant, qui nous a donné la patience, la santé et le courage.

Avant tout, nous tenons à adresser nos sincères remerciements à **Dr Mourad Sofiane BENYAMINA** pour son encadrement bienveillant, sa patience, ses conseils éclairés, et surtout pour nous avoir accordé sa confiance tout au long de ce travail, ainsi que pour sa disponibilité associée à son impressionnant dynamisme scientifique. Ses remarques pertinentes et son accompagnement nous ont permis de progresser et de structurer nos idées avec clarté. Ce mémoire n'aurait pas pu voir le jour sans son soutien constant et ses encouragements.

Nous adressons nos vifs remerciements aux membres du jury : **Dr Nassima BRIXI GORMAT**, pour l'honneur qu'elle nous fait en présidant notre jury de soutenance et **Dr Yamina OUADDAH**, pour avoir accepté d'être examinatrice de notre travail. Nous tenons à les remercier pour leurs qualités d'enseignement et leur bienveillance.

Enfin, un immense merci à notre famille et à nos amis, qui nous ont soutenus sans relâche tout au long de ces années et durant l'élaboration de ce mémoire. Leur présence, leurs encouragements constants et leur confiance en nous ont été des piliers dans les moments de doute comme dans les instants de réussite. Merci pour leur aide précieuse et leur soutien moral, qui nous ont donné la force d'aller au bout de ce projet et de ne jamais baisser les bras.

Nous remercions également tous les enseignants et intervenants rencontrés durant notre cursus pour la richesse de leur enseignement et leur engagement. Grâce à eux, nous avons pu élargir nos connaissances et forger un esprit critique.

Lahmer fatima zahra

Bounefissa wanis

Dedicase

Avant toute chose, je tiens à remercier Allah, source de toute sagesse et de toute force, sans qui ce travail n'aurait jamais pu voir le jour.

Je dédie ce projet

**À ma chère mère,
À mon cher père,**

Qui n'ont jamais cessé de prier pour moi, de me soutenir et de m'épauler afin que je puisse atteindre mes objectifs. Aucune dédicace ne saurait exprimer tout le respect, l'amour et la reconnaissance que je ressens pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et mon bien-être. Votre présence est comme une lumière dans ma vie.

Je vous remercie du fond du cœur.

**À mon cher frère Mustapha,
À ma chère sœur Asmaa,**

Pour leur soutien moral et leurs précieux conseils tout au long de mes études. Merci infiniment pour votre amour et votre grand cœur. Toutes vos qualités seraient trop longues à énumérer, mais je sais que ma vie ne serait pas aussi belle sans votre présence.

Je vous aime de tout mon cœur.

À mes chères amies : Nour, Yasmine, Haifaa, Amina, Houda, Maroua, Mériem, Aicha et chaima

Pour leur aide et leur soutien dans les moments difficiles, pendant mes nuits blanches et mes périodes de fatigue. J'ai vraiment l'honneur d'avoir des amies comme vous dans ma vie. Votre présence dans mon cœur est un trésor inestimable.

À mes deux tantes maternelles , Malika et Samira,

Pour leurs encouragements dans les moments de fatigue et de faiblesse, et pour leur soutien constant. Un immense merci à vous. C'est un vrai bonheur d'avoir des tantes comme vous.

Que Dieu vous protège.

Fatima lahmer

Je dédie ce mémoire à :

Mes parents, pour leur amour inconditionnel, leur patience et leurs sacrifices. Merci de m'avoir toujours soutenu, encouragé et cru en moi. Ma famille, frères, sœurs et proches, pour leur présence et leurs prières constantes. Mes enseignants et encadrants, pour leur savoir, leurs conseils et leur disponibilité tout au long de ce parcours. Et à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de ce travail, je vous exprime toute ma gratitude

Bunefissa wanis

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

LISTES DES FIGURES

LISTES DES TABLEAUX

LISTES DES ABREVIATIONS

LISTES DES ANNEXES

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
1. Les microorganismes du sol et leur importance	3
2. Les activités biologiques des microorganismes du sol	4
3. Les activités enzymatiques.....	5
3.1. Généralités sur les enzymes.....	5
3.2. Le mécanisme d'action des enzymes	5
3.3. La nomenclature et classification des enzymes.....	6
4. Importance des enzymes.....	8
4.1. Au niveau cellulaire.....	8
4.2. Au niveau industriel.....	8
5. Les différentes sources d'enzymes.....	9
6. Les principales enzymes dans le sol.....	10
7. Les phytases : caractéristiques et mode d'action.....	11
7.1. Importance et utilisation des phytases	12
7.2. Activité phytasique des bactéries du sol.....	14

Matériel et méthodes

1. Isolement et purification des isolats bactériens.....	16
2. Vérification de la pureté et de l'aspect macroscopique et microscopique des isolats bactériens.....	18
2.1. Observation macroscopique.....	18
2.2. Observation microscopique	18
3. Préparation des cultures et des surnageants des isolats bactériens.....	18
3.1. Préparation des cultures des isolats bactériens sur GN.....	18
3.2. Préparation des suspensions et des surnageants des isolats bactériens	18
4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976).....	19
5. Recherche et caractérisation d'activités phytasiques des isolats bactériens.....	20
6. Influence du temps, de la température et du pH sur l'activité phytasique des surnageants des isolats bactériens.....	22
6.1. Influence du temps d'incubation sur l'activité phytasique des surnageants des isolats bactériens.....	22
6.2. Influence de la température sur l'activité phytasique des surnageants des isolats bactériens.....	22
6.3. Influence de pH sur l'activité phytasique des surnageants des isolats bactériens.....	22
7. Effet des traitements thermiques et acido-basiques sur la stabilité des phytases des isolats bactériens.....	23
7.1. Effet du traitement thermique sur la stabilité des phytases.....	23
7.2. Effet des traitements acido-basiques sur la stabilité des phytases.....	23

Résultats et discussion

1. Isolement et purification des isolats bactériens.....	24
2. Vérification de la pureté et de l'aspect macroscopique et microscopique des isolats bactériens.....	24

2.1. Observation macroscopique.....	24
2.2. Observation microscopique.....	25
3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976).....	27
4. Recherche et caractérisation d`activités phytasiques des isolats bactériens.....	28
4.1. Influence du temps d`incubation sur l`activité phytasique des surnageants des isolats bactériens.....	29
4.2. Influence de la température sur l`activité phytasique des surnageants des isolats bactériens.....	30
4.3. Influence de pH sur l`activité phytasique des surnageants des isolats bactériens.....	32
5. Effet des traitements thermiques et acido-basiques sur la stabilité des phytases des isolats bactériens.....	34
5.1. Effet du traitement thermique sur la stabilité des phytases.....	34
5.2. Effet des traitements acido-basiques sur la stabilité des phytases.....	37
Conclusion et Perspectives	44
Références biobibliographiques	46
Annexes	62
Résumé	65

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Mécanisme d'action des enzymes	6
Figure 2 : Prélèvement des échantillons pour l'isolement des bactéries.....	17
Figure 3 : Courbe étalon de l'hémoglobine.....	27
Figure 4 : Courbe étalon du KH_2PO_4	28
Figure 5 : Cinétique de l'activité phytasique des surnageants des différents isolats bactériens.....	29
Figure 6 : Effet de la température sur l'activité phytasique des surnageants des différents isolats bactériens.....	31
Figure 7 : Effet du pH sur l'activité phytasique des surnageants des différents isolats bactériens.....	33
Figure 8 : Résultats de test de thermostabilité après 1h et 2h de traitement thermique.....	35
Figure 9 : Résultats de traitements acido-basique après 1h et 2h de traitement	37

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les 7 classes des enzymes et leurs réactions catalysées.....	7
Tableau 2 : Les différentes concentrations de l'hémoglobine utilisées pour la préparation de la courbe d'étalon.....	20
Tableau 3 : les différentes concentrations de KH_2PO_4 utilisées pour la préparation de la courbe d'étalon.....	21
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des résultats de l'observation macroscopique des isolats bactériens.....	25
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des résultats de l'observation microscopique des isolats bactériens.....	26
Tableau 6 : résultats de dosage des protéines dans les surnageants des isolats bactériens.....	28
Tableau 7 : Quantité de phosphate libérée par les phytases des isolats bactériens en présence et absence d'acide phytique	30
Tableau 8 : tableau récapitulatif des résultats de la recherche et de la caractérisation des phytases chez les isolats bactériens.....	40

LISTES DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

ADP : Adénosine diphosphate

BN : Bouillon Nutritif

DO : Densité optique

EC : Commission d'enzymes

GN : Gélose Nutritive

HCL : chlorure d'hydrogène

L : litre

mg : Milligramme

mL : Millilitre

NaOH : l'hydroxyde de sodium

M : Molaire

mM : millimolaire

nm : Nanomètre

Pi : phosphore inorganique

LISTES DES ANNEXES

1. Préparation des milieux de culture62
2. Préparation de Bouillon Nutritif.....62
3. Préparation de Gélose Nutritif62

Introduction générale

La survie des êtres vivants repose sur une série de réactions chimiques complexes, qui, en l'absence de catalyseurs, se dérouleraient à une vitesse extrêmement lente (Copeland, 2023). Ces catalyseurs naturels, appelés enzymes, sont des protéines capables de reconnaître spécifiquement certaines molécules et de catalyser avec une grande efficacité leur transformation en composés utiles au métabolisme cellulaire (Friboulet *et al.*, 2003).

Au-delà de leur rôle essentiel dans les processus biologiques, les enzymes sont également largement utilisées dans divers domaines industriels tels que la fabrication d'édulcorants, la modification de composés pharmaceutiques, ou encore dans la formulation de produits d'entretien (Robinson, 2015).

Parmi les différentes classes enzymatiques, les hydrolases occupent une place centrale, représentant environ 75 % des enzymes exploitées dans l'industrie (Shukla *et al.*, 2021). Cette classe d'enzymes catalyse l'hydrolyse de liaisons chimiques à l'aide de la molécule d'eau, rendant possible une grande variété de transformations biochimiques (Alcantra *et al.*, 2011).

Au sein de cette classe, les phytases attirent un intérêt particulier. Ces phytases sont des phosphatases capables d'hydrolyser le phytate, la principale réserve de phosphore organique dans les sols (Greiner *et al.*, 2010). Cette réaction libère du phosphore inorganique (Pi), sous une forme directement assimilable par les plantes, jouant ainsi un rôle crucial dans la nutrition végétale (Gessler *et al.*, 2018). Les phytases sont présentes chez de nombreux organismes, y compris des bactéries, des levures, des champignons, mais également dans certains tissus animaux et végétaux (Cowieson *et al.*, 2015). Par ailleurs, les bactéries du sol constituent une source majeure de phytases, jouant un rôle clé dans la minéralisation du phytate et l'amélioration de la biodisponibilité du phosphore (Jorquera *et al.*, 2008).

Dans ce cadre, l'objectif de notre travail est de rechercher et de caractériser des activités phytasiques chez des bactéries isolées à partir de différents types de sols.

Synthèse bibliographique

Les microorganismes du sol sont des organismes microscopiques comme les virus, les bactéries, les protozoaires, les algues et les champignons (Amaya *et al.*, 2013). Ces microorganismes ont la capacité d'interagir avec leur environnement, mais aussi d'interagir entre eux (Zengler et Zaramela, 2018), ils sont d'une importance capitale pour l'environnement et essentiels à toutes les formes de vie (Singh *et al.*, 2017).

Ces organismes microscopiques interviennent dans divers secteurs cruciaux tels que le secteur de la santé humaine, des sciences de l'environnement et de la biotechnologie (García *et al.*, 2020). Parmi eux la communauté microbienne du sol, constitue un groupe très diversifié de microorganismes (Adomako *et al.*, 2022) et sont impliquée dans de nombreux processus écologiques et physiologiques importants (Vuong *et al.*, 2020) tels que les processus de renouvellement de la matière organique, la dégradation des polluants, la régulation de la disponibilité des nutriments minéraux, la fixation de l'azote atmosphérique (Gattinger *et al.*, 2008).

1. Les microorganismes du sol et leur importance

Comme mentionné précédemment, les microorganismes du sol jouent un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions importantes, notamment la minéralisation de la matière organique, le soutien au cycle des nutriments et à la biodiversité (Korneykoya *et al.*, 2021). Par ailleurs, ils contribuent également à la santé des plantes en les protégeant contre les maladies causées par des stress biotiques ou abiotiques (Thepbandit *et al.*, 2024). Dans les écosystèmes terrestres, les plantes interagissent avec une grande diversité de communautés microbiennes du sol, créant des relations interdépendantes (Adomako *et al.*, 2022). Parmi ces communautés les bactéries et les champignons constituent les principaux groupes (Du *et al.*, 2023). A titre d'exemple on peut citer la relation symbiotique entre les bactéries du sol, collectivement appelées rhizobiums et les racines des légumineuses qui génèrent des nodosités fixatrices d'azote atmosphérique grâce à l'action de l'enzyme, la nitrogénase (Wang *et al.*, 2012).

Le rôle écologique central du sol est étroitement lié à sa diversité taxonomique et fonctionnelle exceptionnelle, cette dernière étant un facteur clé qui permet au microbiote du sol d'être le moteur de l'écosystème (Bergna *et al.*, 2022). En effet cette diversité microbienne est cruciale pour la santé de sol, à l'état de la biocénose du sol et sa capacité à répondre aux diverses influences, y compris la pollution par des substances toxiques (Esikova *et al.*, 2021). Entre autres, cette diversité microbienne est aussi essentielle dans des systèmes agricoles tels que la

décomposition de la matière organique, le recyclage des nutriments du sol et l'implication dans les cycles biogéochimiques (Muneer *et al.*, 2022).

Cependant, les pratiques agricoles intensives, qui combinent l'utilisation d'engrais chimiques et de pesticides, perturbent ces interactions biologiques du sol, modifiant ainsi la diversité microbienne et affectant la santé globale du sol, ce qui peut avoir des conséquences à long terme sur la productivité agricole (Liu *et al.*, 2022). L'importance de ces microorganismes du sol, en raison des activités biologiques qu'ils possèdent, sera traitée dans la partie suivante.

2. Les activités biologiques des microorganismes du sol

Depuis plusieurs décennies, les microorganismes du sol et leurs activités biologiques sont reconnues comme des éléments fondamentaux du fonctionnement des sols (Petitjean *et al.*, 2019). Par exemple, les plantes dépendent de ces microorganismes pour la minéralisation des nutriments organiques nécessaires à leur croissance et à leur développement (Eremeev *et al.*, 2019). Aussi, la vaste diversité métabolique des microorganismes du sol signifie que leurs activités vont conduire ou vont contribuer à la fonction et à la structure des écosystèmes terrestres (Aislabie *et al.*, 2013).

Les microorganismes sont dotés de plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités antioxydantes produites par certains microorganismes comme *Pseudomonas putida* et *Enterobacter aerogenes* (Milentyeva *et al.*, 2022) qui permettent de prévenir les dommages cellulaires et favorisent la viabilité cellulaire (Rani *et al.*, 2021).

De plus, certains microorganismes produisent des métabolites secondaires ayant des propriétés anti-inflammatoires, réduisant ainsi les réponses inflammatoires des plantes aux stress environnementaux ou aux attaques de pathogènes (Tsvetanova, 2024). A titre d'exemple on peut citer de l'espèce *Fusarium solani* dont l'extrait est doté de fortes propriétés anti-inflammatoires (Ngwoke *et al.*, 2019).

Après avoir abordé les activités antioxydantes et anti-inflammatoires, il est important de souligner que les microorganismes du sol, tels que les actinomycètes, et en particulier les espèces de *Streptomyces*, sont dotés de puissantes activités antimicrobiennes (antibactériennes, antifongiques, antiprotozoaires et antivirales) (Lertcanawanichakul et Sahabuddeen, 2023), dont de nombreux composés sont utilisés pour le traitement d'une large variété de maladies (Henaou *et al.*, 2023).

Enfin, il est convenu de noter l'existence dans le sol d'une autre propriété biologique apportée par les microorganismes et qui est très importante, l'activité enzymatique. En effet, les activités enzymatiques jouent un rôle crucial dans la garantie de la qualité du sol et de sa santé (Daunoras *et al.*, 2024), en particulier, les activités enzymatiques d'origine microbienne, comme par exemple les complexes enzymatiques cellulases produits par les champignons et qui permettent d'hydrolyser la cellulose, présente dans la litière, en glucose (Kayang, 2001).

Ces derniers sont impliqués dans divers processus biologiques très importants et cruciaux comme par exemple dans la minéralisation des matières organiques du sol, suscitent un intérêt croissant en raison de leur importance pour les cycles biogéochimiques (Petitjean *et al.*, 2019).

3. Les activités enzymatiques

3.1. Généralités sur les enzymes

La vie dépend d'une série complexe de réactions chimiques. Sans les catalyseurs, ces réactions seraient très lentes (Copeland, 2023). Chez les organismes vivants, ce problème de lenteur des réactions est résolu par l'intervention des enzymes qui sont, des catalyseurs biologiques de nature protéique capables d'accélérer la vitesse des réactions (Kirkiacharian et Dumond, 2023) jusqu'à 10^{17} fois (Agarwal, 2019).

De ce fait, ces enzymes jouent un rôle fondamental dans le métabolisme en facilitant les réactions chimiques nécessaires à la vie (Mascarell et Ryan, 1997), et ils sont présents chez tous les organismes vivants (les plantes, les animaux et les microorganismes).

3.2. Le mécanisme d'action des enzymes

Comme mentionné précédemment, les enzymes sont de grandes molécules protéiques qui accélèrent les réactions chimiques, sans être elles-mêmes modifiées à la fin de la réaction (Sutcliffe et Scrutton, 2000). Les substances sur lesquelles elles agissent, appelées substrats, se lient spécifiquement à l'enzyme (Figure 1) grâce à une forte sélectivité, permettant ainsi une « perfection catalytique » (Homaei *et al.*, 2013).

Le site actif des enzymes (Figure 1) représente la région où les substrats sont convertis en produits par des interactions non covalentes, comme les ponts hydrogène et les liaisons ioniques (Kingsley et Lill, 2015).

