

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUEES

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT

Spécialité : Biochimie

THEME

Optimisation de la production d'amylases chez une souche d'actinomycète thermophile par plan d'expériences et étude biochimique avec application dans le domaine de la détergence

Présentée par : M^{lle} KHEROUF Marwa

Directeur de thèse : Mr. LADJAMA Ali

Prof., Université Badji Mokhtar Annaba

Co-Directrice de thèse : Mme. HABBECHÉ Amina

MCB., Université Badji Mokhtar Annaba

Membres de Jury:

Président: Mr. CHEKIREB Djamel

Prof., Université Badji Mokhtar Annaba

Examinatrice : Mme. SOUIKI Lynda

Prof., Université 8 Mai 1945, Guelma

Examineur : Mr. BOUMENDJEL Mahieddine

MCA., Université Badji Mokhtar Annaba

Invitée : Mme. BENAMIA Fatiha

Prof., Université Badji Mokhtar Annaba

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience nécessaires pour réaliser ce travail de recherche.

Ce travail de thèse Doctorale a été réalisé au Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquée (LBMA) au département de biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Badji Mokhtar Annaba. Par ailleurs la partie immobilisation de l'enzyme a été réalisée au laboratoire de biochimie et cela dans le cadre de mon stage PNE en Turquie.

*Au terme de ce travail, je tiens à remercier en tout premier lieu mon directeur de thèse monsieur **LADJAMA Ali**, Professeur à l'université d'Annaba pour avoir accepté de diriger ce travail avec compétence et une grande expérience, pour sa disponibilité, son aide et sa rigueur en matière de rédaction ainsi que pour ces précieux conseils. De même que j'adresse un remerciement particulier à madame **HABBECHÉ Amina** ma co-directrice de thèse pour son intérêt, son soutien, ses conseils, et surtout son écoute et sa compréhension tout au long de ces années.*

*Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Madame **BENAMIA Fatiha**, Professeur à l'université d'Annaba qui m'a accompagnée dans la partie optimisation de la production des amylases par plan d'expériences. Grâce à elle, j'ai pu maîtriser la notion de plan d'expériences. Qu'elle trouve toute ma gratitude*

Mes vives reconnaissances vont également

*A monsieur **CHEKIREB Djamel**, Professeur à l'université d'Annaba, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. qui m'a aussi enseigné la matière de génie biochimique avec beaucoup de rigueur et dont les fruits sont exploités dans cette thèse. Toute ma gratitude.*

*A madame **SOUIKI lynda**, Professeur à l'université de Guelma, qui m'a fait l'honneur d'examiner mon travail.*

*Je tiens également à remercier monsieur **BOUMENDJEL Mahieddine M.C.A**, à l'université d'Annaba d'avoir accepté de juger ce travail.*

Remerciements

*Je tiens à remercier chaleureusement **Dr. KEROUEZ B** et **Dr. KHELIL O** pour leurs aides et leurs précieux conseils.*

*Je remercie également toute l'équipe du Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée et particulièrement **Dr. Tichati L** pour leur disponibilité, leur amabilité ainsi que pour leur aide scientifique.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à **M. ADEM** pour l'excellent accueil qui m'a été réservé tout au long de mon stage au sein de son laboratoire, pour la qualité de l'accompagnement dont j'ai bénéficié, pour la bienveillance et la disponibilité dont il a fait preuve à mon égard. J'ai eu l'occasion d'acquérir de nouvelles connaissances et compétences notamment dans l'immobilisation d'enzyme. Celles-ci me seront fort précieuses pour la réalisation de mes projets à venir. De même, je remercie également tous les membres du personnel de l'Université de Çankırı qui ont mis tout en œuvre pour que mon stage se déroule dans les meilleures conditions possibles.*

En fin mes remerciements sont adressés au ministère de l'enseignement supérieur qui m'a octroyé une bourse PNE d'une année dans le cadre de ma thèse.

Dédicaces

Dédicaces

Ce travail de thèse Doctorale est dédié à :

*Mes chères amies **Sara, Rim, Roumaïssa, Asma, narimane** et pour nos délires, nos fous rires, nos moments de bonheur et de déprime qu'on a partagé pendant ces années !!!!*

*J'adresse mes chaleureux remerciements à **Lotfi** qui a été toujours là pour me soutenir, me remonter le moral et m'encourager durant ces années de Doctorat.*

Il me reste l'essentiel, je remercie chaleureusement ma grande mère, mes parents et ma tante pour tous ce qu'ils ont fait pour moi. Merci du fond du cœur pour votre patience, votre amour, vos encouragements et votre soutien inconditionnel pendant toutes ces longues années d'étude et sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui. Je vous dédie ce travail.

*Enfin, je remercie mes frères (**Maher et Haithem**), mes sœurs (**Lynda, Amani et nouzha**) et mes chères cousines (**Souhaila, Nadra et Chaima**) pour leur soutien au cours de ces années.*

Que toutes les personnes que j'ai oublié de citer trouvent dans ce dernier paragraphe mes sincères reconnaissances et mes remerciements distingués.

Table des matières

Liste des Abréviations	I
Liste des Figures.....	II
Liste des Tableaux.....	III
Résumé.....	IV
Abstract	V
المخلص	VI
Introduction générale.....	1

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Les enzymes amylolytiques et leurs substrats	5
1. Les enzymes amylolytiques.....	5
1.1. Classification des amylases	5
1.2. Les α -amylases	7
1.2.1. Source d' α -amylases.....	7
1.2.2. Mécanisme d'action	9
1.2.3. Structure.....	10
1.2.4. Caractéristiques biochimiques de l' α -amylase.....	11
1.2.5. Substrats préférentiels.....	12
1.2.5.1. L'amidon : structure, origine propriétés physique et fonctionnelle	12
1.2.5.2. Les agro-déchets	16
1.3. Les β -amylases	16
1.4. Les Pullulanases	16
1.4.1. Propriétés biochimiques	18
1.4.2. Substrat préférentiel et mode d'action	18
1.4.3. Sources de la pullulanase	19
1.5. Facteurs affectant la production des amylases	19
1.6. Immobilisation des amylases.....	21
1.7. Aspect moléculaire de la production des amylases	22

Table des matières

2. Applications des enzymes amylolytiques	23
2.1. Liquéfaction de l'amidon et saccharification	24
2.2. Désencollage des textiles	24
2.3. Industrie de la boulangerie	24
2.4. La détergence.....	24
2.5. Domaine médical et pharmaceutique	25
2.6. Production du bioéthanol	25
2.7. La valorisation des agro-déchets	25
Chapitre 2 : Les actinomycètes producteurs d'hydrolases et leurs importances économiques.	26
1. Généralités	26
2. Ecologie et distribution dans la nature	27
3. Classification	28
4. Le genre <i>Actinomadura</i>	29
5. Les actinomycètes en tant que sources d'enzymes.....	30
Chapitre 3 : Les plans d'expérience	32
1. Généralités	32
2. Plans pour screening	33
2.1. Plan de Plackett et Burman.....	33
2.2. Plan de Taguchi	33
3. Plans pour l'optimisation des niveaux des facteurs.....	34
3.1. Plan composite centré.....	34
3.2. Plan de Box Behnken	34
Partie expérimentale	
Matériel et méthodes	
Partie 1 : Optimisation de la production d'amylases par plan d'expériences	35
1.1. Souche utilisée.....	35
1.2. Production de l'enzyme amylase et conditions de culture	35

Table des matières

1.2.1. Recherche de l'activité amylolytique globale sur milieu solide (Test qualitatif) ...	35
1.2.2. Recherche de l'activité amylopullulanique sur milieu liquide (Test quantitatif)...	36
1.3. Méthodes analytiques	37
1.3.1. Dosage de l'activité amylopullanique.	37
1.3.2. Dosage des protéines	38
1.3.3. Mesure de l'activité spécifique (AS)	38
1.4. Optimisation de la production d'amylases de la souche <i>A.keratinilytica</i> Cpt29	40
1.4.1. Sélection de la meilleure source d'azote et de carbone	40
1.4.2. Criblage des facteurs influençant la production d'amylases par l'utilisation du plan Plackett-Burman	41
1.4.3. Optimisation des composants sélectionnés par Méthodologie des Surfaces de Réponse (RSM) basée sur un plan Box-Behnken	43
1.4.4. Analyses statistiques et modélisation.....	45
1.4.5. Test de validation	45
1.5. Méthodes analytiques	45
Partie 2 : Extraction, purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application de l'amylase dans la détergence.....	46
2.1. Purification.....	46
2.1.1. Préparation de l'extrait enzymatique brut.....	46
2.1.2. Précipitation au sulfate d'ammonium	46
2.1.3. Chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-75).....	46
2.2. Caractérisation biochimique de l'enzyme purifiée	46
2.2.1. Contrôle de la pureté et détermination de la masse molaire par électrophorèse (PAGE-SDS).....	47
2.2.2. Effet du pH sur l'activité et la stabilité enzymatique	47
2.2.3. Effet de la température sur l'activité et la stabilité enzymatique	48
2.2.4. Effets des ions métalliques, des inhibiteurs et de solvants organiques sur la stabilité enzymatique	49

Table des matières

2.2.5. Analyse des produits de dépolymérisation par chromatographie sur couche mince (CCM)	40
2.3. Immobilisation d'enzyme	51
2.3.1. Mode opératoire (condition d'immobilisation).....	51
2.3.2. Efficacité de la réutilisation d'amylase immobilisée	52
2.3.3. Caractérisation de l'enzyme immobilisée	52
2.4. Essais d'applications biotechnologiques de l'amylopullulanase (extrait brut)	53
2.4.1. Test de la compatibilité avec divers détergents à lessive commerciaux	53
2.4.2. Analyse de la performance de lavage	53
Résultats et discussion	
Partie 1 : Optimisation de la production d'amylases par plan d'expériences	55
1.1. Mise en évidence de l'activité amylolytique de la souche Cpt29.....	55
1.1.1. Détection de l'activité amylolytique sur milieu solide	55
1.1.2. Mesure de l'activité amylopullulansique sur milieu liquide.....	56
1.2. Optimisation de la production d'amylases par plan d'expériences	58
1.2.1. Sélection de la meilleure source d'azote et de carbone	58
1.2.1.1. Choix de la meilleure source de carbone	58
1.2.1.2. Choix de la meilleure source d'azote	60
1.2.2. Etude de l'optimisation de production d'amylases par plan d'expérience	61
1.2.2.1. Criblage des facteurs par le modèle Plackett –Burman	61
1.2.2.2. Détermination des optima par le plan Box-Behnken	64
Partie 2 : Extraction, purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application de l'amylase dans la détergence.....	74
2.1. Purification et caractérisation biochimiques.....	74
2.1.1. Purification	74
2.1.2. Caractérisation de l'enzyme purifiée	77
2.1.2.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité	77
2.1.2.2. Effet de la température sur l'activité et sur la stabilité	80

Table des matières

2.1.2.3. Détermination de la masse molaire	82
2.1.2.4. Effets des ions métalliques, des inhibiteurs et des solvants organiques sur la stabilité enzymatique	83
2.1.2.5. Analyse des produits d'hydrolyse par CCM et mode d'action	86
2.2. Immobilisation de l'enzyme	88
2.2.1. Rendement d'immobilisation.....	88
2.2.2. Efficacité de la réutilisation de l' α -amylase immobilisée.....	89
2.2.3. Propriétés biochimique de l'enzyme immobilisée.....	90
2.2.3.1. Effet de la température et du pH sur l'activité et sur la stabilité de l'amylase immobilisée.....	90
2.3. Essais d'application dans la détergence.....	93
2.3.1. Test de la compatibilité avec divers détergents à lessive commerciaux	93
2.3.2. Analyse de la performance du lavage	94
Conclusion et perspectives	96
Références bibliographiques	100
Annexes.....	125

Liste des abréviations

Liste des abréviations

APS : Ammonium Persulfate
AS : Activité Spécifique
BBC: Bleu Brillant de Comassie
CCM: Chromatographie sur Couche Mince
BBD: Box-Behnken
BSA: Sérum Albumine Bovine
Cpt : Compost poulet thermophile
DNS: acide 3,5-dinitrosalicylique
GH : Glycosides hydrolases
EDTA: Ethylène Diamine Tetra-Acétique
ISP: International Streptomyces Project
IUBMB: International Union of Biochemistry and Molecular Biology
kDa: Kilodalton
PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
q.s.p : quantité suffisante pour
Rf: Rapport frontal
rpm: Rotation Par Minute
SDS : Sodium dodecyl sulfate
TEMED : N,N,N'N' –Tetraméthylène diamine
TRIS : Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-pipérazineéthane sulfonique
β-ME : Béta- mercaptoéthanol
PVDF-co-HFP-NiO : polyfluorure de vinylidène-co-hexafluoropropylène d'oxyde de nickel