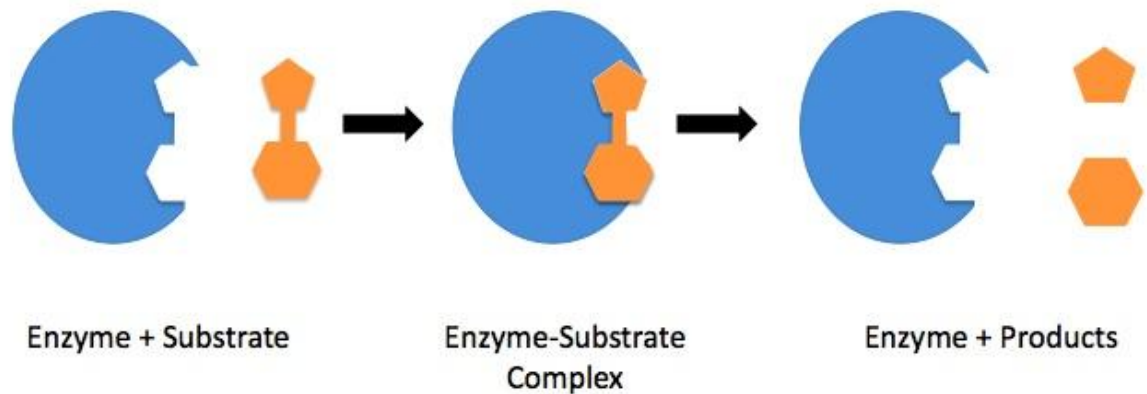
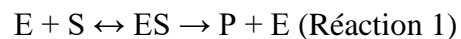


Figure 01 : mécanisme d'action des enzymes (Bugg, 2012)

Une fois lié au site actif, le substrat (S) subit une transformation catalytique pour devenir le produit (P) de la réaction. Le complexe enzyme-substrat (ES) se forme, permettant à l'enzyme de catalyser la réaction avant de libérer le produit et de recommencer le processus (Cooper, 2000) comme montré dans la réaction suivante :



3.3. La nomenclature et classification des enzymes

Pour classer les enzymes, l'Union Internationale de Biochimie a développé un système de classification basé sur les réactions catalysées par ces enzymes, permettant ainsi une identification précise des enzymes à l'aide d'un code numérique à quatre chiffres, le numéro EC (Enzyme Commission), qui classe les enzymes selon le type de réaction et leur spécificité chimique (McDonald *et al.*, 2014).

Le premier chiffre désigne la classe de l'enzyme, en fonction du type de réaction qu'elle catalyse (oxydoréduction, transfert de groupes, etc.). Le deuxième chiffre spécifie le donneur d'hydrogène, le troisième chiffre l'accepteur, et le quatrième chiffre précise la sous-classe de l'enzyme, qui reflète son mécanisme ou ses substrats spécifiques (Robinson, 2015).

Les enzymes sont classées en 7 classes, à savoir les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases, les ligases et les translocases. Cette classification est liée aux réactions qu'elles catalysent (Buvet, 1980) (voir le Tableau 1).

Tableau 1 : les 7 classes des enzymes et leurs réactions catalysées.

EC	Classe de l'enzyme	Type de réaction catalysée	Exemples
EC 01	Oxydoréductases	Catalysent les réactions d'oxydoréduction (Habte <i>et al.</i> , 2020)	Glucose oxydase, Peroxydases (Kermasha et Eskin, 2021)
EC02	Transférases	Catalysent le transfert d'un groupe fonctionnel particulier d'une molécule à une autre (Ramli <i>et al.</i> , 2022)	ADN polymérase (Arvind <i>et al.</i> , 1999)
EC03	Hydrolases	Catalysent le clivage hydrolytique des liaisons carbone-oxygène, carbone-azote, carbone-carbone, phosphore-azote (Shukla <i>et al.</i> , 2022)	Estérases, protéases, lipases ,phytases (Gaber, 2012)
EC04	Lyases	Catalyse les réactions d'addition et d'élimination (Paul <i>et al.</i> , 2019)	Pyruvate carboxylase2 (Utter et Scrutton , 1969)
EC05	Isomérases	Catalysent les réactions d'isomérisation telles que la récémisation et l'épimérisation (Paul <i>et al.</i> , 2019)	Glucose-6-phosphate isomérase (Seo <i>et al.</i> , 2014)
EC06	Ligases	Catalysent la réaction de jonction de deux grosses molécules en établissant une nouvelle liaisons chimique (Berg <i>et al.</i> , 2015)	ADN ligase (Martin <i>et al.</i> , 2002)
EC07	Translocases	Déplacent spécifiquement le domaine polypeptidique ou protéique à travers translocan (Holland, 2004)	ATP Synthase (Walker, 2013)

4. Importance des enzymes

4.1 Au niveau cellulaire

La majorité des réactions biochimiques nécessaires à la vie ne se produisent pas spontanément, mais elles nécessitent l'intervention de catalyseurs pour avoir lieu (Khandbahle *et al.*, 2017). Les enzymes jouent un rôle essentiel dans divers processus métaboliques tels que la digestion, la production d'énergie ou encore la réparation cellulaire et sont présentes dans toutes les cellules vivantes (Sammyyeva *et al.*, 2024). Elles participent également au catabolisme des nutriments fournissant ainsi l'énergie et les constituants chimiques de base nécessaires à la cellule. Ces éléments sont ensuite assemblés, toujours grâce à l'action des enzymes, pour former des protéines, de l'ADN, des membranes, des cellules et des tissus (Kennely et Rodwell, 2017).

Parmi ces enzymes importantes dans les différents processus biologiques on peut citer l' α -amylase qui est l'enzyme digestive principale agissant sur l'amidon ou le glycogène en les dégradant en molécules de glucose plus petites. Elle est présente chez les plantes, les animaux, les bactéries et les champignons (Williams, 2019). Aussi lors de la production d'énergie par exemple, on peut citer l'ATP synthase, l'un des protéines les plus abondantes sur Terre, qui catalyse de manière réversible la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique, fournissant ainsi l'énergie nécessaire à de nombreuses fonctions cellulaires (Neupane *et al.*, 2019), ou encore, en ce qui concerne la réparation cellulaire, des enzymes telles que l'ADN polymérase qui peut intervenir dans la duplication et la réparation de l'ADN, assurant le maintien de l'intégrité du matériel génétique (Wood et Shivji, 1997).

4.2. Au niveau industriel

Les enzymes, au-delà de leur rôle biologique, sont largement utilisées dans divers secteurs industriels, comme la production d'édulcorants, la modification des antibiotiques et les produits de nettoyage (Robinson, 2015). Elles permettent des conversions biocatalytiques efficaces et économiques, offrant ainsi des opportunités pour diverses industries (Van Beilen et Li, 2002), qui ont intégré leur utilisation à grande échelle comme l'industrie pharmaceutique, alimentaire, des détergents et des biocarburants (Chapman *et al.*, 2018). D'autres secteurs, tels que la conversion du gaz naturel et la production de produits chimiques fins, commencent à explorer leur potentiel (Choi *et al.*, 2015). Enfin, les enzymes sont aussi utilisées dans d'autres secteurs tels que l'industrie des pâtes et papiers, du cuir, des textiles, des boissons et dans l'alimentation animale (Headon *et al.*, 2021 ; Katsimpouras *et al.*, 2021).

Parmi les différentes classes d'enzymes, les hydrolases présentent une importance industrielle qui dépasse celle des autres classes d'enzymes : près de 75 % des enzymes industrielles sont des enzymes hydrolytiques, notamment les carbohydrases (comme les amylases), les protéases et les lipases, qui dominent le marché et représentent plus de 70 % des ventes d'enzymes (Shukla *et al.*, 2022). Dans le secteur alimentaire, les amylases sont utilisées dans de nombreux processus industriels, notamment dans la fermentation, la panification et les industries pharmaceutiques (Souza, 2010). Les lipases sont également très recherchées pour améliorer les propriétés émulsifiantes des lipides dans le jaune d'œuf, dans la transformation des œufs (Guerrand, 2017). Les protéases, en particulier les protéases alcalines, ont une large application dans l'industrie des détergents, l'industrie alimentaire, le traitement du cuir et la dégradation des biofilms. Elles sont considérées comme l'une des enzymes les plus importantes dans les bioprocédés industriels (Bholay *et al.*, 2012 ; Hamza, 2017).

5. Les différentes sources d'enzymes

Les enzymes utilisées dans divers domaines proviennent de sources variées, notamment de sources végétales, animales et microbiennes (Mouranche *et al.*, 1985). Du côté des végétaux, bien que leur utilisation traditionnelle pour la production d'enzymes soit connue, elles sont aujourd'hui moins courantes dans l'industrie en raison des difficultés d'extraction (Sharma *et al.*, 2020 ; Singh *et al.*, 2019). Malgré cela ces enzymes représentent une source importante d'enzymes. Parmi les enzymes végétales les plus connues, on retrouve les amylases, les lipases, les protéases, invertases, papaines, bromélaïnes, ficines et lipoxygénases (Meshram *et al.*, 2019 ; Verma *et al.*, 2022). Les amylases végétales, par exemple, sont couramment extraites de céréales comme le blé, le riz, le seigle et l'orge maltée, et sont utilisées pour l'hydrolyse de l'amidon (Pratima et Umrnder, 1989 ; Mamo et Gessesse, 1999).

Concernant les enzymes d'origine animale, on retrouve notamment la pepsine (issue de la muqueuse gastrique du porc), la trypsine (du pancréas de bœuf), ou encore la présure obtenue chez le veau non sevré. Ces enzymes jouent un rôle clé dans l'industrie alimentaire, notamment dans la fabrication de fromages ou dans les compléments digestifs (Mouranche *et al.*, 1985).

Par ailleurs, les microorganismes représentent une source majeure et largement exploitée d'enzymes (Mouranche *et al.*, 1985). Parmi ces microorganismes, les champignons filamenteux et les levures constituent une source enzymatique majeure. Des genres tels que *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Candida*, *Rhizomucor*, *Aspergillus niger* et *A. oryzae* sont fortement impliqués dans la production des amylases et de protéases (Pandey *et al.*, 1999). Les microalgues représentent également une source renouvelable et respectueuse de l'environnement pour la production de nouvelles enzymes, notamment à intérêt industriel

(Vingiani *et al.*, 2019). Elles sont capables de produire diverses enzymes telles que l'amylase, la protéase, la lipase, la galactosidase, la phytase, la laccase, la peroxydase, la superoxyde dismutase et d'autres enzymes antioxydantes, ce qui les rend prometteuses dans les domaines de la biotechnologie et de la santé (Brasil *et al.*, 2017 ; Odenthal *et al.*, 2024 ; Bertrand *et al.*, 2024).

Toujours chez les microorganismes, les bactéries jouent un rôle essentiel dans la production d'enzymes comme les lipases et les protéases (Barros *et al.*, 2013). Plusieurs espèces bactériennes sont connues pour leur potentiel enzymatique élevé (Barnabé *et al.*, 2003). Par exemple, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas cepacia* sont toutes identifiées comme des productrices efficaces de lipases (Jaeger et Reetz, 1998). D'autres espèces comme *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus* sont quant à elles réputées comme productrices de protéases (Smith *et al.*, 2009). Ces protéases et lipases sont également produites dans le sol par des espèces comme *Bacillus* sp, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Streptomyces* sp (Munawer *et al.*, 2023).

Le sol constitue une source majeure des enzymes essentiels au bon fonctionnement des processus biologiques (Asensio *et al.*, 2010). Les principaux d'entre eux seront présentés dans la partie suivante.

6. Les principales enzymes dans le sol

Les enzymes du sol sont les principaux acteurs des processus biochimiques (Rao *et al.*, 2014), tels que la minéralisation et la décomposition de la matière organique, le cycle de carbone d'azote et du phosphore (Asensio *et al.*, 2010 ; Neemisha *et al.*, 2022). Elles constituent des catalyseurs essentiels de ces fonctions vitales et jouent également un rôle majeur dans le maintien de la santé du sol et de son environnement (Das et Varma, 2010).

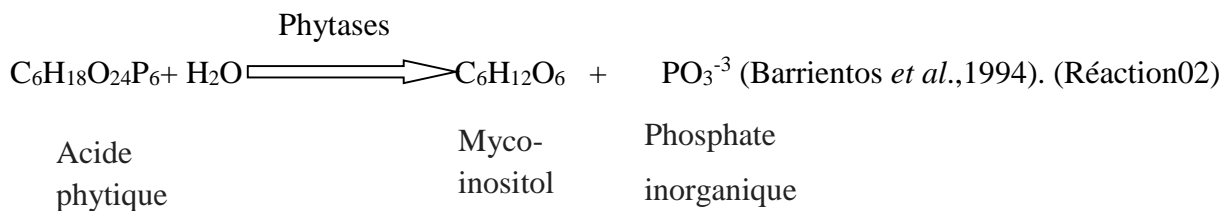
Les microorganismes, notamment les bactéries et les champignons, représentent la principale source d'enzymes dans le sol. Ils synthétisent une large gamme d'enzymes impliquées dans la décomposition et la minéralisation de la matière organique (Uwituze *et al.*, 2022). Ils participent activement aux différents cycles biogéochimiques qui se déroulent dans le sol (Neemisha *et al.*, 2022). Parmi ces enzymes, les amylases jouent un rôle important dans l'hydrolyse de l'amidon en sucres simples, ce qui fournit l'énergie aux microorganismes et améliore la fertilité du sol (King, 1967). Les chitinases quant à elles participent, à la décomposition de la chitine et contribuent ainsi à la défense biologique du sol contre les agents pathogènes (Chet et Henis,

1975). Aussi, les glucosidases interviennent dans la décomposition des glucides complexes et facilitent la biodégradation de la matière organique (Martinez et Tabatabai, 1997). Tandis que les protéases, elles aussi, participent dans la dégradation des protéines du sol, ce qui permet la libération de l'azote sous une forme assimilable pour les plantes (Nannipieri *et al.*, 1996). De même, les uréases à leur tour catalysent la transformation de l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone, les rendant plus disponibles pour les plantes (Mobley et Hausinger, 1989).

Il existe un autre type d'enzymes du sol, très importantes qui sont les phytases.

7. Les phytases : caractéristiques et mode d'action

Les phytases sont un sous-groupe d'enzymes phosphatases capables d'hydrolyser le phytate, la principale forme de phosphore organique présente dans le sol (Greiner *et al.*, 2010), en libérant ainsi le phosphore inorganique (Pi) sous une forme assimilable par les plantes (Gessler *et al.*, 2018). Comme montré dans la réaction suivante :



L'action des phytases permet non seulement de libérer ce phosphore, mais aussi d'augmenter la biodisponibilité d'autres minéraux comme le zinc, améliorant ainsi leur absorption par les plantes (Vats et Banerjee, 2004). Ces enzymes sont naturellement produites par une grande variété de microorganismes, notamment des bactéries, des champignons, mais aussi par certaines plantes et animaux (Jorquera *et al.*, 2008). Dans les sols, les phytases sont particulièrement abondantes dans la rhizosphère, où l'activité microbienne est intense. Leurs propriétés physicochimiques influencent directement leur stabilité, leur mobilité dans le sol et leur efficacité à hydrolyser le phytate (Gessler *et al.*, 2018). Ainsi, les phytases jouent un rôle clé dans le cycle du phosphore dans le sol, en facilitant l'accès des plantes à cette ressource essentielle et en contribuant à une fertilisation plus durable (Liu *et al.*, 2022).

Les phytases, identifiées sous le numéro EC 3.1.3.8 dans la famille des phosphohydrolases, sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse du phytate (myo-inositol hexakisphosphate) (Voir réaction 2). Cette réaction libère du phosphore inorganique biodisponible ainsi qu'une série d'inositol phosphates de plus faible degré de phosphorylation (Singh *et al.*, 2021).

Sur le plan mécanistique, l'action de la phytase s'initie par une liaison hautement spécifique du substrat phytate à son site actif. Cette interaction est suivie d'une série d'étapes de

déphosphorylation séquentielles, au cours desquelles les groupements phosphate sont clivés progressivement du cycle inositol. Ce processus enzymatique conduit à la formation d'une cascade d'inositol phosphates inférieurs, allant de l'inositol hexakisphosphate (IP6) à l'inositol monophosphate (IP1), et aboutissant finalement à la libération d'inositol (Taylor, 1965 ; Nelson, 1967 ; Ravindran *et al.*, 1995 ; Turke *et al.*, 2000).

Les phytases sont ubiquitaires et présentes chez un grand nombre d'organismes, incluant diverses espèces de microorganismes comme les bactéries, les levures et les champignons, mais aussi certains tissus végétaux et animaux (Cowieson *et al.*, 2015).

La classification des phytases repose principalement sur deux critères : leur mécanisme catalytique et leur pH d'activité optimale. Sur le plan catalytique, on distingue plusieurs types, notamment les phytases à histidine acide, les phytases à hélice bêta, les phytases à cystéine et les phytases à acide pourpre (Gautam *et al.*, 2013). En parallèle, le pH optimal d'activité constitue un critère fonctionnel important, permettant de différencier les phytases acides, actives à pH bas, des phytases alcalines, dont l'activité maximale se situe à pH neutre ou basique (Ao *et al.*, 2020).

7.1. Importance et utilisation des phytases

Le phosphore organique représente une part significative du phosphore total des sols agricoles, allant de 30 à 80 %, et joue un rôle clé dans le cycle biogéochimique du phosphore (Dalal, 1977 ; Tarafdar et Gharu, 2006). La forme organique dominante est le phytate (myo-inositol hexakisphosphate), qui peut constituer jusqu'à 60 % de ce phosphore organique. Toutefois, cette forme n'est pas directement assimilable par les plantes (Tarafdar et Junk 1987 ; Tarafdar et Claassen 1988 ; Rodríguez et Fraga 1999). Pour que le phytate devienne une source de phosphore utilisable, il doit d'abord être hydrolysé, processus essentiel dans la mobilisation du phosphore organique du sol (George *et al.*, 2005 ; Turner *et al.*, 2002). Les enzymes appelées phytases jouent ici un rôle central, ce sont les seules phosphatases capables de libérer efficacement le phosphore inorganique (Pi) à partir du phytate, augmentant ainsi sa biodisponibilité pour les plantes (Drevon *et al.*, 2017).

Dans le secteur agricole, l'ajout de phytases exogènes dans l'alimentation animale a permis d'optimiser l'absorption du phosphore, réduisant ainsi le recours aux phosphates inorganiques et leurs impacts environnementaux (Simons *et al.*, 1990).