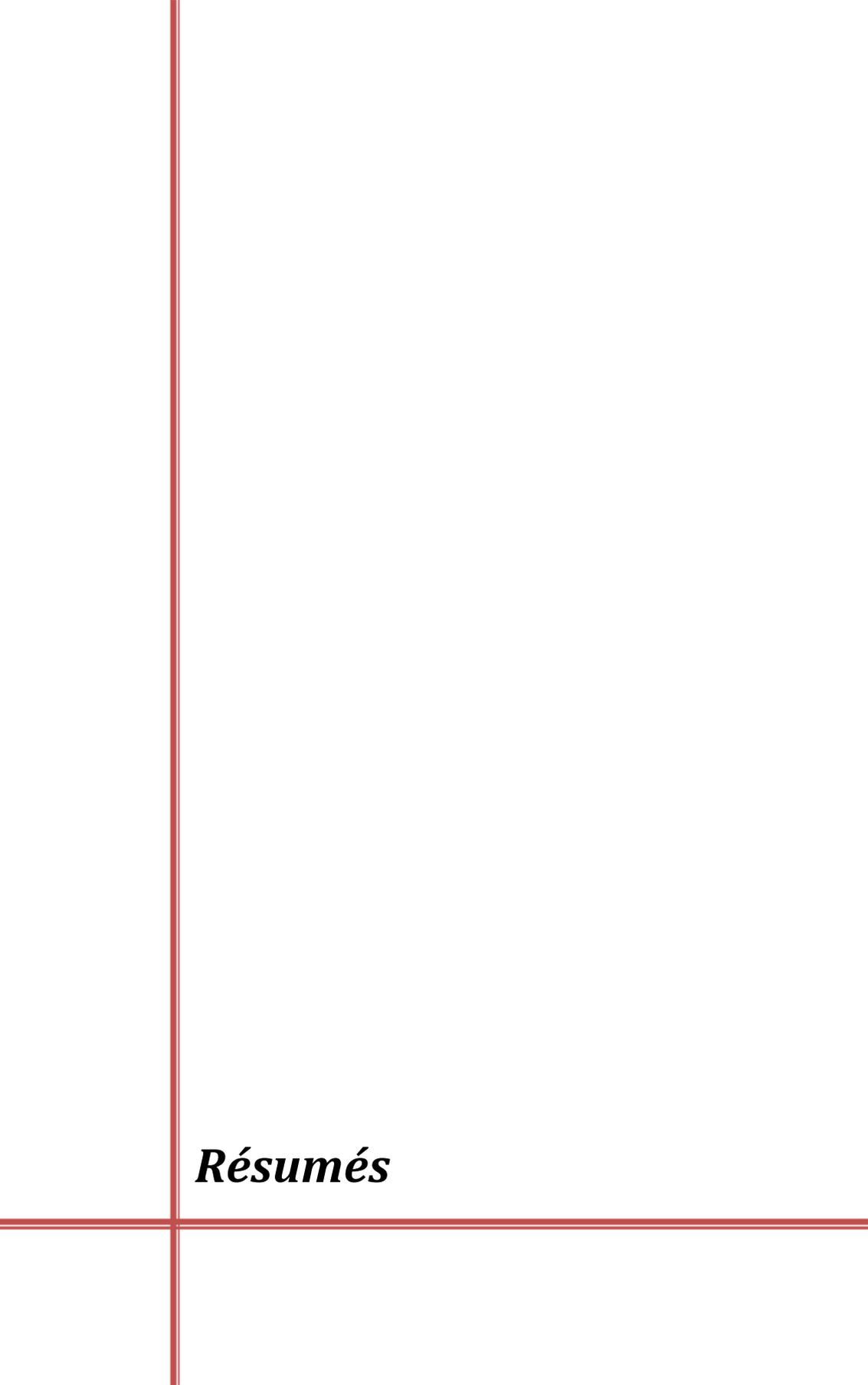
Liste des figures

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Classification des amylases selon le mode d'action	6
2	Classification des amylases	7
3	Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques	10
4	1a, 1b Structure cristalline de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> α -amylase. 2a, 2b Structure cristalline de α -amylase de <i>Bacillus sp.</i> Indépendant du calcium (Ca^{2+}).	10
5	Structure de l'amidon	13
6	Structure chimique de l'amylose	14
7	Structure chimique d'amylopectine	14
8	Structure chimique du pullulane	19
9	Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes	26
10	Classification du phylum des Actinobactéria basée sur des données de séquençage de l'ADNr 16S.	29
11	Photographies de la morphologie de la souche <i>Actinomadura keratinilytica sp. nov.</i>	30
12	Le film membranaire PVDF-co-HFP-NiO (support immobilisation)	41
13	Mise en évidence de l'activité amylolytiques de la souche Cpt29 sur milieu solide à base d'amidon (test qualitatif)	55
14	Effet de différentes sources de carbone sur la production d'amylases chez la souche <i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt29	59
15	Effet des différentes sources d'azote sur la production d'amylases	59
16	Charte de Pareto montrons l'effet standard de chaque variable	63
17	Tracé des surfaces de réponse (a) et le contour plot (b) montrant l'interaction entre l'amidon et la tryptone	69
18	Tracé des surfaces de réponse (a) et le contour plot (b) montrant l'interaction entre la tryptone et pH	70
19	Tracé des surfaces de réponse (a) et le contour plot (b) montrant l'interaction entre l'amidon et pH	71
20	Diagramme d'optimisation montrant l'effet de l'amidon, tryptone et le pH sur la production d'amylase	72
21	Profil d'éluion à la sortie de la colonne de filtration Sephadex G-75.	75
22	Electrophorèse des protéines en PAGE- SDS colorée au bleu de Coomassie	77
23	Détermination du pH optimum de l' α -amylase	79
24	Effet du pH sur la stabilité de l' α -amylase	80
25	Effet de la température sur l'activité de l' α -amylase	81
26	Effet de la température sur la stabilité de l' α -amylase	82
27	Analyse des composés d'hydrolyses enzymatiques de l'amidon et de pullulane par CCM	86
28	Réutilisation de l' α -amylase immobilisée	89
39	Effet de la température sur l'activité de l' α -amylase immobilisée	91
30	Effet de la température sur la stabilité de l' α -amylase immobilisée	91
31	Effet du pH sur l'activité de l' α -amylase immobilisée	92
32	Effet du pH sur la stabilité de l' α -amylase immobilisée	92
33	Stabilité et compatibilité de l' α -amylase d' <i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt29 en présence de détergents ménagers liquides et solides	93
34	Analyse du pouvoir détachant de l'extrait brut de l' α -amylase de l' <i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt29.	95
35	Courbe d'étalonnage de la BSA	129
36	Courbe d'étalonnage de maltose	130
37	Courbe de la masse molaire en fonction de la distance de migration.	134

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Diversité des micro-organismes amylolytiques et propriétés biochimiques de leurs amylases.	9
2	Répartition des Actinomycètes dans la nature	28
3	Quelques enzymes hydrolytiques commerciales produites par les actinomycètes et leurs applications	31
4	Matrice de Plackett et Burman pour l'étude de 8 variables avec 12 expériences	42
5	Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Plackett et Burman	43
6	Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré	44
7	Matrice de Box-Behnken pour l'étude de 3 variables avec 15 expériences.	45
8	Les résultats de l'activité amylasique sur les différents milieux formulés selon le plan expérimental de Plackett–Burman	62
9	Effets estimés et les Coefficients de différents facteurs sur la réponse	64
10	Valeurs observées et prédites des activités amylasique, obtenues par le plan Box-Behnken	65
11	Tous les coefficients de régression estimés pour la réponse (Y)	66
12	ANOVA du modèle obtenu par le plan Box- Behnken (Eq. 3)	67
13	Bilan de purification d'amylases	76
14	Effets de divers ions métalliques, inhibiteurs, détergent et solvant organique sur l' α -amylase de l' <i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt29	85
15	Activités de l' α -amylase dans les différentes fractions durant le processus de l'immobilisation	88
16	Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (BSA)	128
17	Gamme d'étalonnage du maltose.	129
18	Composition du gel de polyacrylamide 10%	133