L'importance de l'activité enzymatique de la phytase dépasse largement la simple libération du phosphore, un nutriment essentiel pour les animaux monogastriques. Ces derniers disposent en effet d'une capacité endogène limitée à dégrader le phytate, en raison d'une production insuffisante de phytases digestives (Ullah *et al.*, 2021). L'intervention de la phytase permet

d'augmenter considérablement la biodisponibilité de minéraux essentiels tels que le calcium, le fer, le zinc et le magnésium. Ces minéraux, initialement piégés dans des complexes insolubles par la structure chélatrice du phytate, voient leur libération facilitée par l'hydrolyse enzymatique, ce qui améliore leur absorption intestinale (Olukosi *et al.*, 2018).

Par ailleurs, la phytase joue également un rôle favorable dans la digestion des protéines. Le phytate a en effet tendance à s'associer aux protéines pour former des complexes insolubles, ce qui diminue leur solubilité et leur accessibilité aux enzymes protéolytiques. En dégradant le phytate, la phytase réduit la formation de ces complexes, permettant ainsi une meilleure dégradation et une utilisation plus efficace des protéines alimentaires (Cowieson *et al.*, 2015). Au niveau industriel, les phytases trouvent des applications de plus en plus diversifiées. Dans l'industrie agroalimentaire, elles sont utilisées pour améliorer la qualité nutritionnelle des aliments en libérant des minéraux comme le fer et le zinc (Hurrell, 2003). Elles sont aussi utilisées en panification, où elles réduisent le temps de fermentation, augmentant le volume du pain et améliorent sa texture (Haros *et al.*, 2001). Ces enzymes sont également utilisées dans l'industrie d'alimentation animale sous forme d'un additif alimentaire (Campbell *et al.*, 1992 ; Greiner *et al.*, 2006).

En industrie pharmaceutique, les phytases présentent un double intérêt thérapeutique. D'une part, elles possèdent une activité antioxydante remarquable : en tant que chélateurs naturels du fer, elles limitent les réactions d'oxydation responsables de la dégradation des aliments et du stress oxydatif dans les cellules, jouant ainsi un rôle potentiel dans la prévention de maladies liées à l'oxydation cellulaire (Silva et Bracarense, 2016 ; Sharma *et al.*, 2020). D'autre part, elles ont démontré un effet anticancéreux en inhibant la prolifération de diverses lignées cellulaires cancéreuses humaines donc la consommation d'aliments riches en phytases a également permis de réduire la croissance de certaines tumeurs telles que les fibrosarcomes murins et les rhabdomyosarcomes (Shamsuddin *et al.*, 2002 ; Raina *et al.*, 2008 ; Vucenik et Shamsuddin, 2003).

Le domaine de la biotechnologie offre un terrain fertile pour l'exploration et l'optimisation des phytases. La recherche se concentre sur l'isolement et la caractérisation de nouvelles phytases présentant des propriétés améliorées, telles une activité accrue à différents pH et températures, une meilleure résistance à la dégradation par les enzymes digestives, ou une spécificité de substrat modifiée (Lei et Stahl, 1994). Les techniques de génie génétique permettent de produire ces enzymes recombinantes à grande échelle et à moindre coût, ouvrant la voie à des applications industrielles plus larges. De plus, la compréhension des mécanismes d'action des phytases et de leur rôle dans le métabolisme des plantes ouvre des perspectives pour

l'amélioration des cultures, notamment en développant des variétés végétales à faible teneur en acide phytique ou exprimant des niveaux plus élevés de phytases endogènes, ce qui pourrait améliorer leur valeur nutritionnelle intrinsèque (Raboy, 2003).

7.2. Activité phytasique des bactéries du sol

Les bactéries solubilisant le phosphore suscitent un intérêt croissant en tant que bioinoculants pour améliorer la nutrition phosphatée du sol et accroître la productivité agricole (Liu *et al.*, 2015). Parmi ces bactéries, certaines produisent des phytases, des enzymes capables d'hydrolyser le phytate (principale forme de phosphore organique insoluble dans les sols) en phosphore inorganique directement assimilable par les plantes (Widawati *et al.*, 2022).

Plusieurs genres bactériens tels que *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* et *Escherichia coli* ont été identifiés comme producteurs de phytases (Richardson & Hadobas, 1997 ; Powar et Jagannathan, 1982 ; Greiner *et al.*, 1993 ; Kim *et al.*, 1998 ; Yoon *et al.*, 1996). Les phytases d'origine bactérienne se distinguent par leur spécificité pour le substrat, leur stabilité vis-à-vis de la protéolyse et leur bonne efficacité catalytique, ce qui les rend intéressantes par rapport aux phytases fongiques (Jorquera *et al.*, 2008). Seules certaines bactéries, notamment des genres *Bacillus* et *Enterobacter*, présentent une activité phytasique extracellulaire importante, favorisant la libération du phosphore dans la rhizosphère (Konietzny *et al.*, 2004).

Des études ont également révélé que les bactéries issues de sols enrichis en matière organique possèdent un potentiel phytasique élevé, ce qui suggère leur rôle clé dans le recyclage des nutriments (Dorbe *et al.*, 2015). Ainsi, les bactéries du sol représentent une source essentielle de phytases, où elles participent activement à la minéralisation du phytate et à la biodisponibilité du phosphore (Jorquera *et al.*, 2008).

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail est de rechercher et de caractériser des activités phytasiques de bactéries isolées à partir de différents sols.

Matériel et méthodes

L'ensemble de ce travail expérimental, réalisé dans le cadre de l'obtention du **Master en Microbiologie Appliquée**, a été mené au sein du **laboratoire de Microbiologie** de l'**Université Belhadj Bouchaib - Ain Témouchent (UBBAT)**, durant le **second semestre du Master 2** de l'année universitaire **2024/2025**.

Ce projet a pour objectif la recherche et la caractérisation de l'activité phytasique chez des bactéries isolées de différents types de sols.

1. Isolement et purification des isolats bactériens

Des échantillons de sol ont été récupérés pour isoler et purifier les bactéries utilisées dans cette étude. 04 échantillons ont été prélevés à partir de différents sols situés au niveau de l'Université : un échantillon d'un sol vierge (voir (A) Figure 2), un échantillon de sol rhizosphérique prélevé autour d'un rosier sauvage (voir (B) Figure 2), un échantillon de sol de l'horizon A prélevé près d'un palmier (voir (C) Figure 2). Aussi une bactérie est isolée directement des nodosités racinaires de l'espèce *Vicia faba* (voir Figure (D) Figure 2)

Les sols ont été prélevés à une profondeur de 5 cm, ensuite, une série de dilutions a été préparée pour chacun des 03 échantillons, en dissolvant 0,9 g de sol dans 9 mL d'eau physiologique, le mélange est vortexé, obtenant ainsi une solution mère à partir de laquelle des solutions de dilutions décimales seront préparées. Ensuite, 100 µL des dilutions 10^{-3} et 10^{-4} sont étalés sur deux boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (GN).

En ce qui concerne des nodosités racinaires de *Vicia faba*, ils ont été désinfectés dans de l'eau de Javel diluée et après lavage avec de l'eau distillée stérile puis ont été écrasées dans du BN. Ensuite, 100µL de ce BN sont étalées sur de la GN. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 h.

Après incubation, les boîtes sont récupérées et des colonies isolées sont repiquées sur une nouvelle GN à l'aide d'une anse de platine, pour être ensemencées par stries afin d'obtenir des colonies pures. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 h à 30°C.

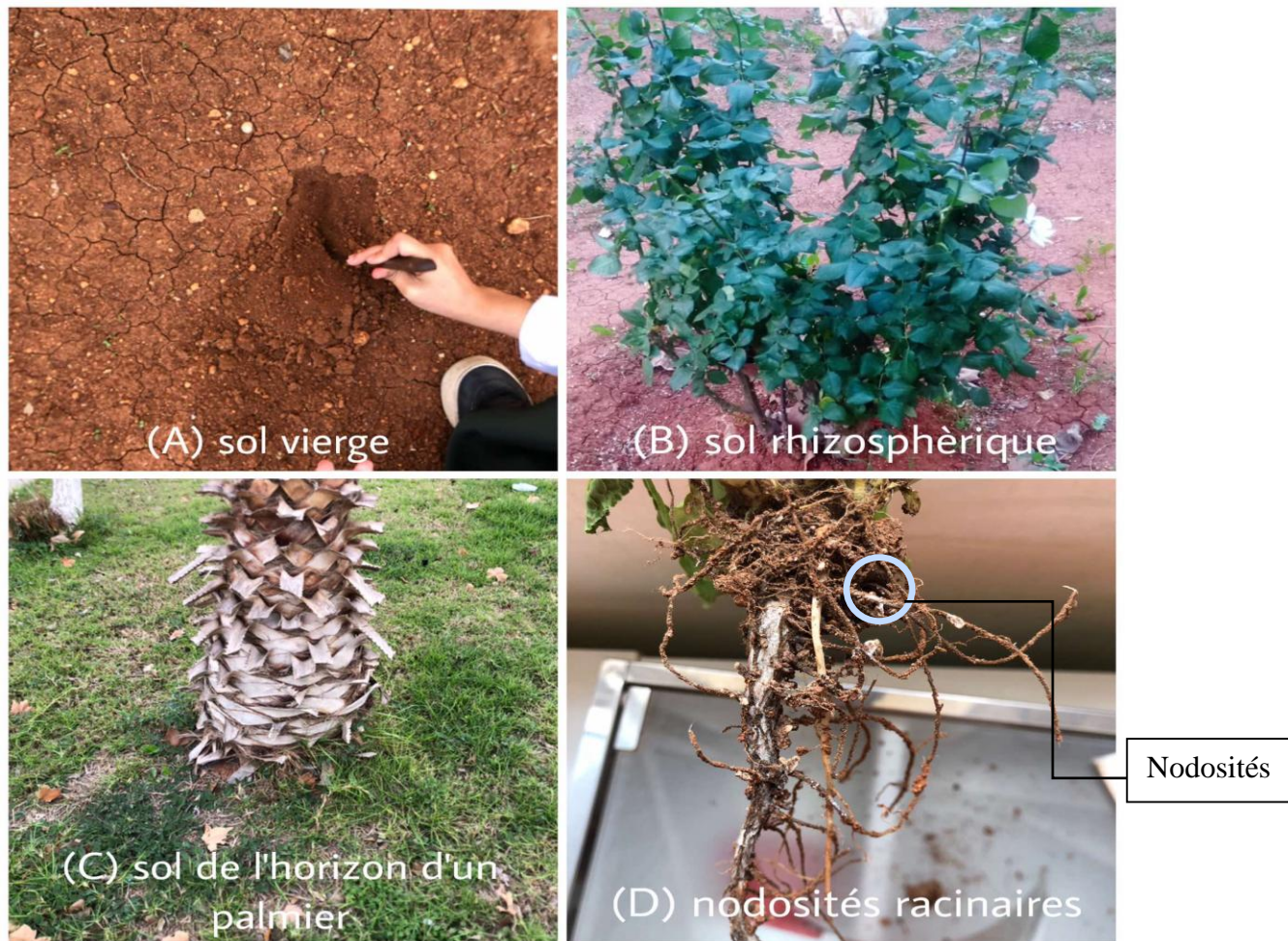


Figure 2 : prélèvement des échantillons pour l'isolement des bactéries

Les isolats obtenus après purification ont été nommés comme suit :

ISV pour l'isolat du sol vierge.

ISR pour l'isolat du sol rhizosphérique d'un rosier sauvage.

ISP pour l'isolat l'horizon A prélevé près d'un palmier.

ISN pour l'isolat des nodosités racinaires de *Vicia faba*.

2. Vérification de la pureté et de l'aspect macroscopique et microscopique des isolats bactériens

2.1. Observation macroscopique

Dans le cadre de l'évaluation de la pureté des colonies bactériennes, une analyse macroscopique a été effectuée après l'incubation des boîtes de culture. Cette observation permet de caractériser les colonies en fonction de leur forme, leur taille, leur couleur, leur élévation, leur contour, leur opacité, ainsi que leur consistance.

2.2. Observation microscopique

L'observation microscopique a été réalisée après la coloration de Gram, une technique qui permet de déterminer le type de Gram des bactéries, ainsi que leur forme et leur mode de regroupement. Cette étape est cruciale pour confirmer la pureté des colonies isolées.

3. Préparation des cultures et des surnageants des isolats bactériens

3.1. Préparation des cultures des isolats bactériens sur GN

Pour rechercher et caractériser les activités phytasiques des isolats bactériens, la GN normale et la GN additionnée d'acide phytique à 4g/L (Sajidan *et al.*, 2015) ont été préparées. Ces 2 GN ont été utilisées afin de voir si les phytases chez les isolats sont produites d'une façon constitutives ou inductibles. Ensuite, les 04 isolats ISV, ISR, ISP et ISN sont ensemencés sur chacune de ces GN. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h.

3.2. Préparation des suspensions et des surnageants des isolats bactériens

Après croissance, des colonies de chaque isolat bactérien sur GN normale et sur GN additionnée d'acide phytique, ont été prélevées pour être inoculées, respectivement, dans 10 mL de BN et 10 mL de BN additionné d'acide phytique à 4g/L (Sajidan *et al.*, 2015). Les deux tubes sont ensuite incubés à 30°C pendant 24 h.

Après 24 h d'incubation à 30°C, la DO_{600nm} de ces précultures est mesurée. Ces précultures, obtenues dans du BN avec et sans acide phytique, sont utilisées pour ensemencher, respectivement, 50 mL de BN avec et sans acide phytique de sorte à avoir une DO_{600nm} initiale de 0.01, puis incubés à 30°C pendant 24 h.

Après 24h d'incubation, les surnageants des isolats bactériens sont récupérés après une centrifugation à 6000 tours/min pendant 5 minutes. Ces surnageants sont ensuite utilisés pour

évaluer l'activité phytasique des isolats. Leur teneur en protéines est quantifiée à l'aide de la méthode de Bradford (1976).

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

Afin de déterminer et de quantifier la concentration des protéines présentes dans les surnageants des isolats bactériens, la méthode de Bradford (1976) a été utilisée. Cette méthode rapide, précise et fiable se repose sur l'utilisation du colorant Coomassie Brilliant Blue G-250, qui se lie spécifiquement aux protéines. Cette interaction modifie le spectre d'absorption du colorant, le faisant passer de 465 nm à 595 nm, et c'est ce changement spécifique qui est mesuré (Bradford, 1976). La réaction de coloration est complète en environ 2 minutes, et la teinte reste stable pendant une heure (Bradford, 1976).

Pour le dosage des protéines dans les surnageants, un volume de 0,8 mL de chaque surnageant est prélevé, auquel 0,2 mL de réactif de Bradford sont ajoutés. L'absorbance est ensuite mesurée à 595 nm. Ensuite, pour déterminer la quantité de protéines dans les surnageants, une courbe étalon est tracée en utilisant l'hémoglobine comme protéine, selon la formule $DO_{595nm} = f([Protéine])$ (Brady et Macnaughtan, 2015). Pour cela, une solution mère d'hémoglobine à 1 mg/mL est préparée. À partir de cette solution, une gamme de solutions à différentes concentrations (de 0,05 mg/mL à 1 mg/mL) est préparée (Tableau 2). Ensuite, 0,2 mL du réactif de Bradford sont ajoutés à 0,8 mL de chaque concentration. L'absorbance est ensuite mesurée à 595 nm.

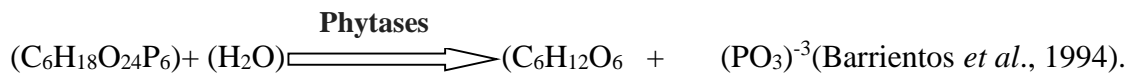
Tableau 2 : les différentes concentrations de l'hémoglobine utilisées pour la préparation de la courbe d'étalon.

protéine de référence] (mg/mL)	0	0,05	0,1	0,25	0,5	1
Protéine de référence à 1mg/mL(mL)	0	0,05	0,1	0,25	0,5	1
Eau distillée (mL)	1	0,95	0,9	0,75	0,5	0

5.Recherche et caractérisation d`activités phytasiques des isolats bactériens

Les phytases sont des enzymes phosphohydrolytiques qui catalysent l'élimination progressive des groupes phosphates de l'acide phytique (Lei *et al.*, 2013). Ces enzymes présentent une grande diversité de propriétés et peuvent fonctionner dans des conditions de pH et de température variées (Joudaki *et al.*, 2023).

La réaction catalysée par la phytase est la suivante :



Acide phytique

myco-inositol

phosphate inorganique

Afin de doser l'activité des phytases, la méthode de (Sajidan *et al.*, 2015) avec quelques modifications, a été utilisée.

Le mélange réactionnel est constitué de 125 µL de tampon d'acétate d'ammonium-acide acétique à 0,1 M et pH5, contenant le phytate de sodium à 5mM et 25µL du surnageant. Le mélange est ensuite incubé à 30°C pendant 10 min.

Le phosphate inorganique (Pi) libéré est mesuré selon la méthode modifiée de Heinonen et lahti en 1981 in Sajidan *et al.*, 2015). La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout de 750µL d'une solution fraîchement préparée et contenant de l'acétone, de l'acide sulfurique (2,5 M) et de molybdate d'ammonium (10mM) (2 : 1 : 1 v/v) et 100µL d'acide citrique à 1M ont été ajoutés (Sajidan *et al.*, 2015). Après 10 min d'incubation à 30°C, l'absorbance est mesurée à 355nm.

Afin de calculer la concentration de Pi libérée par l'activité phytasique, une courbe étalon $DO_{355nm} = f([KH_2PO_4])$ a été tracée. Pour cela, une série de concentrations allant de 0.125 à 0.5mM a été préparée à partir d'une solution mère de KH_2PO_4 à 1mM (Tableau 3).

Tableau 3 : les différentes concentrations de KH_2PO_4 utilisées pour la préparation de la courbe d'étalon.

[KH_2PO_4] mM	0	0,125	0,25	0,375	0,5
Solution mère du KH_2PO_4 à 1mM(mL)	0	0,25	0,5	0,75	1
Eau distillée (mL)	1	0,75	0,5	0,25	0

6. Influence du temps, de la température et du pH sur l'activité phytasique des surnageants des isolats bactériens

6.1. Influence du temps d'incubation sur l'activité phytasique des surnageants des isolats bactériens

L'étude de la cinétique de libération du phosphate par l'activité phytasique des surnageants a été réalisée. Pour cela, les milieux réactionnels, décrits précédemment, ont été incubés à 30°C pendant des durées variées (2, 6, 8 et 10min).