Résumés

Résumé

Les microorganismes sont la source majeure de la production des glycosides hydrolases (GH) d'intérêt biotechnologique. Dans ce sens, une souche d'actinomycète thermophile *Actinomadura kératinilytica* Cpt 29 (Numéro d'accès KC447297) a été isolée du compost de poulet (Nord-est Algérie) et a servi pour la production des amylopullanases. Ainsi, dans un premier temps, les différentes investigations ont montré que la culture de la souche sur milieu solide et liquide secrète des amylopullanases extracellulaires actives sur l'amidon comme seule source de carbone. Dans un deuxième temps, les travaux de recherche ont procédé à l'optimisation de la production d'amylopullanases sur milieu liquide en utilisant un modèle mathématique selon l'approche d'un facteur à la fois et la conception de Plackett-Burman. De plus, le niveau optimal de chaque facteur a été déterminé à l'aide du plan de Box-Behnken (BBD). Suite à ces différents travaux, l'analyse a montré que l'amidon de maïs et la tryptone sont les meilleures sources de carbone et d'azote respectivement, l'amidon de maïs, la tryptone et le pH semblent être les variables les plus influentes sur la production d'amylases. Ainsi, l'optimisation a permis d'augmenter le niveau d'activité enzymatique pour atteindre une valeur de 192.27 UI/ml, Ce modèle mathématique a permis d'augmenter le niveau de production de l'ordre de 3,84 fois ce qui est relativement considérable. Après optimisation, l'enzyme est purifiée et ses différentes caractéristiques biochimiques sont élucidées : masse molaire, pH optimum, température optimale, thermostabilité, stabilité vis avis du pH, effet des métaux, solvants organiques et les inhibiteurs. Ainsi, une activité enzymatique optimale a été enregistrée avec un pH alcalin de 8.0 et une température optimale de 70°C et significativement augmentée par les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Une bonne stabilité a été conservée sur une large gamme de pH et de température et une bonne tolérance envers les solvants organiques. L'étude du mode d'attaque de l'enzyme par CCM sur l'amidon a montré que les produits finaux sont le maltose et d'autres oligomères de tailles plus élevées ce qui donne le caractère endo-amylasique. Par ailleurs, l'immobilisation de cette enzyme sur un film membranaire de type PVDF-co-HFP-NiO a amélioré sa thermostabilité qui passe de 70 à 75°C ce qui est au profit des bio-industries. Du point de vue application biotechnologique, l'amylase obtenue a montré une forte tolérance aux détergents commerciaux testés et une excellente efficacité de lavage, ce qui fait de cette enzyme un bon candidat comme nouvel additif intéressant pour les formulations de détergents.

Mots clé: Actinomadura, Amylase, Thermostable, Purification, Amidon, pullulane.

Abstract

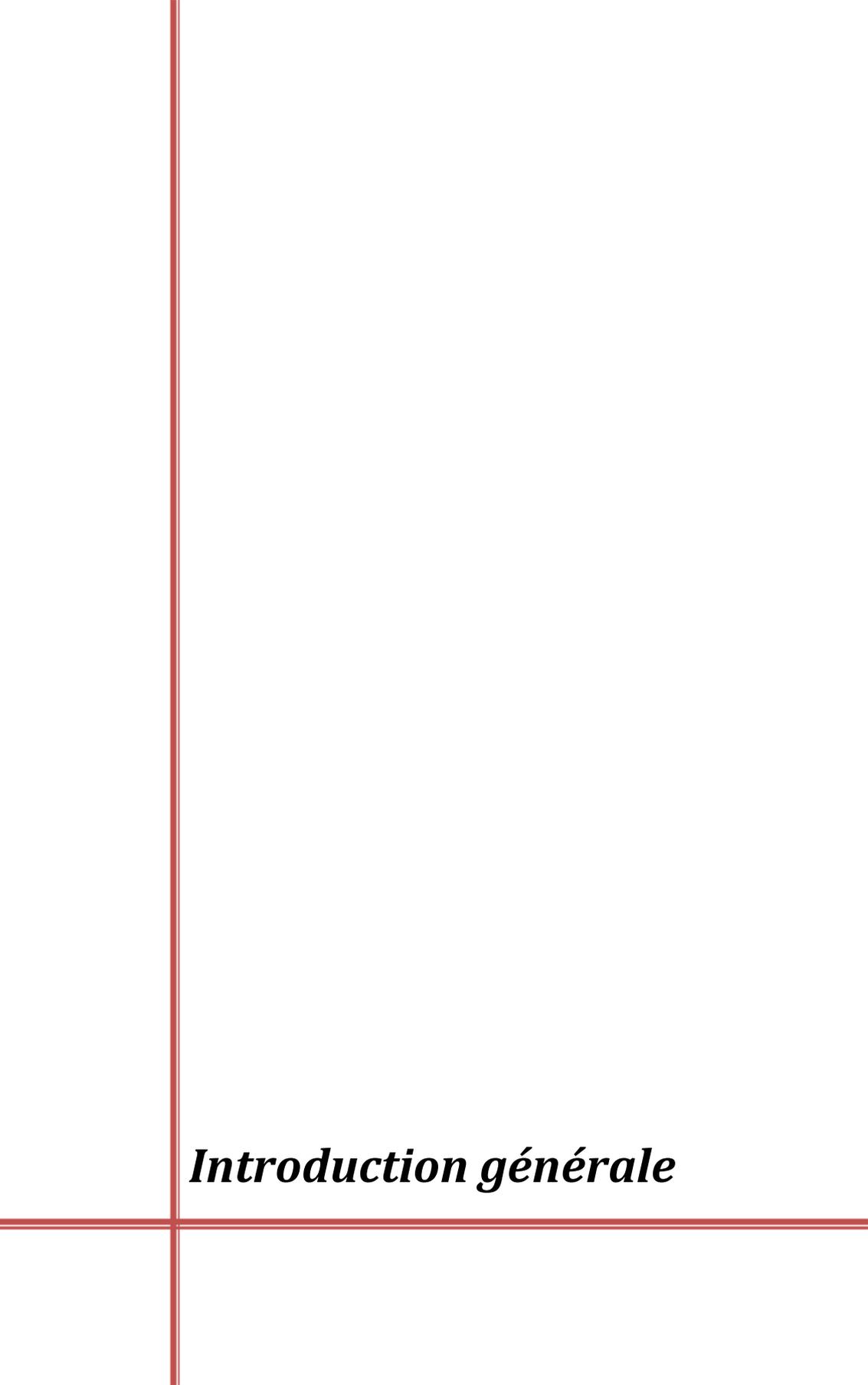
Microorganisms are the major source of the production of glycoside hydrolases (GH) of biotechnological interest. In this sense, a strain of thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* Cpt 29 (Accession number KC447297) was isolated from chicken compost (North-East Algeria) and was used for the production of amylopullanases. Thus, initially, the various investigations showed that the culture of the strain on solid and liquid medium secretes extracellular amylopullanases active on starch as the only carbon source. In a second step, the research work proceeded to the optimization of the production of amylopullanases on liquid medium using a mathematical model according to the one-factor-at-a-time approach and the Plackett-Burman design. In addition, the optimal level of each factor was determined using the Box-Behnken (BBD) design. Following these various works, the analysis showed that corn starch and tryptone are the best sources of carbon and nitrogen respectively, corn starch, tryptone and pH seem to be the most influential variables on the production of amylases. Thus, the optimization made it possible to increase the level of enzymatic activity to reach a value of 192.27 IU/ml. This mathematical model made it possible to increase the level of production by around 3.84 times, which is relatively considerable. After optimization, the enzyme is purified and its different biochemical characteristics are elucidated: molar mass, optimum pH, optimum temperature, thermostability, stability vis-à-vis pH, effect of metals, organic solvents and inhibitors. Thus, an optimal enzymatic activity was recorded with an alkaline pH of 8.0 and an optimal temperature of 70°C and significantly increased by Ca²⁺ and Mg²⁺ ions. Good stability was retained over a wide pH range and temperature and good tolerance to organic solvents. The study of the mode of attack of the enzyme by CCM on starch showed that the final products are maltose and other oligomers of larger sizes which gives the endo-amylase character. In addition, the immobilization of this enzyme on a membrane film of the PVDF-co-HFP-NiO type has improved its thermostability, which goes from 70 to 75°C, which is to the benefit of bio-industries. From a biotechnological application point of view, the obtained amylase showed a strong tolerance to commercial detergents tested and an excellent washing efficiency, which makes this enzyme a good candidate as an interesting new additive for detergent formulations.

Key words: *Actinomadura*, amylopullanases, starch, thermostability, detergent.

الملخص

لكائنات الدقيقة هي المصدر الرئيسي لإنتاج هيدروليسات الجليكوزيد (GH) ذات الأهمية التكنولوجية الحيوية. بهذا المعنى ، تم عزل السلالة من الفطريات الشعاعية المحبة للحرارة *Actinomadura keratinilytica* Cpt 29 (رقم المدخل KC447297) من سمد الدجاج (شمال شرق الجزائر) واستخدمت لإنتاج amylopullanas. وهكذا، في البداية، أظهرت التحقيقات المختلفة أن استنبات الإجهاد على الوسط الصلب والسائل يفرز amylopullanas خارج الخلية النشطة على النشا كمصدر الكربون الوحيد. في الخطوة الثانية، انتقل العمل البحثي إلى تحسين إنتاج إنزيمات amylopullanas في وسط سائل باستخدام نموذج رياضي وفقاً لنهج العامل الواحد وتصميم Plackett-Burman. بالإضافة إلى ذلك ، تم تحديد المستوى الأمثل لكل عامل باستخدام خطة (BBD) Box-Behnken. بعد هذه الدراسات المختلفة ، أظهر التحليل أن نشا الذرة والتريتون هما أفضل مصادر الكربون والنيتروجين. يبدو أن نشا الذرة والتريتون ودرجة الحموضة هي أكثر المتغيرات تأثيراً في إنتاج الأميلاز. وبالتالي ، وهكذا ، أتاح التحسين زيادة مستوى النشاط الأنزيمي ليصل إلى 192.27 وحدة دولية / مل ، وقد أتاح هذا النموذج الرياضي زيادة مستوى الإنتاج بحوالي 3.84 مرة ، وهو أمر كبير نسبياً. بعد التحسين ، يتم تنقية الإنزيم وتوضيح الخصائص البيوكيميائية المختلفة: الكتلة المولية ، درجة الحموضة المثلى ، درجة الحرارة المثلى ، الثبات الحراري ، الثبات ضد نصيحة الأس الهيدروجيني ، تأثير المعادن ، المذيبات العضوية والمثبطات. وهكذا ، تم تسجيل نشاط الإنزيم الأمثل مع درجة حموضة قلبية قدرها 8.0 و درجة حرارة 70 درجة مئوية وزادت بشكل ملحوظ بواسطة Ca^{2+} و Mg^{2+} . تم الحفاظ على الاستقرار الجيد على مدى واسع من الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة والتسامح مع المذيبات العضوية. أظهرت دراسة هجوم الإنزيم على النشا بواسطة CCM أن المنتجات النهائية هي المالتوز و oligomers أخرى ذات أحجام أكبر مما يعطي طابع إندو أميليز بالإضافة إلى ذلك ، أدى تثبيت α -amylase على غشاء من نوع PVDF-co-HFP-NiO إلى تحسين ثباته الحراري من 70 إلى 75 درجة مئوية وهو ما يعود بالفائدة على الصناعات الحيوية. من وجهة نظر تطبيق التكنولوجيا الحيوية ، أظهر الأميليز الذي تم الحصول عليه تحملاً قوياً للمنظفات التجارية المختبرة وكفاءة غسيل ممتازة ، مما يجعل هذا الإنزيم مرشحاً جيداً كمضاف جديد مثير للاهتمام لتراكيبات المنظفات.

الكلمات المفتاحية : أكتينومادورا ، أميليز ، قابل للحرارة ، تنقية ، نشا ، بولولان.



Introduction générale

Introduction

Les enzymes sont des biocatalyseurs produits par les cellules vivantes dont la fonction est de favoriser des réactions biochimiques spécifiques, liées aux processus métaboliques des cellules. En raison de leurs propriétés biochimiques uniques, la demande en enzymes industrielles, soutenue par le besoin croissant en solutions durables, ne cesse de croître (**Brahmachari, 2016**). Les principales enzymes utilisées sur le marché mondial sont les hydrolases et qui sont : les amylases, les lipases, les protéases, les cellulases et les glucanases (**Gürkök, 2019**). Parmi ces hydrolases, Les amylases occupent une part importante dans le marché mondial des enzymes avec plus de 30% (**Pinjari et Kotari, 2018**). Un marché qui a généré en 2016 un chiffre d'affaire de plus de 5 milliards de Dollars et est prévu pour atteindre les 11 milliards en 2022 (**Grand View Research, 2016; Markets et Markets, 2016**). Ainsi, les enzymes amylolytiques sont des glycosides hydrolases (GH) qui regroupent: les α -amylases (EC.3.2.1.1) hydrolysant la liaison glycosidique α (1,4) de l'amidon. Ces amylases se partagent en endo-amylases (attaque au hasard à l'intérieur des chaînes de maltose) et les exo-enzymes qui attaquent à partir d'une extrémité de la chaîne du maltose. Une autre amylase de type β (EC.3.2.1.2) qui attaque la chaîne α (1,4) à partir de l'extrémité non réductrice (**Lemo et al., 2019**). Une autre forme d'amylase (EC.3.2.1.3) appelée enzyme débranchantes et qui agit sur la liaison osidique α (1,6). Ces enzymes sont appelées les pullulanases et se divisent en pullulanases de type I (EC.3.2.1.41) et pullulanases de type II (EC.32.1.68) agissant individuellement ou en synergie (**Akassou, 2018**).

Les amylases peuvent provenir de plusieurs sources, y compris les plantes, les animaux et les micro-organismes. Ainsi, du point vue biotechnologie, ces derniers restent la source majeure dans la production des amylases dont nous citons quelques souches productrices d'amylases: c'est le cas des champignons tels que le genre *Penicillium* et *Aspergillus* (**Gopinath et al., 2017**), des bactéries et dont le plus étudié est le genre *Bacillus* (**Duan et al., 2019; Abd-Elaziz et al., 2020**), *Clostridium*, *Pseudomonas* (**Martin et al., 2019**) et les actinobactéries mésophiles et thermophiles (**Oussadi et Kitouni, 2015 ; Al-Dhabi et al., 2020**).