L'absorbance a ensuite été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 355 nm afin de quantifier la libération du phosphate inorganique.

6.2. Influence de la température sur l'activité phytasique des surnageants des isolats bactériens

Afin d'évaluer l'effet de la température sur l'activité phytasique, les surnageants des isolats bactériens ont été incubés à différentes températures (20°C, 25°C, 30°C, 35°C et 40°C) pendant 10 min. Ensuite, l'activité enzymatique a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 355 nm.

6.3. Influence du pH sur l'activité phytasique des surnageants des isolats bactériens

Pour examiner l'effet du pH sur l'activité phytasique des surnageants des isolats bactériens, le tampon acétate d'ammonium-acide acétique 0,1 M à pH 5 (acide) utilisé dans le milieu réactionnel initial est remplacé par deux tampons phosphate 0,1 M à pH 7 (pH neutre), et à pH 9 (basique). Ensuite, le milieu est incubé à 30°C pendant une durée de 10 minutes. L'activité enzymatique est ensuite dosée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 355 nm.

7. Effet des traitements thermiques et acido-basiques sur la stabilité des phytases des isolats bactériens

7.1. Effet du traitement thermique sur la stabilité des phytases

Les enzymes thermostables suscitent une attention considérable en raison de leurs nombreuses applications industrielles (Kristjansson, 1989). Dans ce contexte, le test de thermostabilité des phytases a été réalisé en traitant les surnageants des isolats bactériens par leur incubation dans un bain-marie à 90°C pendant 1h et 2h. Après ce traitement thermique, l'activité résiduelle des phytases est évaluée en suivant le même protocole que précédemment, à l'exception du fait que les surnageants non traités sont remplacés par ceux ayant subi un traitement thermique. Cette approche permet, grâce à une mesure spectrophotométrique à 355 nm, de quantifier précisément l'activité enzymatique restante et d'évaluer la stabilité thermique des phytases.

7.2. Effet des traitements acido-basiques sur la stabilité des phytases

Pour évaluer l'effet du HCl (traitement acide) et du NaOH (traitement basique) sur l'activité phytasique des surnageants des isolats bactériens, les surnageants des isolats bactériens sont traités par l'HCl et le NaOH à 1M pendant 1h et 2h à température ambiante. Après incubation, l'activité résiduelle des phytases a été mesurée à 355 nm en suivant le même protocole expérimental expliqué précédemment sauf que les surnageants non traités sont remplacés par ceux ayant subi un traitement acido-basique.

Résultats et discussion

Les résultats de la recherche et de la caractérisation des activités phytasiques chez 4 bactéries isolées de différents sols, seront présentés dans cette partie.

1. Isolement et purification des isolats bactériens


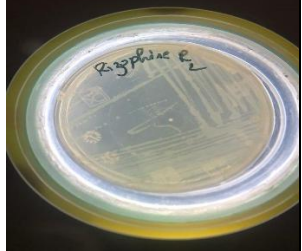

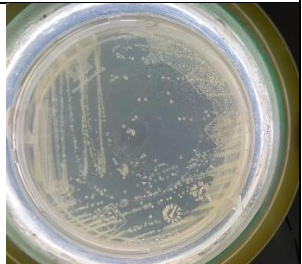
Pour rechercher activités phytasiques chez des bactéries du sol, 3 isolats bactériens ont été isolées à partir de différents types de sols : un sol vierge (ISV), un sol rhizosphérique provenant d'un rosier sauvage (ISR), un sol de l'horizon A prélevé à proximité d'un palmier (ISP). De plus, une 4^{ème} bactérie a été isolée à partir des nodosités racinaires de *Vicia faba* (ISN) (voir partie Matériel et méthodes).

2. Vérification de la pureté des isolats bactériens

2.1. Observation macroscopique

L'examen des colonies sur GN a permis de vérifier la pureté des isolats et de caractériser leurs propriétés macroscopiques (la taille, la forme, la couleur, l'opacité et l'élévation). Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 4

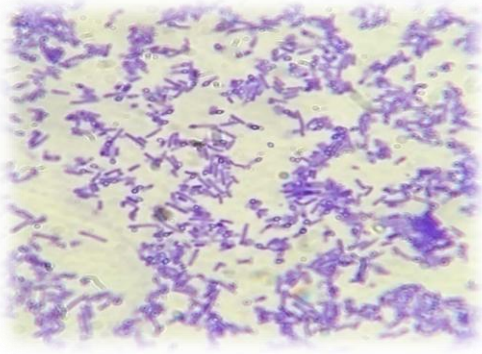
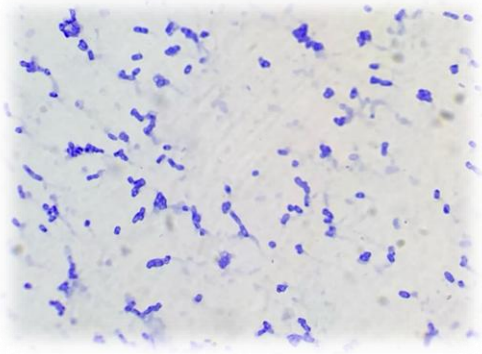
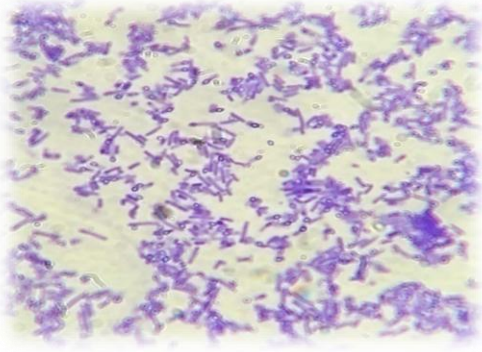
Tableau 4 : tableau récapitulatif des résultats de l'observation macroscopique des isolats bactériens.

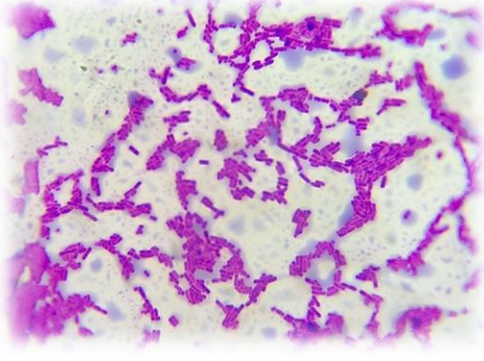
Les Isolats	Forme	Taille	Couleur	Opacité	Élévation	Photo
ISV	Arrondie	Moyennes	Blanc crème	Semi-translucides à légèrement opaques	Légèrement bombés	
ISR	Étalées	Petites	Blanc crème	Translucides à légèrement opaques	Plate à légèrement bombés	
ISP	Circulaires	Moyennes	Blanc crème à jaunâtre	Opagues	Bombés	
ISN	Circulaires	Moyennes	Blanc crème	Semi-translucides à légèrement opaques	Bombés	

2.2. Observation microscopique

L'examen microscopique, effectué après une coloration de Gram, confirme la pureté des cultures sur GN. Cette observation, permet également de déterminer le Gram et les caractéristiques microscopiques des 4 isolats. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5

Tableau 5 : tableau récapitulatif des résultats de l'observation microscopique des isolats bactériens.

Les isolats	Aspect	Type de gram	Photo
ISV	Bacilles	Gram positive	
ISR	Cocci	Gram positive	
ISP	Bacilles	Gram positive	

ISN	Bacilles	Gram négative	
-----	----------	---------------	--

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

Pour déterminer la quantité des protéines dans les surnageants des 04 isolats bactériens, Une courbe étalon DO595nm = f ([hémoglobine]) de la protéine de référence hémoglobine été tracée (Figure 3).

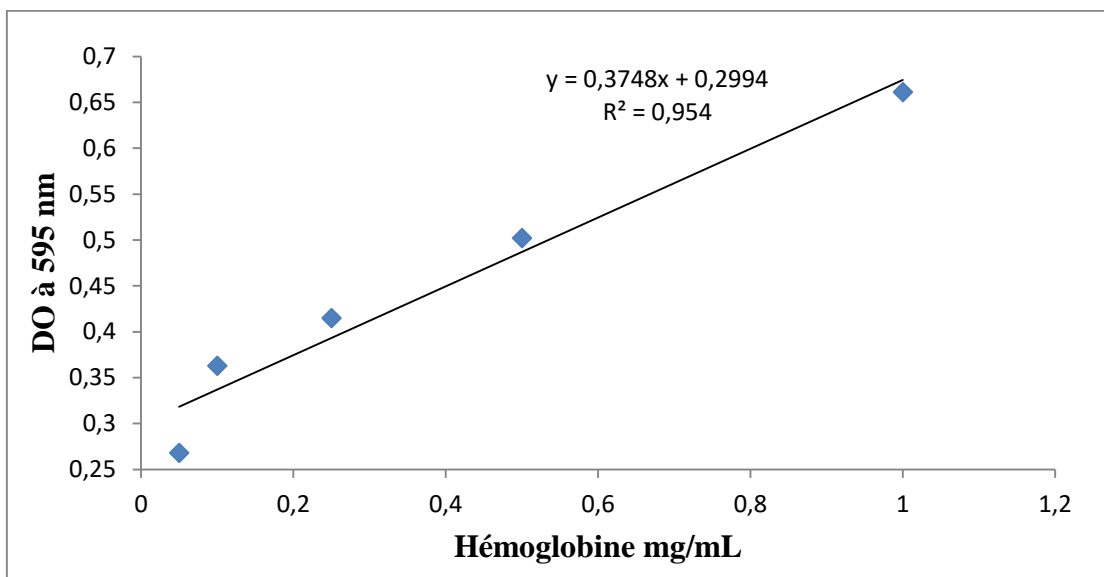


Figure 3 : courbe étalon de l'hémoglobine

La courbe étalon a ensuite permis de déterminer la concentration en protéines présentes dans les surnageants des 4 isolats bactériens. Ces protéines seront utilisées pour l'évaluation des activités phytasiques. Les résultats de cette quantification sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 6 : résultats de dosage des protéines dans les surnageants des isolats bactériens.

Isolats	ISV	ISR	ISP	ISN
Quantité des protéines en absence de l'acide phytique dans le BN (mg /mL)	0,5695	0,2331	0,5498	0,5472
Quantité des protéines en présence del'acide phytique dans le BN (mg/mL)	0,3119	0,0187	0,2861	0,6985

4. Recherche et caractérisation d'activités phytasiques des isolats bactériens

Cette partie consiste à rechercher et de caractériser l'activité phytasique dans les surnageants des 4 isolats bactériens. La méthode utilisée pour évaluer cette activité est celle basée sur le protocole établi par Sajdan *et al.*, 2015 avec quelques modifications.

L'activité phytasique de ces isolats a été mesurée en quantifiant le phosphate inorganique (Pi) libérée par l'action des phytases sur l'acide phytique selon la réaction 2 (voir partie matériels et méthode).

Afin de connaitre la quantité du Pi libérée par les phytases des surnageants des 4 isolats bactériens, une courbe étalon $DO_{355nm} = f([KH_2PO_4])$ a été tracée.

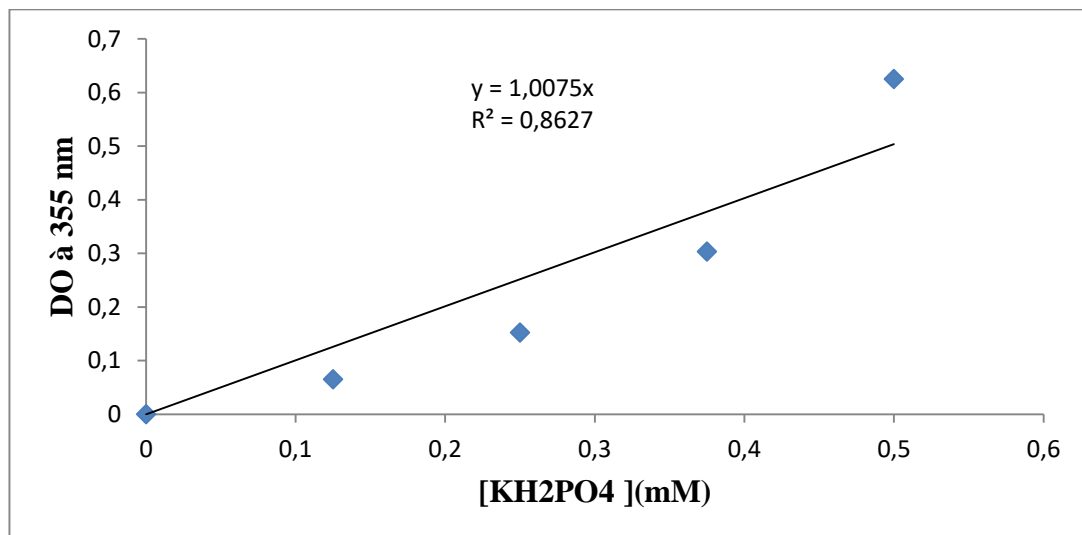


Figure 4 : courbe étalon du KH_2PO_4

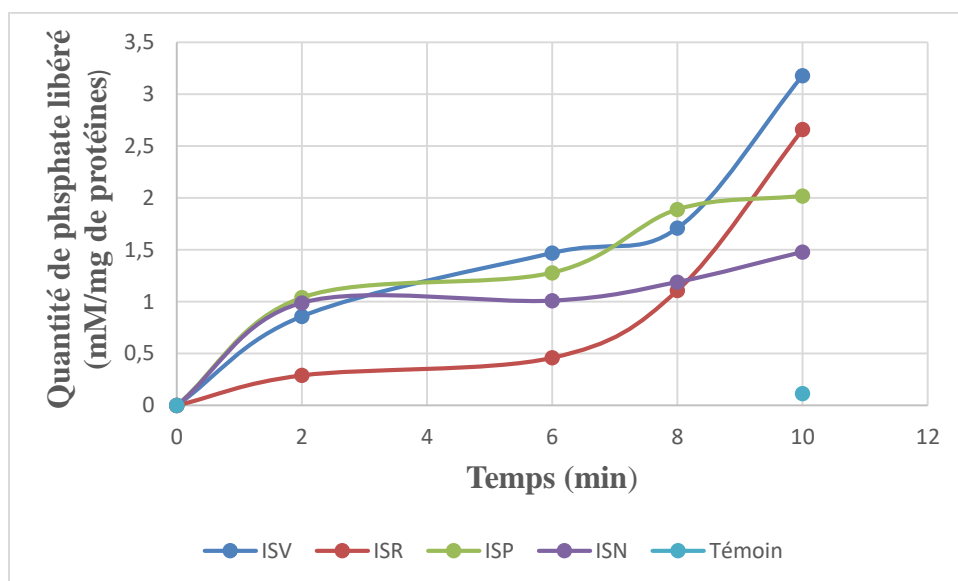


Figure 5 : cinétique de l'activité phytasique des surnageants des différents isolats bactériens

L'analyse de l'activité phytasique a révélé une augmentation progressive de la quantité de phosphate libéré en fonction du temps d'incubation (Figure 5). Comme précisé dans la partie « Matériels et méthodes », les mesures ont été effectuées à 2, 4, 6, 8 et 10 minutes. Ceci met en évidence la présence d'une activité phytasique dans les surnageants des différents isolats bactériens étudiés dotée d'une capacité à hydrolyser l'acide phytique.

Les résultats obtenus révèlent une variation notable de la libération de phosphate en fonction des isolats testés. Le surnageant de l'isolat ISV présente une activité phytasique croissante avec une libération de phosphate passant de 0,86 à 2 minutes, à 3,18 mM de Pi/mg de protéines à 10 minutes. Concernant le surnageant de l'isolat ISR, l'activité phytasique libère 0,29 à 2 minutes puis augmente progressivement pour atteindre 2,66 mM de Pi/mg de protéines à 10 minutes. Pour le surnageant de l'isolat ISP, la libération de phosphate passe de 1,04 à 2 minutes, pour atteindre 2,02 mM de Pi/mg de protéines à 10 minutes. Enfin, le surnageant de l'isolat ISN présente l'activité la plus faible parmi les isolats testés, avec une libération de phosphate de 0,99 à 2 minutes pour atteindre 1,48 mM de Pi/mg de protéines à 10 minutes.

En revanche, les surnageants récupérés à partir des cultures obtenues en absence de l'acide phytique ont montré une libération de phosphate au bout de 10 min plus faible par rapport à celle obtenue par les surnageants récupérés à partir des cultures obtenues en présence de l'acide phytique comme montré dans le tableau suivant

Tableau 7 : Quantité de phosphate libérée par les phytases des isolats bactériens en présence et absence d'acide phytique

Isolats	ISV	ISR	ISP	ISN
Quantité de phosphate libérée par les phyases de l'isolat cultivé sans l'acide phytique (mM/mg de protéines).	0,1171	1,985	0,456	0,47
Quantité de phosphate libérée par les phyases de l'isolat cultivé en présence de l'acide phytique (mM /mg de protéines).	3,18	2,66	2,02	1,48

Ces valeurs sont faibles par rapport aux valeurs obtenues avec les différents isolats en présence d'acide phytique, Ces résultats montrent que l'activité phytasique des surnageants est considérablement réduite lorsque l'acide phytique est absent dans le milieu de culture des bactéries. Cette observation suggère que l'expression des phytases est inductible, c'est-à-dire régulée par la présence du substrat (acide phytique). Cela concorde avec les études de Konietzny et *al* en 2004 qui ont montré que chez les bactéries, la phytase est une enzyme inductible et son expression peut varier considérablement entre les espèces. Cependant Yanke *et al* en 1999 mentionne que certaines bactéries comme *klebsiella terrigena* produisent des phytases sans nécessiter de la présence de phytate pour l'induction ni de limitation de phosphate pour la répression. En ce qui concerne *E. coli* Greiner *et al* en 1993 ont montré que son activité phytasique est stimulée par une limitation en phosphate. En revanche *Aspergillus ficuum*, selon les études de Howson et Davis (1983) montre une répression de l'activité phytasique par le phosphate.