Dans le domaine de la biotechnologie industrielle, les microorganismes restent la source la plus importante du fait que leurs enzymes ont une meilleure stabilité vis-à-vis la température, le pH, les sels et les solvants organiques et qu'elles peuvent être obtenues à moindre coût (**Gupta et al., 2003**), en plus l'avantage majeur de la production des amylases

par les micro-organismes est leur disponibilité, stabilité, taux de productivité élevé et la possibilité d'améliorer niveau de production des enzymes par des techniques de génie génétiques ou génie biochimique (**Singh et al., 2014; Khusro et al., 2017**).

Un autre procédé permettant d'augmenter le niveau de production par méthode d'optimisation des conditions de culture. En effet, la croissance et le niveau de production d'amylases microbiennes est largement influencée par la composition du milieu et les paramètres de fermentation (**Sen et al., 2014; Elmansy et al., 2018**). Par conséquent, l'optimisation de la production des amylases utilise des méthodes statistiques avec comme objectif l'obtention de rendements plus économiques ce qui a suscité un grand intérêt pour les applications industrielles (**Cotârlet, 2013 ; Kizhakedathil et Chandrasekaran, 2018**). En effet, les plans d'expériences se révèlent actuellement d'excellentes méthodes d'optimisation des conditions de culture pour obtenir une production optimale et économique (**Gasmi et Kitouni, 2017**). Parmi ces plans expérimentaux nous citons, Plackett-Burman et Box-Behnken Designs qui ont été largement utilisées dans l'optimisation des processus biologiques, y compris la production d'amylases (**Oussadi et Kitouni, 2015 ; Raman et al., 2015; Keskin Gündoğdu et al., 2016 ;Allala et al., 2019**).

Egalement d'autres méthodes biochimiques sont utilisées pour stabiliser les enzymes et c'est le cas de l'immobilisation sur un support adéquat. Ainsi, nous citons que dans le cas des amylases, actuellement, les tendances s'orientent vers les agro-déchets qui sont très utilisés comme support naturel et donc très économiques (**Oluwadamilare et al., 2019 ; Sharma et al., 2021**).

Du point de vue application, les amylases sont couramment utilisées dans de nombreux secteurs industriels comme l'industrie de traitement d'amidon (11%) (Liquéfaction, gélatinisation et saccharification), l'industrie alimentaire (8%) (la clarification des jus de fruits et la production de sucre), Industrie des détergents (37%), textile (12%) et l'industrie du papier (**Raveendran et al., 2018; Rigoldi et al., 2018**). Étant donné les conditions de transformation (température et pH élevées) utilisées par ces industries, elles sont de plus en plus exigeantes en matière de thermostabilité, de stabilité vis-à-vis des solvants organiques, de détergents et de pH alcalin. En conséquence, cela explique l'orientation de plusieurs projets de recherche vers de nouvelles souches thermophiles ou extrêmophiles productrices d'amylases ayant des avantages par rapport aux souches mésophiles (**Gopinath et al., 2017; Drejer et al., 2018**). Parallèlement les travaux de recherche s'orientent de plus en plus aussi

vers une autre source de production d'enzymes et c'est le cas des actinobactéries et en l'occurrence les actinomycètes thermophiles (*Streptomyces*) qui semble être de bons candidats pour produire des enzymes thermostables ayant de nombreuses applications industrielles (Singh et al., 2014; Nithya et al., 2017). De même que d'autres travaux s'intéressent aux actinomycètes d'origine marine et qui semblent être une excellente source de production d'enzymes et d'antibiotiques (Subramani et al., 2019).

En fin nous signalons aussi qu'actuellement, les biotechnologues s'intéressent au mélange d'enzymes pour une meilleure utilisations, et c'est le cas du blanchiment respectueux de l'environnement des agro-déchets avec un cocktail d'enzymes xylano-cellulopectinolytiques alcalino-thermotoérantes (Sharma et al., 2021).

Dans ce contexte global et vu la taille du marché global mondial des enzymes et ses prévisions (cité déjà); nous nous sommes intéressés à la production d'amylopullulanases chez une souche d'actinomycète autochtone thermophile isolée du compost de poulet qui est connu pour abriter des microorganismes thermophiles. Ainsi, au niveau de notre laboratoire (LBMA) deux souches d'actinomycètes thermophiles appartenant au genre *Actinomadura* ont fait l'objet de travaux de recherche très intéressants. La première souche l'*Actinomadura keratinilytica* Cpt20 a permis de produire des xylanases thermostables (Taibi et al., 2012), des Pectinases thermostables (Saoudi et al., 2015) et des protéases de type kératinase (Kerouaz et al., 2021). La deuxième souche l'*Actinomadura keratinilytica* Cpt29 qui produit des xylanases (Haberra et al., 2013), de kératinases (Habbeche et al., 2013; Habbeche et al., 2014) et des lipases (Semache et al., 2021) et c'est cette souche qui a fait l'objet de notre travail de recherche.

Par ailleurs nous signalons qu'en Algérie et à notre connaissance, aucune étude n'a été effectuée sur la production d'amylases chez le genre *Actinomadura*, les travaux consultés utilisent plutôt d'autres microorganismes les champignons tel que la souche *Aspergillus niger* (Acourene et al., 2014), les bactéries telle que la souche *Tepidimonas fonticaldi* HB23 (Allala et al., 2019) et les levures telle que la souche *Clavispora lusitaniae* ABS7 (Dakhmouche Djekrif et al., 2021).

Ce travail de thèse de Doctorat en Biochimie permet donc d'une part de compléter le screening de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 stockée dans la base de données (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (KC447297 accession Number) ce qui diversifie les sources

Introduction

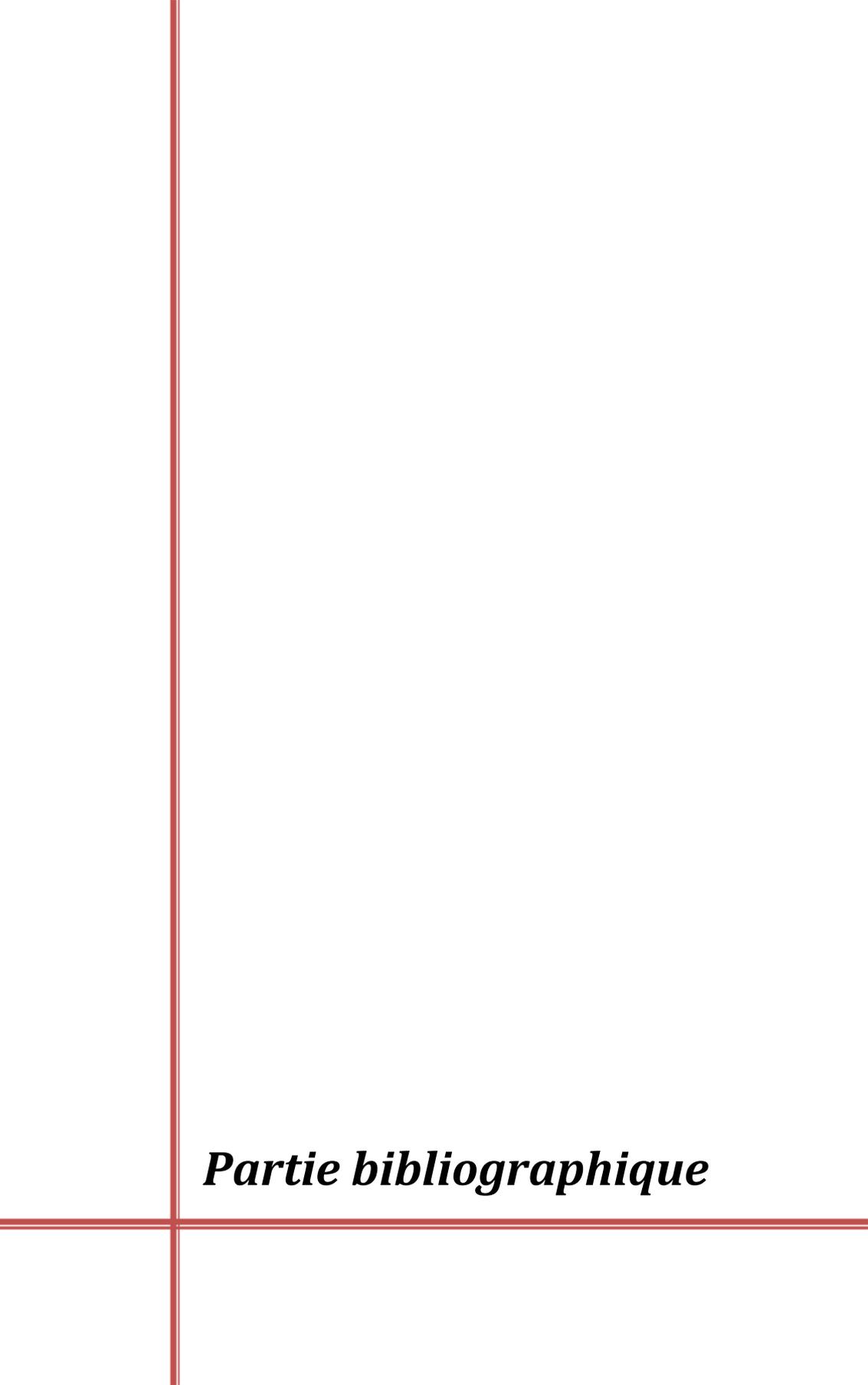
d'enzymes et d'autre part contribuer à agrandir le marché mondiale des glycosides hydrolases (GH) par ce modeste travail de recherche.

Pour se faire, nous avons donc adopté une démarche qui s'articule sur les points suivants :

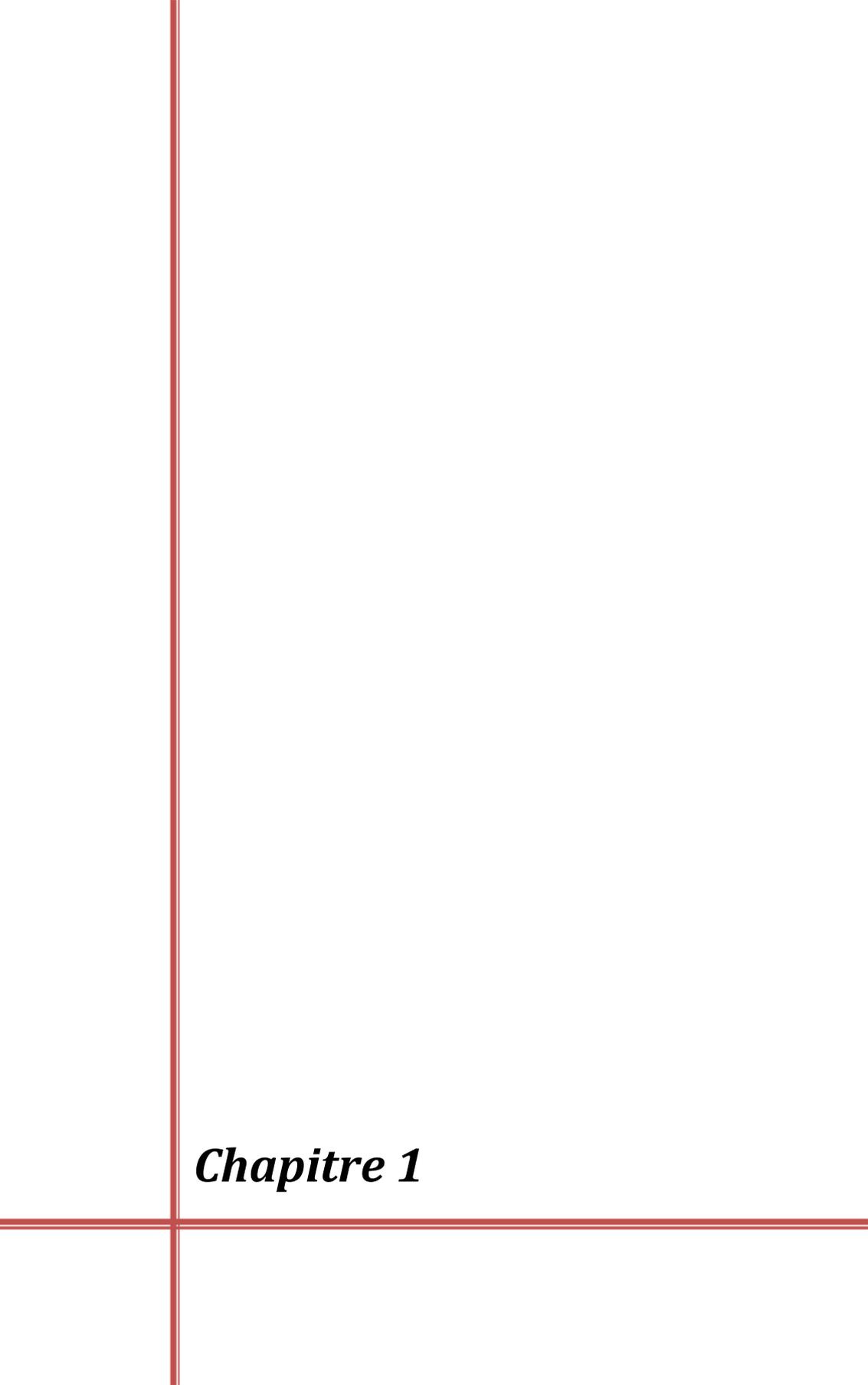
- Une première partie de synthèse bibliographique exhaustive qui cadre le sujet de travail.
- Une deuxième partie d'étude expérimentale intégrant deux chapitres.

Chapitre 1: Optimisation de la production des amylopullulanases chez la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 en milieu liquide par plan d'expériences (modèle statistique)

Chapitre 2: Extraction, purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application de l'amylase dans la détergence.