4.1. Influence de la température sur l'activité phytasique des surnageants des isolats bactériens

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

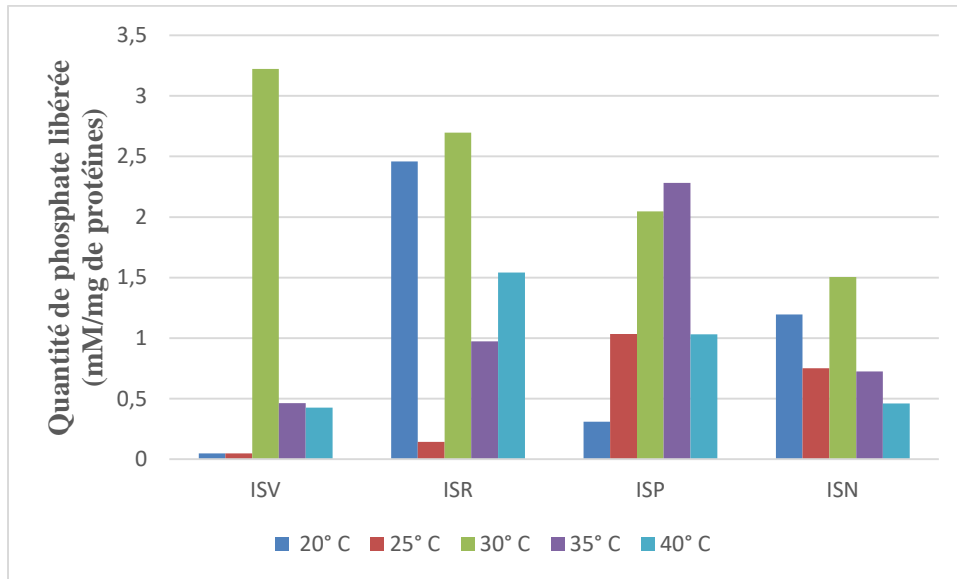


Figure 6 : effet de la température sur l'activité phytasique des surnageants des différents isolats bactériens.

Les résultats obtenus (Figure 6) montrent une influence de la température sur l'activité phytasique des surnageants des quatre isolats (ISV, ISR, ISP, et ISN).

Pour le surnageant de l'isolat ISV, l'activité phytasique est maximale à 30°C, montrant que c'est la température optimale pour cette activité. Cependant, une réduction significative de l'activité est observée aux températures de 35°C et 40°C, tandis qu'une activité presque nulle est observée à 20°C et 25°C. Le surnageant de l'isolat ISR, présente une activité optimale à 30°C. Bien qu'une activité modérée soit maintenue, respectivement, à 20°C, 40°C et 35°C. Une diminution notable de cette activité est constatée à 25°C. Le surnageant de l'isolat ISP affiche une activité phytasique maximale à 35°C (température optimale). Une activité considérable est également enregistrée à 30°C. Une activité modérée est observée à 25°C et 40°C et une réduction importante de cette activité est constatée à 20°C. L'activité phytasique du surnageant de l'isolat ISN atteint son activité maximale à 30°C, mais une diminution progressive de l'activité est observée respectivement aux températures 20°C, 25°C, 35°C et 40°C.

En résumé, l'activité phytasique optimale est observée à 30°C pour le surnageant des isolats ISV, ISR, et ISN, tandis que l'activité phytasique du surnageant de l'isolat ISP atteint son activité maximale à 35°C avec toujours une activité importante à 30°C (Figure 6).

Nos résultats montrent qu'il existe une activité détectable à 20°C pour les isolats ISR, ISP, ISN cela rejoint l'étude de Carlson et Poulsen en 2003, qui a montré une certaine activité phytasique à 20°C dans les aliments liquides fermentés à base d'orge ou de blé en présence de phytases endogènes ou microbiennes

Concernant la température optimale de 30°C, les isolats ISV, ISR, ISP présentent une activité maximale à cette température ce qui est en accord avec plusieurs études. Par exemple Sanbuga *et al* en 2014 ont montré que l'activité phytasique de *Lactobacillus plantarum*, est optimale à 30°C, tandis que Qasim *et al* en 2017 ont observé qu'une souche fongique *A. tubingensis* présente une activité phytasique maximale à cette température (30°C). De plus Lata *et al* en 2013 ont trouvé qu'*Aspergillus heteromorphus* MTCC 10685 produit une phytase, dont l'activité optimale est également à 30°C.

L'isolat ISP a montré une activité optimale à 35°C ce qui correspond aux résultats de Kauser *et al* en 2023 qui ont rapporté qu'*Aspergillus terreurs* produit une phytase stable à cette température (Kauser *et al.*, 2023). En comparaison l'étude de EL Toukhy et ses collègues en 2013 sur *Bacillus subtilis* MJA indique une température optimale de 37°C, légèrement supérieure aux températures optimales des résultats qu'on a obtenus. Toutefois cette valeur reste proche de celle obtenue pour l'isolat ISP (35°C).

Par contre des températures optimales plus élevées ont été observées. Par exemple l'étude de Yu- Hong en 2007 mentionne que la température optimale d'une phytase utilisée dans l'alimentation animale est de 40°C. Aussi, l'étude de Sajidan *et al* en 2015 sur les souches bactériennes notamment *Bacillus aryabhatii* (MC8), *Bacillus cereus* (D10, D16, MS5, et MS6) a montré que l'optimum de température pour l'activité phytasique varie entre 40°C et 60°C selon les souches. Par exemple, *Bacillus aryabhatii* (MC8) présente un optimum à 40°C, *Bacillus cereus* (D10 et D16) à 50°C tandis que les souches D6 (*Bacillus aryabhatii*), MS5 et MS6 (*Bacillus cereus*) montrent un optimum de température plus élevé, à 60°C

4.2. Influence de pH sur l'activité phytasique des surnageants des isolats bactériens

L'effet du pH sur l'activité enzymatique des phytases présentes dans les surnageants des 4 isolats a été évalué à pH 5, pH 7 et à pH 9.

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

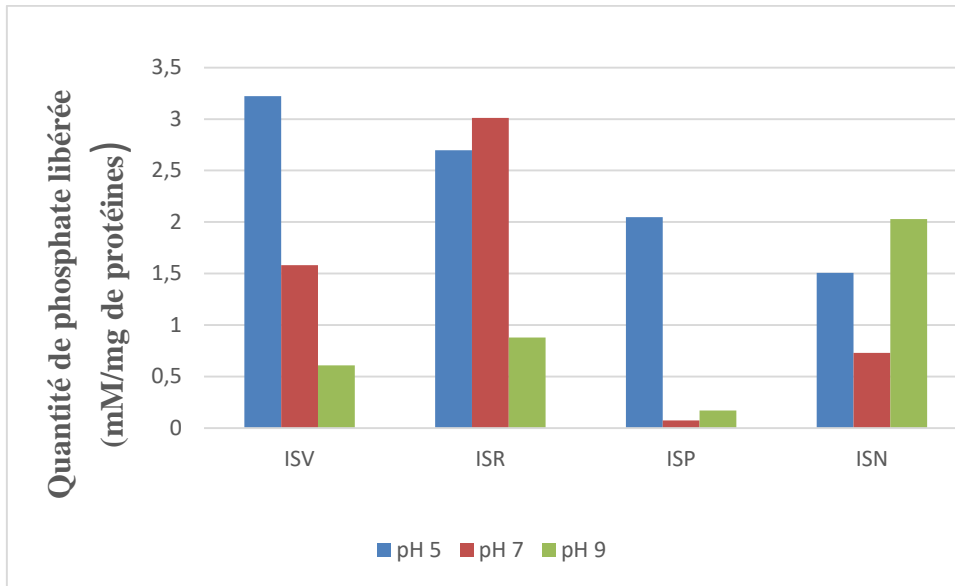


Figure 7 : effet du pH sur l'activité phytasique des surnageants des différents isolats bactériens.

Les résultats obtenus montrent une influence des pH testés sur l'activité phytasique des surnageants des isolats ISV, ISR, ISP et ISN Joudaki et *al* en 2023, ont classé les phytases en trois grandes groupes : celles à pH optimale acide (autour de 5) celles à pH neutre (autour de 7) et celles de pH alcalin (autour de 8).

Pour le surnageant de l'isolat ISV, l'activité phytasique est maximale à pH 5 (pH optimal) et une diminution progressive de cette activité aux pH 7 et 9. L'activité phytasique du surnageant de l'isolat ISR, présente une activité optimale à pH 7, bien que l'activité reste relativement élevée à pH 5. Une diminution notable est observée à pH 9. L'activité phytasique du surnageant de l'isolat ISP possède une activité optimale à pH 5, tandis qu'une réduction significative de cette activité est observée aux pH 7 et 9. En revanche, l'activité phytasique du surnageant de l'isolat ISN montre une activité maximale à pH 9 bien qu'elle conserve une activité modérée à pH 5. L'activité minimale est observée à pH 7.

Nos résultats montrent que les surnageants des isolats ISV et ISP présentent une activité phytasique maximale à un pH de 5. Ces résultats sont cohérents avec plusieurs études qui rapportent des activités optimales autour de cette valeur de pH. Par exemple, Jackman et Black (1952) ont montré que le taux maximal d'hydrolyse du phytate par les phytases d'origine microbienne se produit à environ pH 5. Ces résultats sont également similaires à ceux rapportés par Yoon *et al* en 1996 qui ont trouvé qu'une souche bactérienne d'*Enterobacter* produisait une phytase avec une activité optimale à pH 5,5. L'étude de Yanke *et al* en 1999 ont montré aussi

que certaines bactéries ruminales en particulier *selenomonas ruminantium* présente une activité phytasique optimales à pH entre 4,0 et 5,5. De plus, Igbsan *et al.* (2000) ont observé que plusieurs phytases d'origine fongique (*Aspergillus*) avaient un pH optimal allant de 4,5 à 5,5.

La concordance de ces résultats suggère que les surnageants des isolats ISV et ISP pourraient partager des caractéristiques similaires avec ces phytases d'origine fongique ou bactérienne.

Le surnageant de l'isolat ISR présente une activité phytasique maximale à un pH de 7, ce qui correspond à un pH neutre. Ce résultat est cohérent avec l'étude de Gulati *et al* en 2007 qui a montré que la phytase produite par *Bacillus laevolacticus* avait une activité optimale entre pH 7,0 et 8,0. De plus, Demirkan *et al.* (2014) ont rapporté qu'une souche de *Bacillus* sp présente une activité optimale à pH 7,5 et l'étude de Igbsan *et al* en 2000 ont trouvé que l'activité phytasique de *Bacillus* est optimale à pH7.

Le surnageant de l'isolat ISN présente une activité phytasique maximale à pH 9, ce qui indique une préférence pour les conditions alcalines. L'étude de Vijayaraghavan *et al* en 2013 ont rapporté que la phytase produite par *alcaligenes sp* avait une activité maximale à pH 8, confirmant sa stabilité et son efficacité en conditions basiques.

5.Effet des traitements thermiques et acido-basiques sur la stabilité des phytases des isolats bactériens

5.1 Effet du traitement thermique sur la stabilité des phytases

Ce test à été réalisé pour évaluer la thermostabilité des phytases présentes dans les surnageants de 4 isolats après un traitement thermique à 90°C pendant 1 heure et 2 heure. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure suivante.

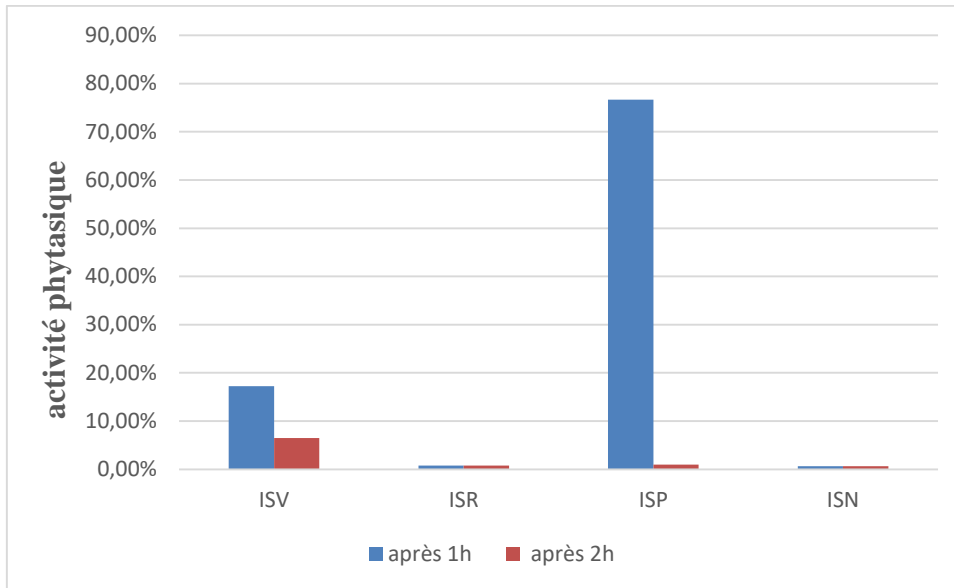


Figure 8 : résultats de test de thermostabilité après 1h et 2h de traitement thermique

Les résultats obtenus (Figure 8) montrent une variabilité importante dans la stabilité thermique des surnageants des différents isolats testés après des traitements à 90°C pendant 1h et 2h.

Le surnageant de l'isolat ISP se distingue par une résistance thermique notable, avec une activité phytasique préservée de 76,63 % après 1h, bien que cette activité soit complètement perdue après 2h de traitement. Les phytases du surnageant de l'isolat ISV présentent une stabilité plus faible, ne conservant que 17,23 % de son activité initiale après 1h de traitement et seulement 6,47 % après 2h de traitement thermique.

Concernant les phytases des surnageants des isolats ISR et ISN semblent particulièrement sensibles au traitement thermique. Aucune activité détectable n'a été observée après 1h et 2h de traitement, indiquant une perte totale d'activité par ce traitement.

Ces résultats donnent une idée sur la thermostabilité des phytases produites par chaque isolat. La perte rapide d'activité des surnageants chez les isolats (à l'exception des phytases de l'isolat ISP qui garde une activité après 1h de traitement) pourrait indiquer une nature moins résistante de ces enzymes aux traitements thermiques.

Nos résultats montrent une variabilité notable dans la stabilité thermique des phytases produites par les isolats testés. L'isolat ISP se distingue par une activité phytasique résiduelle de 76,63 % après un traitement thermique à 90°C pendant 1 heure, ce qui reflète une certaine thermostabilité. Cette résistance partielle rejoint les études de Wyss *et al* en 1998, qui ont

observé une conservation de 60 à 70 % de l'activité phytasique commerciale à 75°C, bien qu'une dégradation soit déjà amorcée à cette température. En comparaison, l'étude de Suleimanova *et al* en 2020 a montré une phytase recombinante particulièrement stable, conservant 100 % de son activité après 1h à 70°C, ce qui la rend plus thermostable que celle produite par l'isolat ISP.

Aussi, la phytase d'*Aspergillus fumigatus* étudiée par Pasamontas *et al* en 1997 a montré une résistance thermique remarquable, ne perdant que 10 % de son activité après 20 minutes à 100°C, ce qui reste supérieur aux performances des isolats étudiés ici, y compris ISP. De plus, l'étude de Patel *et al* en 2023 a rapporté une phytase recombinante stable même à 100°C, conservant environ 59,2 % de son activité après 10 heures, ce qui dépasse largement les performances observées dans nos isolats.

Les phytases purifiées de *Bacillus lecheniformis* étudiées par Fasimoye *et al* en 2014 ont pu conserver 55 % de leur activité après 1h à 80°C. Aussi, l'étude de Dechavez *et al* en (2011) ont montré que les phytases brutes de différentes souches de *Bacillus* conservent environ 50 % de leurs activités à 70°C, et elles sont affectées par des températures plus élevées.

Les phytases issues des surnageants de l'isolat ISV montre une stabilité plus faible, ne conservant que 17,23 % d'activité après 1h à 90°C, et 6,47 % après 2h, ce qui suggère une structure enzymatique moins résistante à la chaleur.

Concernant les isolats ISR et ISN, aucune activité n'a été détectée après 1h ou 2h à 90°C, ce qui indique une perte complète d'activité enzymatique et une grande sensibilité à la chaleur. Ces résultats sont cohérents avec ceux de l'étude de Abbasi *et al* en 2022 où un mutant de phytase (T83R) issu de *Yersinia intermedia* a montré moins de 30 % d'activité après un traitement à 100°C pendant 30 minutes.

La perte d'activité enzymatique par le traitement thermique s'explique par le fait que les températures élevées et surtout prolongés peuvent entraîner la dénaturation des enzymes, c'est-à-dire une altération irréversible de leur structure (Daniel *et al.*, 1996)

Malgré cette sensibilité, les phytases non thermostables trouvent diverses applications industrielles. Dans l'industrie alimentaire, elles sont largement utilisées pour améliorer la digestion de phosphore chez les monogastriques (Navone *et al.*, 2021). Dans le domaine

pharmaceutique, ces enzymes présentent un intérêt thérapeutique potentiel non seulement en raison de leur capacité à hydrolyser l'acide phytique mais également par les propriétés biologiques issues de cette hydrolyse (Sharma *et al.*, 2020).

5.2 Effet des traitements acido-basiques sur la stabilité des phytases

Ce test à été réalisé pour évaluer la stabilité des phytases présentes dans les surnageants des 4 isolats après un traitement acido - basique avec du HCL et du NaOH pendant 1 heure et 2 heure. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante

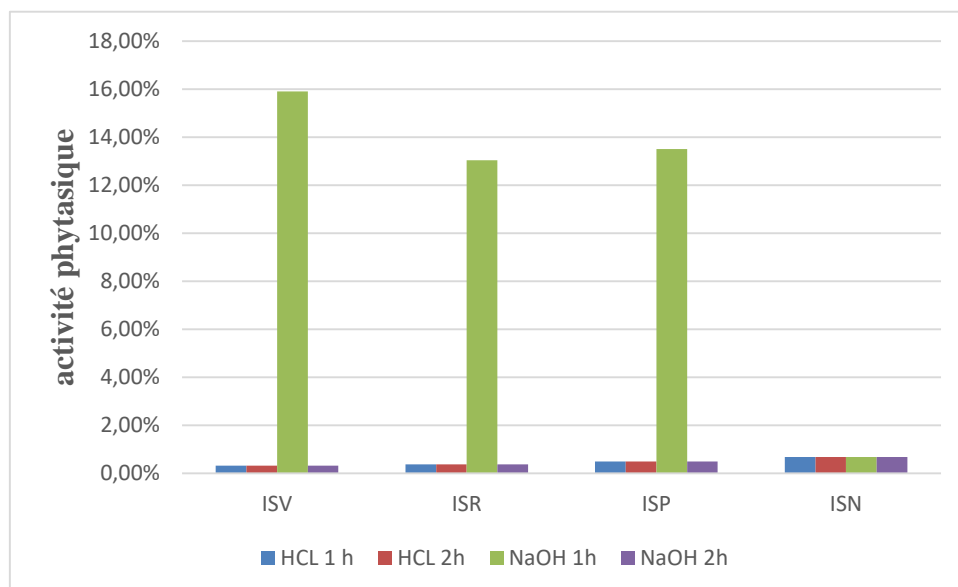


Figure 9 : résultats des traitements acido-basiques après 1h et 2h de traitement.

Les résultats obtenus révèlent que les phytases présentes dans les surnageants des isolats ISV, ISR, ISP, et ISN sont fortement sensibles au traitement acide par le HCL. Aucune activité phytasique n'est détectée après 1 heure et 2 heures d'exposition, indiquant une dénaturation rapide et complète de ces enzymes en milieu acide.

Ces observations montrent que les phytases étudiées sont particulièrement vulnérables au milieu acide et présentent une tolérance limitée au milieu alcalin. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études précédentes. Par exemple chez les bactéries, Niu *et al* en 2016 ont signalé que la phytase de *Yersinia enterocolitica* est sensible en milieu acide avec une perte importante d'activité. En revanche, les phytases de *Yersinia kristensenii* et *Yersinia rohdei*, qui se sont montrées plus stables (Niu *et al.*, 2016). Toutefois, il est possible d'améliorer la stabilité acide par des techniques de génie génétique. Par exemple, Tran *et al* en 2011 ont réussi à rendre une phytase alcaline thermostable provenant de *Bacillus* sp. MD2 plus résistante à l'acidité, grâce

à la mutation E227S, permettant au variant mutant de conserver plus de 80 % de son activité à pH 2,6 après 3 heures, contre 40 % pour l'enzyme sauvage.

Cependant, chez les champignons, Vohra et son équipe en 2002 ont montré que la phytase purifiée de la levure *Pichia anomala* est stable en milieu acide, ce qui en fait une enzyme potentiellement intéressante pour des applications. De même, Chen *et al* en 2015 ont rapporté que la phytase d'*Aspergillus niger* conservait 60 % de son activité à pH 2,5, démontrant ainsi une bonne résistance à l'acidité.

Aussi, Jog *et al* en 2005 ont isolé une phytase thermo-acido-stable produite par le champignon *Thermomyces lanuginosus* capable de fonctionner dans des conditions acides sévères. Grâce à leur résistance en milieu acide ces phytases peuvent être utilisées dans plusieurs secteurs industriels notamment comme additif alimentaire dans l'alimentation animale afin d'améliorer la qualité nutritionnelle des matières végétales et réduire l'effet antinutritionnel provoqué par le phytate ce qui empêche l'absorption des minéraux dans le tube digestif et cela grâce à son hydrolyse (Pragya *et al.*, 2023)

En ce qui concerne le milieu alcalin, l'exposition aux conditions alcalines (NaOH) montre une faible résistance pour les surnageants d'ISV, ISR, et ISP après 1 heure de traitement, avec des activités résiduelles respectives de 15,91%, 13,04%, et 13,51%. Cependant, une exposition prolongée (2 heures) entraîne une perte totale d'activité pour ces trois isolats, suggérant que les phytases ne peuvent tolérer un environnement alcalin sur une durée prolongée.

Le surnageant de l'isolat ISN, quant à lui, ne montre aucune activité en présence du NaOH, même après 1 h de traitement, ce qui indique une extrême sensibilité de ses phytases à ce traitement. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Greiner et Konietzny en 2000 qui ont trouvés que la phytase produite par le champignon *Aspergillus niger* était pratiquement inactive au dessus de pH 7.0 ce qui révèle sa sensibilité aux milieux alcalin.

En revanche Yao *et al* en 2014 ont rapporté que la phytase purifiée de la bactérie *Bacillus subtilis* était stable en milieu alcalin. De plus Vijayaraghvan *et al* en 2013 ont montré que. L'activité phytasique de le genre *Alcaligenes sp'* est avérée élevée (100 %) à pH 8,0. Enfin ce qui concerne le phytase fongique *Rhizopus microsporus* a également été caractérisée comme son alcalino-stabilité et cette activité a été stimulée lorsqu'elle a été maintenue à pH 8,0 et 9,0. Ces phytases sont bien utilisés dans les industries de traitement des eaux usées pour dégrader

l'acide phytique et ses sels présents dans les eaux (Gull *et al.*, 2023). Aussi, dans les industries alimentaires sont aussi utilisées comme additifs (Joudaki *et al.*, 2023).

L'objectif de ce travail est de rechercher et de caractériser l'activité phytasique de 4 isolats bactériens issus de différents types de sols. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus dans cette étude. Ces résultats révèlent la présence d'une activité phytasique chez les 4 isolats étudiés. Toutefois, les phytases produites présentent des caractéristiques distinctes, notamment en ce qui concerne le pH optimal, la température optimale, la thermostabilité ainsi que la tolérance aux traitements acido-basiques. Certaines de ces enzymes possèdent des propriétés particulières qui les rendent prometteuses pour des applications industrielles.

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

Les isolats	Activité enzymatique			Thermostabilité		Traitement acido –basique			
	Nature de l'expression de l'enzyme	T°C optimale	pH optimal	90°C		HCl		NaOH	
				1h	2h	1h	2h	1h	2h
ISV	Inductible	30	5	Faible	Faible	sensible	sensible	sensible	sensible
ISR	Inductible	30/35	7 et 5	Nulle	Nulle	sensible	sensible	sensible	sensible
ISP	Inductible	30/35	5	Forte	Nulle	sensible	sensible	sensible	sensible
ISN	Inductible	30/35	9 et 5	Nulle	Nulle	sensible	sensible	sensible	sensible

La production d'enzymes microbiennes joue un rôle clé dans l'industrie grâce à leur efficacité. Parmi elles, les phytases sont particulièrement importantes, car elles dégradent l'acide phytique pour libérer du phosphate inorganique (Jain *et al.*, 2024). Les bactéries du sol sont de grands producteurs de phytases, actives dans des conditions variées de pH et de température (Joudaki *et al.*, 2023). Par ailleurs, les microorganismes isolés d'environnements aquatiques représentent une source prometteuse pour la production de phytases, notamment pour des applications comme l'aquaculture durable. (Cao *et al.*, 2007) ; (Papatolis *et al.*, 2003)

Chez les bactéries, la phytase est une enzyme inductible, produite principalement en phase stationnaire, lorsque la croissance ralentit à cause du manque de nutriments (Liu *et al.*, 1998) ; (Greiner *et al.*, 1997). Chez *Escherichia coli*, cette production est déclenchée par une carence en phosphate inorganique, tandis que chez *Raoultella terrigena*, c'est le manque de carbone qui en est la cause principale (Touati *et al.*, 1987). De manière générale, la présence de phosphate inhibe la production de phytase chez de nombreuses bactéries, mais certaines, comme *Raoultella terrigena* ou les bactéries du rumen, échappent à cette régulation. (Yanke *et al.*, 1998). Chez *E. coli*, la production de phytase est contrôlée par des systèmes de régulation dépendant des nutriments disponibles : AMPc-CAP pour le carbone, NtrB/NtrC pour l'azote, et PhoB/PhoR pour le phosphate (Hengge, 1996). En phase stationnaire, le facteur sigma S (codé par le gène *rpoS* (Atlung *et al.*, 1997) joue un rôle central dans l'activation des gènes de phytase. Cependant, la présence de glucose peut inhiber cette production via un mécanisme de

répression catabolique impliquant AMPc-CAP, qui bloque également l'expression de rpoS. Enfin, chez certaines bactéries comme *Raoultella*, la présence de phytate ou de myo-inositol stimule la production de phytase, ce qui n'est pas observé chez *E. coli* (Touati *et al.*, 1987) ; (zamudio *et al.*, 2002) ; (Atlung *et al.*, 1997). Dans notre étude, les phytases issues des 4 isolats (ISV, ISR, ISP, ISN), sont toutes des enzymes inductibles, et leur expression est régulée par la présence de l'acide phytique

Concernant les températures optimales, selon les résultats résumés dans le Tableau 8 les phytases de la majorité des isolats ont montré une bonne activité à 30°C, ce qui les rend intéressantes pour l'industrie de la nutrition humaine, notamment dans le processus de fermentation et de panification, où elles peuvent améliorer la texture et le volume des pains. (Joudaki *et al.*, 2023).

De plus, certaines phytases présentent une activité élevée, voire optimale, à 35°C, ce qui les rend adaptées à être utilisées dans la formulation de détergents pour éliminer les taches contenant des composés de phytate, ainsi que dans l'industrie agroalimentaire pour améliorer la valeur nutritionnelle des aliments en réduisant la teneur en phytate (Sharma *et al.*, 2023)

Les résultats (Tableau 8) montrent que les phytases des isolats sont dotées d'une excellente activité à pH 5 acide, ce qui leur donne la possibilité d'être appliquées dans des industries qui nécessitent un pH acide comme dans les industries de nutrition humaines surtout pour les aliments à base de céréales et de légumineuses afin de diminuer le taux de acide phytique(Sharma *et al.*, 2013) et dans l'industrie d'alimentation animale des volailles où elles sont utilisées comme un supplément qui vise à améliorer la poids corporelle, la qualité des œufs, ou dans l'industrie de alimentation des porcins utilisée pour améliorer l'utilisation du phytate-P alimentaire et pour améliorer leur digestibilité des minéraux et des nutriments(konirtzny et Greiner, 2004).

Concernant la thermostabilité, les phytases stables aux températures élevées comme celles de l'isolat ISP, sont destinées à être utilisées dans les industries alimentaires pour les animaux monogastriques afin d'augmenter la disponibilité du phosphore et diminuer les effets antinutritionnels (Pragya *et al.*, 2023). Cependant, l'utilisation de la phytase comme enzyme alimentaire nécessite une tolérance aux températures élevées car les aliments pour animaux sont généralement granulés pour garantir aux animaux une alimentation équilibrée ; le processus de granulation industriel facilite également le stockage du produit contenant l'enzyme. Pendant ce processus les températures varient entre 60° et 90 °C et peuvent provoquer une inactivation de la phytase. Ainsi, la production d'aliments industriels nécessite l'identification de phytases présentant une thermostabilité élevée et la capacité de tolérer l'étape transitoire à haute

température dans la procédure de granulation (Vohra et Satyanara, 2003) et cela n'est pas le cas des phytases produit par les isolats ISR, ISV, ISN qui sont sensibles au traitement thermique.

D'autre part, l'un des objectifs majeurs des biotechnologies modernes est de découvrir les méthodes les plus prometteuses d'immobilisation des phytases afin de protéger l'enzyme lors du processus de granulation utilisé pour la production d'aliments pour animaux (Filippovich *et al.*, 2002).

Les phytases stables et résistantes au milieu acide peuvent être utilisées dans l'alimentation des animaux monogastriques grâce à leur résistance aux milieux gastriques de ces animaux, cependant nos phytases sont toutes sensibles au traitement acide ce qui les empêche d'être utilisées dans ce secteur (Joudaki *et al.*, 2023).

Par ailleurs, les phytases utilisées dans industries de traitement des eaux usées doivent être stables en milieu alcalin. Or, nos phytases sont également sensibles aux milieux alcalin, ce qui limite leur application dans ces domaines industriels (Gull *et al.*, 2023).

Conclusion et Perspectives

Dans cette étude, une recherche et une caractérisation de l'activité phytasique ont été menées sur 4 isolats bactériens récupérés à partir de différents types de sols : un sol vierge, un sol rhizosphérique prélevé autour d'un rosier sauvage, un sol de l'horizon A situé près d'un palmier, ainsi qu'un isolat bactérien issu directement des nodosités racinaires de l'espèce *Vicia faba*. L'activité phytasique a été évaluée par la capacité des surnageants des 4 isolats à libérer du phosphate inorganique.

Une fois l'activité phytasique confirmée, les phytases ont été caractérisées par dosage de leur activité enzymatique à différents pH (5, 7 et 9) et à différentes températures (20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C et 40 °C). La thermostabilité a également été étudiée en mesurant l'activité résiduelle après un traitement thermique à 90 °C pendant 1 h et 2 h, ainsi que la stabilité en milieu acido-basique pour les mêmes durées.

- Les résultats ont montré que les surnageants des 4 isolats sont capables de libérer du phosphate inorganique, indiquant une activité phytasique effective.
- La majorité des phytases ont présenté une bonne activité à pH 5, avec une température optimale de 30 °C. Cependant, des variations d'activité ont été observées en fonction des modifications de pH et de température.
- Concernant la stabilité thermique, la plupart des phytases ont perdu leur activité après une heure de traitement à 90 °C, à l'exception de l'isolat ISP qui a conservé une forte activité. Après 2h de traitement, tous les isolats, ont perdu leurs activités enzymatiques à l'exception de l'isolat ISV qui a conservé une faible activité résiduelle.
- Enfin, l'évaluation de la stabilité en milieu acido-basique a révélé que tous les isolats sont sensibles aux traitements en milieux acides ou basiques, avec une perte d'activité marquée après 1 ou 2 h de traitement.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que certaines de nos phytases peuvent être utilisées dans des industries telles que l'industrie de l'alimentation humaine et animale.

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

- Identification et purification ces phytases afin de les tester dans les différentes conditions industrielles ;

- Tester la possibilité d'utilisation de ces phytases dans divers secteurs industriels (agroalimentaire, nutrition animale, agriculture, traitement des eaux, etc.) ;
- Identification des gènes responsables de la synthèse de ces phytases pour être modifiés afin d'améliorer leur résistance aux conditions extrêmes et d'augmenter leur productivité ;
- Clonage et expression de ces gènes dans des bactéries modèles (*E. coli*, *Bacillus subtilis*) pour une production à échelle industrielle.

Références bibliographique

- Abbasi Kheirabadi, M., Saffar, B., Hemmati, R., & Mortazavi, M. (2022).** Thermally stable and acidic pH tolerant mutant phytases with high catalytic efficiency from *Yersinia intermedia* for potential application in feed industries. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Adomako, M. O., Roilola, S., & Yu, F. H. (2022).** Potential roles of soil microorganisms in regulating the effect of soil nutrient heterogeneity on plant performance. *Microorganisms*, 10(12), 2399.
- Agarwal, P. K. (2019).** A biophysical perspective on enzyme catalysis. *Biochemistry*, 58(6), 438–449.
- Aislabie, J., Deslippe, J. R., & Dymond, J. (2013).** Soil microbes and their contribution to soil services. In Dymond, J. R. (Ed.), *Ecosystem services in New Zealand – conditions and trends* (pp. 143–161). Manaaki Whenua Press
- Alcántara, A. R., & Sinisterra, J.-V. (2011).** Industrial biotechnology and commodity products. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive biotechnology* (2nd ed., Vol. 3, pp. 697–710). Elsevier.
- Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L., & Brøndsted, L. (1997).** Effects of σ^S and the transcriptional activator AppY on induction of *Escherichia coli* *hya* and *cbdAB-appA* operons in response to carbon and phosphate starvation. *Journal of Bacteriology*, 179(7), 2141–2146.
- Amaya, O., Barragán, M., & Tapia, F. (2013).** Biomasse microbienne dans les systèmes discontinus et continus and evolutionary history." *Nucleic acids research* 27.7 (1999): 1609-1618.
- Ao, W., Paiva, A. L., & Lei, X. G. (2020).** Update on characteristics of commercial phytases relevant to animal feed use. *Animal Nutrition*, 6(4), 379–392
- Aravind, L., & Koonin, E. V. (1999).** DNA polymerase β -like nucleotidyltransferase superfamily: Identification of three new families, classification, and evolutionary history. *Nucleic Acids Research*, 27(7), 1609–1618.
- Asensio, R., Minatchi, S., Achard, R., & Fernandes, P. (2010).** L'activité enzymatique, un indicateur simple et fiable pour prévoir l'impact des pratiques culturales sur la qualité des sols. *Innovations Agronomiques*, 9, 99–111.
- Barnabé, S., Sasseville, J. L., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2003).** Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières première *VECTEUR Environnement*, 36(2), 50–62
- Baker, F. et Silverton, R. (1976).** PRÉPARATION DES SUPPORTS DE CULTURE. *Technologie de laboratoire médical*, 481-509.

- Barrientos, L., Scott, J. J., & Murthy, P. P. (1994).** Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiology*, 106(4), 1489–1495.
- Barros, F. F. C., Simiqueli, A. P. R., de Andrade, C. J., & Pastore, G. M. (2013).** Production of biosurfactants by *Bacillus subtilis* using cassava wastewater as substrate. *Biodegradation*, 24(5), 563–572
- Bergna, A., Maund, S. J., & Screpanti, C. (2022).** The soil microbiota recovery in the agroecosystem: Minimal information and a new framework for sustainable agriculture. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(9), 5423.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2015).** *Biochemistry* (8th ed.). W. H. Freeman and Company.
- Bertrand, C., Martins, R., Quintas-Nunes, F., Reynolds-Brandão, P., Crespo, M., & Nascimento, F. (2024).** Exploration des caractéristiques fonctionnelles et génomiques de *Cellulophaga lytica* NFXS1, une bactérie marine productrice de zéaxanthine et d'enzymes lytiques qui favorise la croissance des microalgues. *The Microbe*
- 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.
- Brasil, B., De Siqueira, F., Salum, T., Zanette, C., & Spier, M. (2017).** Microalgues et cyanobactéries comme bio-usines enzymatiques. *Recherche sur les algues – Biocarburants et bioproduits issus de la biomasse*, 25, 76–89.
- Bugg, T. D. H. (2012).** *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Buvet, R. (1980).** La classification des enzymes et l'analyse énergétique des réactions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 67(3), 381–387.
- Campbell, G. L., & Bedford, M. R. (1992).** Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Canadian Journal of Animal Science*, 72(3), 449–46
- Cao, L., Bureau, D. P., & Sugiura, S. H. (2007).** Phosphorus nutrition, utilization and excretion by fish. *Aquaculture Research*, 38(6), 679–690.

- Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018).** Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238.
- Chen, W., Ye, L., Guo, F., Lv, Y., & Yu, H. (2015).** Enhanced activity of an alkaline phytase from *Bacillus subtilis* 168 in acidic and neutral environments by directed evolution. *Biochemical Engineering Journal*, 98, 137–143.
- Chet, I., & Henis, Y. (1975).** Sclerotial morphogenesis in fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 13, 169–192.
- Choi, J.-M., Han, S.-S., & Kim, H.-S. (2015).** Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1443–145
- Copeland, R. A. (2023).** *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* (3rd ed.). John Wiley & Sons
- Cooper, G. M. (2000).** *La cellule : une approche moléculaire*. Sunderland, MA : Sinauer Associ
- Cowieson, A. J., Wilcock, P., & Bedford, M. R. (2015).** Phytase in non-ruminant animal nutrition: Influences on nutritional quality and potential for sustainable intensification. *Animal Feed Science and Technology*, 203, 1–10.
- Dalal, R. C. (1977).** Soil organic phosphorus. *Advances in Agronomy*, 29, 83–117.
- Daniel, R. M., Dines, M., & Petach, H. H. (1996).** The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. *Biochemical Journal*, 317(1), 1–11.
- Das, S. K., & Varma, A. (2010).** Role of enzymes in maintaining soil health. In G. Shukla & A. Varma (Eds.), *Soil enzymology* (pp. 25–42). Springer Berlin Heidelberg.
- Daunoras, J., Kačergius, A., & Gudiukaitė, R. (2024).** Role of soil microbiota enzymes in soil health and activity changes depending on climate change and the type of soil ecosystem. *Biology*, 13(2), 85
- Dechavez, R. B., Serrano, Jr, A. E., Nuñal, S., & Caipang, C. M. (2011).** Production and characterization of phytase from *Bacillus* spp. as feed additive in aquaculture. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 4(3), 394–403.

- Demirkan, E., Baygün, E., & Usta, A. (2014).** Screening of phytate hydrolysis *Bacillus* sp. isolated from soil and optimization of the certain nutritional and physical parameters on the production of phytase. *Turkish Journal of Biochemistry / Turk Biyokimya Dergisi*, 39(2), 177–185.
- Dorbe, M. F., Saidi, N., & Hafaid, I. (2015).** Caractérisation des bactéries phytasiques isolées de différents types de sols enrichis en matières organiques. *Revue des Bioressources*, 5(2), 25–33.
- Drevon, J.-J. (2017).** Efficacité d'utilisation du phosphore pour la fixation symbiotique de l'azote et phytases des nodules de légumineuses. *Innovations Agronomiques*, 60, 3–10.
- Du, J., Ren, Y., Li, J., Zhang, S., Huang, H., & Liu, J. (2023).** The study on the effect of mercury pollution on soil microorganisms around mercury mining area. *Scientific Reports*, 13(1), 21605.
- Eremeev, V., Talgre, L., Kuht, J., Mäeorg, E., Esmaeilzadeh-Salestani, K., Alaru, M., ... Luik, A. (2019).** The soil microbial hydrolytic activity, content of nitrogen and organic carbon were enhanced by organic farming management using cover crops and composts in potato cultivation. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 70(1), 87–94.
- Esikova, T. Z., Anokhina, T. O., Abashina, T. N., Suzina, N. E., & Solyanikova, I. P. (2021).** Characterization of soil bacteria with potential to degrade benzoate and antagonistic to fungal and bacterial phytopathogens. *Microorganisms*, 9(4), 755.
- El-Toukhy, N. M., Youssef, A. S., & Mikhail, M. G. (2013).** Isolation, purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* MJA. *African Journal of Biotechnology*, 12(20).
- Fasimoye, F. O., Olajuyigbe, F. M., & Sanni, M. D. (2014).** Purification and characterization of a thermostable extracellular phytase from *Bacillus licheniformis* PFBL-03. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44(2), 193–205.
- Filippovich, S. Y., Isakova, E. P., Gessler, N. N., & Deryabina, Y. I. (2023).** Advances in immobilization of phytases and their application. *Bioresource Technology*, 379, 129030.
- Friboulet, A. (2003).** Des enzymes aux nouveaux biocatalyseurs. *L'Actualité Chimique*, (15), 15–19.

- Gaber, Y. (2012).** *Hydrolases as catalysts for green chemistry and industrial applications—Esterase, lipase and phytase* [Master's thesis, Lund University].
- García-Jiménez, B., Torres-Bacete, J., & Nogales, J. (2020).** Metabolic modelling approaches for describing and engineering microbial communities. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 226–246.
- Gattinger, A., Palojärvi, A., & Schloter, M. (2008).** Soil microbial communities and related functions. In P. Schröder, J. Pfadenhauer, & J. C. Munch (Eds.), *Perspectives for agroecosystem management* (pp. 279–292). Elsevier.
- Gautam, A. K., Sharma, N., Singh, R., Nain, L., & Sharma, P. (2013).** Structural and functional diversity of soil microbial communities in organic and conventional agroecosystems. *African Journal of Microbiology Research*, *7*(7), 555–567
- George, T. S., Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (2005).** Behaviour of plant-derived extracellular phytase upon addition to soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *37*, 977–988.
- Gessler, N. N., Serdyuk, E. G., Isakova, E. P., & Deryabina, Y. I. (2018).** Phytases and the prospects for their application. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *54*, 352–360.
- Greiner, R., & Konietzny, U. (2010).** Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. In M. R. Bedford & G. G. Partridge (Eds.), *Enzymes in farm animal nutrition* (2nd ed., pp. 96–128). CABI.
- Greiner, R., Konietzny, U., & Jany, K.-D. (1993).** Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *303*(1), 107–113.
- Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U., & Jany, K.-D. (1997).** Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *341*(2), 201–206.
- Guerrand, D. (2017).** Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. *OCL - Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, *24*(4), D403.
- Gull, S., Rather, A. M., Gupta, S., Wani, A. B., Bhat, M. A., & Bhat, A. R. (2023).** Microbial phytases: Properties and applications in the food industry. *Foods*, *12*(1), Article 1

- Gulati, H. K., Chadha, B. S., & Saini, H. S. (2007).** Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(1), 91–98.
- Habte, M. L., & Beyene, E. A. (2020).** Biological application and disease of oxidoreductase enzymes. In *Oxidoreductase*. Intech Open
- Hamza, T. A. (2017).** Bacterial protease enzyme: Safe and good alternative for industrial and commercial use. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 3(1), 1–10
- Haros, M., Rosell, C. M., & Benedito, C. (2001).** Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5450–5454.
- Headon, D. R., & Walsh, G. (1994).** The industrial production of enzymes. *Biotechnology Advances*, 12(4), 635–646
- Henao, L., Zade, R. S. H., Restrepo, S., Husserl, J., & Abeel, T. (2023).** Genomes of four *Streptomyces* strains reveal insights into putative new species and pathogenicity of scab-causing organisms. *BMC Genomics*, 24(1), 143.
- Hitchens, A. (1921).** Avantages des milieux de culture contenant de faibles pourcentages d'agar. *Le Journal des maladies infectieuses*, 29, 390-407.
- Hengge-Aronis, R. (1996).** Régulation de l'expression génique lors de l'entrée en phase stationnaire. In Neidhardt, F. C. (Éd.), *Escherichia coli et Salmonella : biologie cellulaire et moléculaire* (2^e éd., Vol. 1, pp. 1497–1512). ASM Press.
- Holland, I. B. (2004).** Translocation of bacterial proteins—An overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1694(1–3), 5–16.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013).** Enzyme immobilization: An update. *Journal of Chemical Biology*, 6(4), 185–205
- Howson, S. J., & Davis, R. P. (1983).** Production of phytate-hydrolysing enzymes by some fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 5(2), 377–382.
- Hurrell, R. F. (2003).** Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral inositol: From laboratory to clinic. *The Journal of Nutrition*, 133(11), 3778–3784.

- Igbasan, F. A., Männer, K., Miksch, G., Borriss, R., Farouk, A., & Simon, O. (2000).** Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins. *Archives of Animal Nutrition*, 53(4), 353–373
- Jackman, R. H., & Black, C. A. (1952).** Phytase activity in soils. *Soil Science*, 73(2), 117–126.
- Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998).** Microbial lipases: Form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16(9), 396–403
- Jain, S., Gupta, A., & Verma, N. (Eds.). (2024).** *Industrial applications of soil microbes* (Vol. 4). Bentham Science Publishers
- Jog, S. P., Garchow, B. G., Mehta, B. D., & Murthy, P. P. (2005).** Alkaline phytase from lily pollen: Investigation of biochemical properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 440(2), 133–140.
- Joudaki, H., Aria, N., Moravej, R., Rezaei Yazdi, M., Emami-Karvani, Z., & Hamblin, M. R. (2023).** Microbial phytases: Properties and applications in the food industry. *Foods*, 12(19), 3685.
- Jorquera, M., Martínez, O., Maruyama, F., Marschner, P., & de la Luz Mora, M. (2008).** Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microbes and Environments*, 23(3), 182–191
- Katsimpouras, C., & Stephanopoulos, G. (2021).** Enzymes in biotechnology: Critical platform technologies for bioprocess development. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 91–102.
- Kauser, S., Anjum, A., Yasmeen, R., & Mohyuddin, S. (2023).** Production de phytase par *Aspergillus terreus* et évaluation de sa stabilité. *Revue scientifique du Pakistan*.
- Kennelly, P. J., & Rodwell, V. W. (2017).** Enzymes : mécanismes d'action. Dans *Biochimie de Harper* (60e éd.). Paris : Éditions De Boeck Supérieur.
- Kermasha, S., & Eskin, M. N. A. (2021).** Selected industrial enzymes. In M. N. A. Eskin (Ed.), *Enzymes: Novel biotechnological approaches for the food industry* (Chap. 9, pp. 259–305). Academic Press.

- Khandbahale, S. V., Pagar, K. R., & Khankari, R. V. (2019).** Introduction to enzymes. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science*, 9(2), 123–130.
- Kim, Y. O., Lee, J. H., Kim, H. K., Yu, G. E., Oh, T. K., & Choi, Y. J. (1998).** Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *FEMS Microbiology Letters*, 162(1), 117–122
- King, N. J. (1967).** Glucoamylase of *Coniophora cerebella*. *Biochemical Journal*, 105(3), 577–583.
- Kingsley, L. J., & Lill, M. A. (2015).** Substrate tunnels in enzymes: Structure-function relationships and computational methodology. *Proteins*, 83(4), 599–611.
- Kirkiacharian, S., & Dumond, J. (2023).** *Enzymes et médicaments*. ISTE Group.
- Konietzny, U., & Greiner, R. (2004).** Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 12-18
- Korneykoya, M. V., Vasenev, V. I., Nikitin, D. A., Soshina, A. S., Dolgikh, A. V., & Sotnikova, Y. L. (2021).** Urbanization affects soil microbiome profile distribution in the Russian Arctic region. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(21), 11665.
- Kristjansson, J. K. (1989).** Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. *Trends in Biotechnology*, 7(12), 349–353
- Lei, X. G., & Stahl, C. H. (1994).** Biotechnology of phytase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(4), 363–373
- Lertcanawanichakul, M., & Sahabuddeen, T. (2023).** Characterization of *Streptomyces* sp. KB1 and its cultural optimization for bioactive compounds production. *PeerJ*, 11, e14909.
- Lei, X. G., Weaver, J. D., Mullaney, E., Ullah, A. H., & Azain, M. J. (2013).** Phytase, a new life for an "old" enzyme. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1, 283–309.
- Liu, B.-L., Rafiq, A., Tzeng, Y.-M., & Rob, A. (1998).** Induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(5), 415–424.

- Liu, Y., Chen, Y., Zhang, J., & Guo, L. (2015).** Application of phosphate-solubilizing bacteria in sustainable agriculture: From mechanisms to application. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(6), 1197–1210.
- Liu, X., Han, R., Cao, Y., Turner, B. L., & Ma, L. Q. (2022).** Enhancing phytate availability in soils and phytate-P acquisition by plants: A review. *Journal of Advanced Research*, 37, 1–13.
- Mamo, G., & Gessesse, A. (1999).** Effet des conditions de culture sur la croissance et la production d'alpha-amylase par un *Bacillus* sp. *Letters in Applied Microbiology*, 29(1), 61–65.
- Martin, I. V., & MacNeill, S. A. (2002).** ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biology*, 3(1), 1–17.
- Martinez, C. E., & Tabatabai, M. A. (1997).** Decomposition of biotechnology by-products in soils. *Journal of Environmental Quality*, 26(3), 625–632.
- Mascarell, J., & Ryan, M. (1997).** Technical aspects of enzyme utilization: Dry vs liquid enzymes. In *Feed manufacturing in Southern Europe: New challenges and options* (pp. 161–174). Méditerranéennes, Spain.
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2014).** Fifty-five years of enzyme classification. *Biological Chemistry*, 395(8), 793–802.
- Meshram, A., Singhal, G., Bhagyawant, S. S., & Srivastava, N. (2019).** Plant-derived enzymes: A treasure for food biotechnology. In R. R. Singh & A. R. Yadav (Eds.), *Enzymes in food biotechnology: Production, applications, and future prospects* (pp. 483–502). Elsevier.
- Milentyeva, I., Fotina, N., Zharko, M., & Proskuryakova, L. (2022).** Traitement microbien et stress oxydatif dans les plantes agricoles. *Transformation des aliments : techniques et technologies*.
- Mobley, H. L. T., & Hausinger, R. P. (1989).** Microbial urease: Significance, regulation and molecular characterization. *Microbiological Reviews*, 53(1), 85–108.
- Mouranche, A., & Costes, C. (1985).** *Hydrolases*.
- Munawar, A., Shaheen, M., Ramzan, S., Masih, S. A., Jabeen, F., Younis, T., & Aslam, M. (2023).** Diversity and enzymatic potential of indigenous bacteria from unexplored contaminated soils in Faisalabad. *Heliyon*, 9(4), e15256.
- Muneer, M. A., Hou, W., Li, J., Huang, X., Ur Rehman Kayani, M., Cai, Y., Yang, W., Wu, L., Ji, B., & Zheng, C. (2022).** Soil pH: A key edaphic factor regulating distribution and

functions of bacterial community along vertical soil profiles in red soil of pomelo orchard. *BMC Microbiology*, 22(1), 38.

Nannipieri, P., Sequi, P., & Fusi, P. (1996). Humus and enzyme activity. In A. Piccolo (Ed.), *Humic substances in terrestrial ecosystems* (pp. 293–328). Elsevier.

Navone, L., Vogl, T., Luangthongkam, P., Blinco, J., Luna-Flores, C., Chen, X., Von Hellens, J., Mahler, S., & Speight, R. (2021). Disulfide bond engineering of AppA phytase for increased thermostability requires co-expression of protein disulfide isomerase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology for Biofuels*, 14, Article 104.

Neemisha, & Sharma, S. (2022). Soil enzymes and their role in nutrient cycling. In *Structure and functions of pedosphere* (pp. 173–188). Singapore: Springer Nature Singapore.

Nelson, M. L. (1967). Phytic acid interactions and inositol phosphates: effect on mineral availability. *Journal of Animal Science*, 26(5), 1238–1242.

Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N., & Bhattarai, H. K. (2019). ATP synthase: structure, function and inhibition. *Biomolecular concepts*, 10(1), 1-10.

Ngwoke, K., Tochukwu, N., Ekwealor, C., Nwankwo, V., Obi-Okafor, U., Izundu, C., Okoye, F., Esimone, C., Proksch, P. et Situ, C. (2019). Propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires et inhibitrices de la cyclooxygénase-1 médiées par la peroxydase de l'extrait de *Fusarium solani*. *Biologie pharmaceutique*, 57, 310 - 317.

Niu, C., Luo, H., Shi, P., Huang, H., Wang, Y., Yang, P., & Yao, B. (2016). N-glycosylation improves the pepsin resistance of histidine acid phosphatase phytases by enhancing their stability at acidic pHs and reducing pepsin's accessibility to its cleavage sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 1004–1014

Odenthal, K., Nunes, E., Nunes, N., Fernandes, T., Fernandes, I., & De Carvalho, M. (2024). Microalgues et cyanobactéries comme sources naturelles d'enzymes antioxydantes et d'inhibiteurs d'enzymes pour la maladie d'Alzheimer et le diabète. *Recherche sur les algues*.

Olukosi, O. A., Cowieson, A. J., & Adeola, O. (2018). Perspectives of phytases in nutrition, biocatalysis, and soil stabilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(11), 4557-4568.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Kriger, N., Soccol, V.T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Applied Biochemist*, Vol. 29, 119-131.

- Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., & van Loon, A. (1997).** Clonage de gènes, purification et caractérisation d'une phytase thermostable issue du champignon *Aspergillus fumigatus*. *Microbiologie appliquée et environnementale*, 63, 1696–1700.
- Papatolis, P., Alexis, M. N., & Byapari, P. R. (2003).** Effects of dietary microbial phytase on growth performance and phosphorus utilisation of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles fed a low fish meal diet. *Aquaculture Research*, 34(14), 1241–1249.
- Patel, D., Rawat, R., Sharma, S., Shah, K., Borsadiya, N., & Dave, G. (2023).** Ingénierie assistée par linker de xylanase-phytase chimérique pour une meilleure tolérance thermique des enzymes alimentaires. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1–11.
- 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).
- Powar, V. K., & Jagannathan, V. (1982).** Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 151(3), 1102–1108.
- Pratima, B., & Umender, S. (1989).** Production d' α -amylase dans un milieu à faible teneur en azote. *Revue de Microbiologie Appliquée*, 38(2), 101–106.
- Pragya, Sharma, K. K., Kumar, A., Singh, D., Kumar, V., & Singh, B. (2023).** Immobilized phytases: An overview of different strategies, support material, and their applications in improving food and feed nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(22), 5465–5487.
- Petitjean, C., Philibert, A., Manneville, V., Amiaud, B., Perrin, A.-S., et al. (2019).** Biomasse microbienne carbonée et activités enzymatiques : Gammes de valeurs obtenues pour différents sols agricoles français et belges. *Étude et Gestion des Sols*, 26, 81–92
- Qasim, S. S., Shakir, K. A., Al-Shaibani, A. B., & Walsh, M. K. (2017).** Optimization of culture conditions to produce phytase from *Aspergillus tubingensis* SKA. *Food and Nutrition Sciences*, 8(7), 733–747.
- Raina, K., Rajamanickam, S., Singh, RP., Agarwal, R (2008).** Chemopreventive Efficacy of Inositol Hexaphosphate against Prostate Tumor Growth and Progression in TRAMP Mice, *Clin. Cancer Res.*, 14, 3177–3184.
- Ramli, A. N. M., Hong, P. K., Abdul Manas, N. H., & Wan Azelee, N. I. (2022).** An overview of enzyme technology used in food industry. In M. Chandrasekaran & A. A. Al-Dhabi (Eds.), *Value-addition in food products and processing through enzyme technology* (Chap. 25, pp. 333–345). Academic Press.

- Rani, A., Saini, K., Bast, F., Mehariya, S., Bhatia, S., Lavecchia, R., & Zuorro, A. (2021).** Microorganismes : une source potentielle de molécules bioactives pour les applications antioxydantes. *Molecules*, 26
- Rao, M. A., Scelza, R., & Gianfreda, L. (2014).** Soil enzymes. *Enzymes in agricultural sciences*. Foster City: OMICS Group eBooks, 10-43.
- Ravindran, V., Cabahug, S., & Ravindran, G. (1995).** Hydrolysis of phytate in the small intestine of broiler chickens. *Poultry Science*, 74(4), 594–601.
- Richardson, A. E., & Hadobas, P. A. (1997).** Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(6), 509–516.
- Robinson, P. K. (2015).** Enzymes: Principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–4
- Raboy, V. (2003).** Progress in breeding low phytate crops. *Journal of Plant Physiology*, 160(8), 825–833.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339.
- Sajidan, Wulandari, R., Sari, E. N., Ratriyanto, A., Weldekiros, H., & Greiner, R. (2015).** Phytase-producing bacteria from extreme regions in Indonesia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(5), 711–717.
- Sammyyeva, A., Saparova, H., Japarow, M., & Rejepov, G. (2024).** Importance of enzymes in cellular structure. *In Situ*, (3), 92–93. *Science, Nutrition and Natural Resources*, 10(12), 1–19.
- Sanbuga, E., Nadaroglu, H., Dikbas, N., Senol, M., & Cetin, B. (2014).** Purification, characterization of phytase enzyme from *Lactobacillus plantarum* bacteria and determination of its kinetic properties. *African Journal of Biotechnology*, 13(23), 2320–2327.
- Seo, M., Crochet, R. B., & Lee, Y.-H. (2014).** Targeting altered metabolism—Emerging cancer therapeutic strategies. In D. C. Young (Ed.), *Cancer drug design and discovery* (2nd ed., pp. 427–448).
- Shamsuddin, AKM (2002)** Anti-cancer function of phytic acid, *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 769–782.
- Sharma, A., Ahluwalia, O., Tripathi, A. D., Singh, G., & Arya, S. K. (2020).** Phytases and their pharmaceutical applications: Mini-review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101439
- Sharma, H., & Upadhyay, S. (2020).** Enzymes et leurs stratégies de production. Dans *[Titre du livre manquant]* (pp. 31–48).

- Sharma, D., Shukla, A., & Varma, A. (2023).** Insight into phytase-producing microorganisms for phytate solubilization and soil sustainability. *3 Biotech*, *13*(3), Article 75.
- Shukla, E., Bendre, A. D., & Gaikwad, S. M. (2022).** Hydrolases: the most diverse class of enzymes. In *Hydrolases*. IntechOpen.
- Silva, E.O., Bracarense, A (2016)** Phytic acid: From anti-nutritional to multiple protection factor of organic systems, *J. Food Sci.* *81*, 1357-1362
- Simons, P. C. M., Versteegh, H. A. J., Jongbloed, A. W., Kemme, P. A., Slump, Tamminga, S. (1990).** Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *British Journal of Nutrition*, *64*(2), 525-540.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2017).** Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech*, *7*(1), 15
- Singh, R., Singh, A., et Sachan, S. (2019).** Enzymes utilisées dans l'industrie alimentaire : amies ou ennemies ?. *Enzymes en biotechnologie alimentaire* .
- Singh, S. K., Kryukov, V. S., & al. (2021).** Reevaluation of phytase action mechanism in animal nutrition. *Frontiers in Animal Science*, *2*, Article 735702.
- Smith, C. A.; Rangarajan, M.; Hartley, B. S. (1991).** D-Xylose (D-glucose) isomerase from *Arthrobacter* strain N.R.R.L. B3728. Purification and properties. *Biochemistry* Sons.
- Souza, P. M. D. (2010).** Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*, *41*, 850-861.
- Suleimanova, A., Bulmakova, D., & Sharipova, M. (2020).** Heterologous expression of histidine acid phytase from *Pantoea sp.* 3.5.1 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *The Open Microbiology Journal*, *14*, 179–189
- Sutcliffe, M. J., & Scrutton, N. S. (2000).** Enzymology takes a quantum leap forward. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *358*(1766), 367–386.
- Tarafdar, J. C., & Claassen, N. (1988).** Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, *5*, 308–312
- Tarafdar, J. C., & Junk, A. (1987).** Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biology and Fertility of Soils*, *3*, 199–204.
- Taylor, T. G. (1965).** The availability of the calcium and phosphorus of plant materials for animals. *Proceedings of the Nutrition Society*, *24*, 105–112.

- Thepbandit, W., & Athinuwat, D. (2024).** Rhizosphere microorganisms supply availability of soil nutrients and induce plant defense. *Microorganisms*, 12(3), 558.
- Touati, E., Dassa, E., Dassa, J., & Boquet, P. L. (1987).** Phosphatase acide (pH 2,5) d'*Escherichia coli* : caractéristiques régulatrices. In A. Torriani-Gorini, F. G. Rothman, S. Argent, A. Wright, & E. Yagil (Eds.), *Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms* (pp. 31–40). American Society for Microbiology
- Tran, T. T., Mamo, G., Búxo, L., Le, N. N., Gaber, Y., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2011).** Site-directed mutagenesis of an alkaline phytase: Influencing specificity, activity and stability in acidic milieu. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(2), 177–182.
- Tsvetanova, F. (2024).** La pléthore de microbes aux activités anti-inflammatoires. Revue internationale des sciences moléculaires , 25. <https://doi.org/10.3390/ijms25052980>
- Türk, M., Mullaney, E. J., & Ullah, A. H. J. (2000).** Sequential dephosphorylation of phytate by phytase: Mechanistic insights into inositol phosphate cascade. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2676–2682.
- Turner, B. L., Paphazy, M. J., Haygarth, P. M., & McKelvie, I. D. (2002).** Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1420), 449–469
- Ullah, H., Daroch, M., Sardar, R., Ullah, A., Muhammad, N., Iqbal, F., & Onaizi, S. A. Tibtech, Vol.16, pp 396-403.**
- Utter, MF, & Scrutton, MC (1969).** Pyruvate carboxylase.
- Uwituze, Y., Nyiraneza, J., Fraser, T. D., Dessureaut-Rompré, J., Ziadi, N., & Lafond, J. (2022).** Carbon, nitrogen, phosphorus, and extracellular soil enzyme responses to different land use. *Frontiers in Soil Science*, 2, 814554.
- van Beilen, J. B., & Li, Z. (2002).** Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in biotechnology*, 13(4), 338-344.
- Vats, P., & Banerjee, U. C. (2004).** Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): An overview. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(1), 3–14
- Verma, V., Singhal, G., Joshi, S., Choudhary, M., & Srivastava, N. (2022).** Plant extracts as enzymes. In *Plant Extracts: Applications in the Food Industry* (pp. 209–223). Elsevier.
- Vingiani, G., De Luca, P., Ianora, A., Dobson, A., & Lauritano, C. (2019).** Enzymes microalgales aux applications biotechnologiques. *Marine Drugs* , 17

- Vijayaraghavan, P., Primiya, R. R., & Prakash Vincent, S. G. (2013).** Thermostable alkaline phytase from *Alcaligenes* sp. in improving bioavailability of phosphorus in animal feed: In vitro analysis. *International Scholarly Research Notices*, 2013, Article 394305.
- Vohra, A., & Satyanarayana, T. (2003).** Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(1), 29–60.
- Vucenik, I., & Shamsuddin, A. M. (2003).** Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: From laboratory to clinic. *Journal of Nutrition*, 133(11 Suppl 1), 3778S–3784S
- Vuong, T. M., Zeng, J. Y., & Man, X. L. (2020).** Soil fungal and bacterial communities in southern boreal forests of the Greater Khingan Mountains and their relationship with soil properties. *Scientific Reports*, 10(1), 22025.
- Walker, J. E. (2013).** The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 1-16
- Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012).** Spécificité de la symbiose dans le mutualisme légumineuse-rhizobium. *Microbiologie cellulaire* 14.
- Widawati, S., Ikhwan, A., S., & Sudiana, I. (2022).** Activité phytasique de bactéries productrices de phytase isolées de sédiments de mangrove. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 976(1), 012018.
- Williams, J. A. (2019).** Amylase. Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base.
- Wood, R. D., & Shivji, M. K. (1997).** Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes?. *Carcinogenesis*, 18(4), 605-610
- Wyss, M., Pasamontes, L., Remy, R., Kohler, J., Kuszniir, E., Gradient, M., Muller, F., & van Loon, A. P. G. M. (1998).** Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH 2.5 acid phosphatase. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4446–4451.
- Yanke, L. J., Selinger, L. B., & Cheng, K.-J. (1999).** Phytase activity of *Selenomonas ruminantium*: A preliminary characterization. *Agriculture and Agri-Food Canada Research Centre*.
- Yanke, L. J., Bae, H. D., Selinger, L. B., & Cheng, K.-J. (1998).** Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology*, 144(6), 1565–1573.
- Yao, M. Z., Lu, W. L., Chen, T. G., Wang, W., Fu, Y. J., Yang, B. S., & Liang, A. H. (2014).** Effect of metal ions on thermostable alkaline phytase from *Bacillus subtilis* YCJS isolated from soybean rhizosphere soil. *Annals of Microbiology*, 64, 1123–1131.

Yoon, S. J., Choi, Y. J., Min, H. K., Cho, K. K., Kim, J. W., Lee, S. C., & Jung, Y. H. (1996). Isolation and identification of phytase-producing Enterobacter. *FEMS Microbiology Letters*, 135(2-3), 203–207

Yu-Hong, Y. (2007). Étude des caractéristiques enzymatiques de la phytase. *Pêcheries d'eau douce*.

Zamudio, M., González, A., & Bastarrachea, F. (2002). Régulation de *Raoultella terrigena* comb. nov. : expression des phytases. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(1), 71–81.

Zengler, K., & Zaramela, L. S. (2018). The social network of microorganisms – how auxotrophies shape complex

Annexes

Il existe deux principaux types de milieux de culture utilisés au laboratoire pour la croissance et la prolifération des micro-organismes : la gélose nutritive (GN) et le bouillon nutritif (BN). Ces milieux sont qualifiés de « généraux » ou « non sélectifs » car ils permettent le développement d'une grande diversité de micro-organismes sans favoriser ni inhiber spécifiquement certaines espèces)

La gélose nutritive (GN) est un milieu solide polyvalent, utilisé pour cultiver de nombreuses bactéries ne présentant pas d'exigences nutritionnelles particulières (Hitchens, 1921). Ce milieu contient principalement de l'agar, un agent gélifiant qui lui confère sa consistance solide à température ambiante. Pour sa préparation, on dissout 23 g de poudre de GN (Conda Nutrient Agar ISO-6579, ISO-10273, ISO 19250) dans 1 L d'eau distillée. Le mélange est ensuite agité sur une plaque chauffante, puis stérilisé à l'autoclave pendant une heure.

Le bouillon nutritif (BN), quant à lui, est un milieu liquide fréquemment utilisé pour la culture de micro-organismes peu exigeants (Baker et Silverton, 1976). Il contient les mêmes composants que la GN, à l'exception de l'agar. Pour le préparer, on dissout 13 g de poudre de BN (Conda Nutrient Broth) dans 1 L d'eau distillée. Après agitation, le mélange est également stérilisé à l'autoclave pendant une heure.

Ces deux milieux sont largement utilisés en laboratoire pour la culture, la multiplication et le maintien de micro-organismes. Ils servent aussi dans des tests de stabilité, de contrôle de pureté des cultures, ainsi que dans diverses applications en recherche microbiologique.

Résumé

Les enzymes sont des protéines qui catalysent les réactions chimiques au sein des organismes vivants. Parmi les différentes classes enzymatiques, les hydrolases occupent une place prépondérante dans l'industrie, représentant environ 75 % des enzymes industrielles. Au sein de cette classe, les phytases suscitent un intérêt particulier. Ce sont des phosphatases capables d'hydrolyser le phytate, principale forme de phosphore organique présente dans les sols. Bien que les phytases soient retrouvées dans divers organismes (plantes, tissus animaux, etc.), celles produites par les bactéries présentent un grand intérêt, notamment dans le secteur industriel.

Dans ce travail, nous avons recherché et caractérisé l'activité phytasique de 4 bactéries isolées à partir de différents sols. L'étude a porté sur la cinétique enzymatique ainsi que sur l'influence de la température et du pH sur l'activité enzymatique. La thermostabilité et la stabilité en milieu acido-basique ont également été évaluées.

Les résultats ont révélé que les 4 isolats étudiés ont une activité phytasique notable. Les phytases des isolats ISV, ISR et ISN ont une température optimale d'activité à 30 °C, tandis que celle de l'isolat ISP, elle est de 35 °C. Concernant le pH, les phytases des isolats ISV et ISP ont une activité optimale à pH 5, celle de l'isolat ISR à pH 7, et celle de l'isolat ISN à pH 9. En ce qui concerne la stabilité thermique, la majorité des phytases ont perdu leurs activités après 1 h de traitement à 90°C, à l'exception de celles de l'isolat ISP, qui ont conservé une forte activité. Après 2 h de traitement, toutes les phytases avaient perdu leur activité, sauf celle de l'isolat ISV, qui présentait encore une faible activité résiduelle. Enfin, l'étude de la stabilité en milieu acido-basique a montré que toutes les phytases sont sensibles à des conditions extrêmes de pH, avec une perte significative d'activité après 1 ou 2 h de traitement.

Mots clés : enzymes, activité phytasique, , isolats, bactéries, sols, stabilité, industrie.

Summray :

Enzymes are proteins that catalyze chemical reactions within living organisms. Among the different Enzymatic classes, hydrolases play a major role in industry, accounting for approximately 75% of industrial enzymes. Within this class, phytases have attracted particular interest. These are phosphatases capable of hydrolyzing phytate, the main form of organic phosphorus found in soils. Although phytases are found in various organisms (plants, animal tissues, etc.), those produced by bacteria are of great interest, particularly in the industrial sector. In this study, we investigated and characterized the phytase activity of four bacterial strains isolated from different soils. The study focused on enzymatic kinetics, as well as the influence of temperature and pH on enzyme activity. Thermostability and stability in acidic and basic media were also evaluated. The results revealed that the four studied isolates exhibited notable phytase activity. The phytases from the ISV, ISR, and ISN isolates had an optimal activity temperature of 30 °C, while that of the ISP isolate was 35 °C. Regarding pH, the phytases from the ISV and ISP isolates had optimal activity at pH 5, that of the ISR isolate at pH 7, and that of the ISN isolate at pH 9. As for thermal stability, most of the phytases lost their activity after 1 hour of treatment at 90 °C, except for those from the ISP isolate, which retained high activity. After 2 hours of treatment, all phytases had lost their activity, except for that of the ISV isolate, which still showed a low residual activity. Finally, the study of stability in acidic and basic environments showed that all phytases are sensitive to extreme pH conditions, with a significant loss of activity after 1 or 2 hours of treatment.

Keywords : enzymes, phytase activity, stability, isolates, bacteria, soils, stability, industry.

المخلص:

الإنزيمات هي بروتينات تُحفّز التفاعلات الكيميائية داخل الكائنات الحية. ومن بين الفئات المختلفة من الإنزيمات، تحتل الهيدرولازات مكانة بارزة في الصناعة، حيث تمثل حوالي 75% من الإنزيمات الصناعية. ومن بين هذه الفئة، تحظى الفيتازات باهتمام خاص، فهي فوسفاتازات قادرة على تحلل الفيتات، وهو الشكل الرئيسي للفوسفور العضوي الموجود في التربة. وعلى الرغم من وجود الفيتازات في كائنات مختلفة (كالنباتات والأنسجة الحيوانية وغيرها)، فإن تلك التي تنتجها البكتيريا تُعد ذات أهمية كبيرة، خاصة في القطاع الصناعي. في هذا العمل، قمنا بالبحث عن نشاط الفيتاز وتوصيفه في أربع سلالات توّقت شملت على النشاط الإنزيمي. كما تم تقييم الثبات الحراري والثبات في وسط حمضي-قاعدي. أظهرت (pH) الدراسة الحركية تأثير درجة الحرارة ودرجة الحموضة هي 30 ISV وISR وISN النتائج أن العزلات الأربع المدروسة تمتلك نشاطاً فيتازياً ملحوظاً. فقد كانت درجة الحرارة المثلى لنشاط الفيتازات في العزلات ISR والعزلة 5 pH عند ISV,ISP. أما من حيث درجة حموضة فقد كان النشاط الأمثل لفيتازات القوانين ISP درجة مئوية بينما كانت 35 درجة مئوية للعزلة ISV وفيما يتعلق بالثبات الحراري، فقد فقدت معظم الفيتازات نشاطها بعد ساعة واحدة من المعالجة عند 90 درجة مئوية، عند ISN ، والعزلة 7 pH عند التي ISV التي احتفظت بنشاط قوي. وبعد ساعتين من المعالجة، فقدت جميع الفيتازات نشاطها، باستثناء إنزيمات العزلة ISP باستثناء تلك التابعة للعزلة أظهرت نشاطاً متبقياً ضعيفاً. وأخيراً، أظهرت دراسة الثبات في الوسط الحمضي-القاعدي أن جميع الفيتازات كانت حساسة للظروف القسوى لدرجة الحموضة، مع فقدان كبير للنشاط بعد ساعة أو ساعتين من المعالجة.

الكلمات المفتاحية: الإنزيمات ، نشاط فيتازي، عزلة، بكتيريا، تربة، ثبات، صناعة