Partie bibliographique



Chapitre 1

Chapitre 1 : Les enzymes amylolytiques et leurs substrats

1. Les enzymes amylolytiques

Les enzymes amylolytiques sont un groupe étendu d'enzymes appartenant à la famille des glyco-hydrolases (GH). Elles catalysent les réactions hydrolytiques de l'amylase (amidon non ramifié), de l'amylopectine (amidon ramifié), du glycogène (amidon animal) et des polymères de glucose apparentés. Ces enzymes sont produites par une diversité d'organismes vivants : animaux, végétaux et microorganismes (bactéries, champignons microscopiques et levures). Du point de vue biotechnologique, les microorganismes restent la source majeure de production des amylases. Ainsi, ces micro-organismes produisent un large éventail d'amylases, intracellulaires et/ou extracellulaires (**Najafi et Kembhavi., 2005**). Bien que les amylases soient produites par plusieurs micro-organismes, celles produites par les champignons et les bactéries dominent les applications dans le secteur industriel (**Garske et al., 2017; Sindhu et al., 2017; Debnath et al., 2019**).

1.1. Classification

Ces enzymes sont classées par l'EC (enzymes classification) de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (UIBMB) sur la base du type de réactions catalysées, de la spécificité de substrat, et occasionnellement de leur (s) mécanisme(s) moléculaire(s). Selon cette classification ; les enzymes actives sur les sucres sont classées parmi les glycosidehydrolases (E.C.3.2.1.x) et les glycosyltransférases (E.C.2.4.x.y). Ainsi, plusieurs classifications des amylases sont données par plusieurs auteurs. Selon **Gupta et al., 2003** et **Michelin et al., 2010** les glycosides hydrolases (GH) sont classées en trois grands groupes selon leur mode d'action (**Figure 01**) :

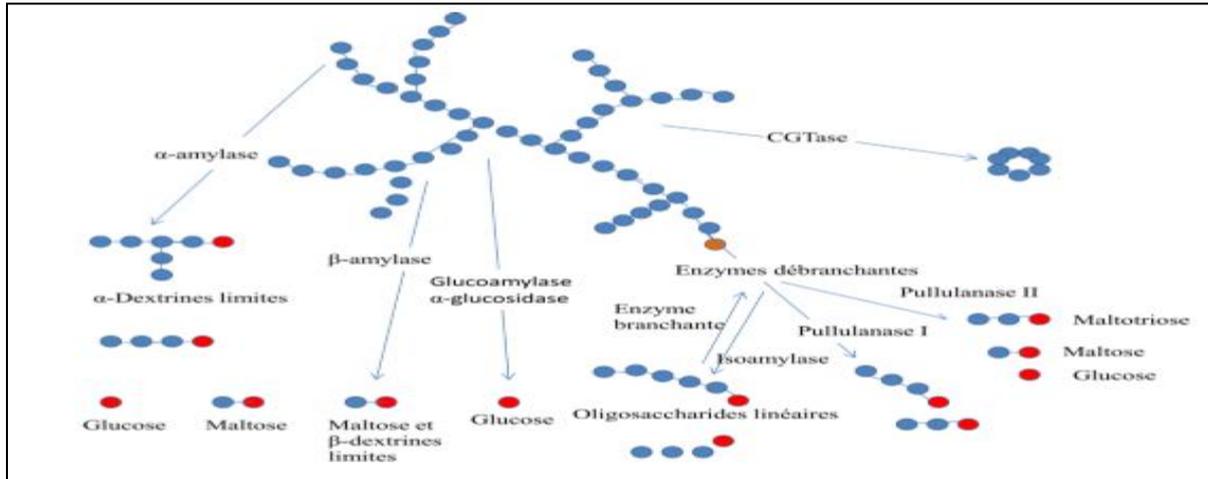


Figure 01: Classification des amylases selon le mode d'action (Bertoldo et Antaranikian, 2002).

Par ailleurs, le meilleur représentant de la famille des amylases est GH13 qui fait partie du clan GH-H avec GH70 et GH77 (Janeček et al., 2014). La famille GH13 est connue pour sa large gamme de spécificité enzymatique et catalytique (Figure 02).

- Les endo-amylases qui hydrolysent les liaisons α -1,4 de l'amylose et de l'amylopectine (les deux constituants de l'amidon) au hasard libérant ainsi des oligosaccharides et des dextrines. Dans ce groupe, nous retrouvons principalement l' α -amylase (EC 3.2.1.1).
- Les exo-amylases, elles regroupent la β -amylase (EC 3.2.1.2), l' α -glucosidase (EC 3.2.1.20) et la glucoamylase ou l'amyloglucosidase (EC 3.2.1.3). Leur action libère des oses de faibles poids moléculaires comme le glucose, le maltose et les oligosaccharides.
- Les enzymes débranchantes, elles, hydrolysent les liaisons α -1,6 de l'amylopectine. La pullulanase (EC 3.2.1.41) et l'isoamylase (EC 3.2.1.68) appartiennent à ce groupe. L'action synergique trouvée dans les complexes amylolytiques est bénéfique pour l'hydrolyse totale de l'amidon, du pullulane et des polysaccharides ramifiés.

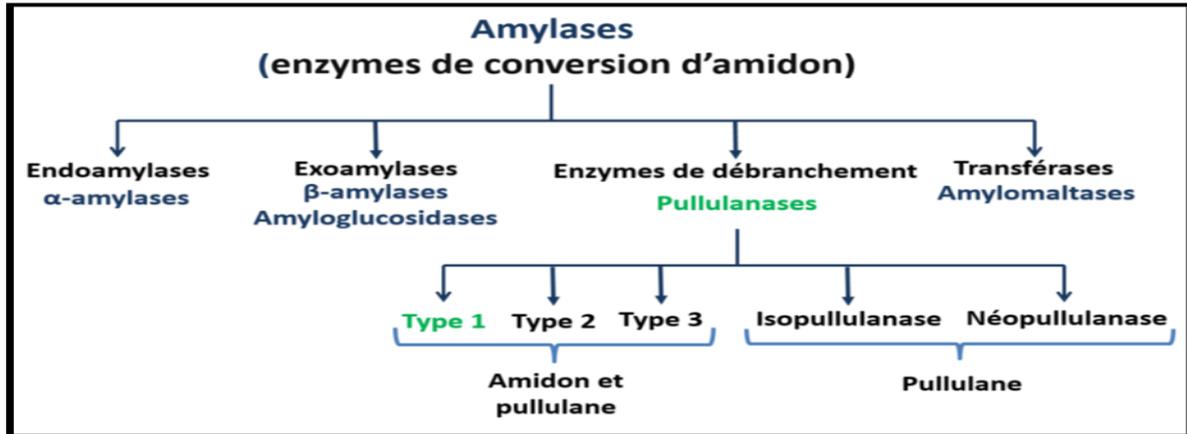


Figure 02 : Classification des amylases (Akassou, 2018).

Le schéma présenté par la **figure 02** fait sortir plusieurs branches d'enzymes et qui sont : les α -amylases, les β -amylases et les pullulanases de type I et II qui seront développés ultérieurement selon cette suite.

1.2. Les α -amylases

Les α -amylases (EC3.2.1.1) sont classées dans la famille GH-13 des glycosides hydrolases. Elles hydrolysent les liaisons glycosidiques α -(1,4) des polysaccharides (amylose, amylopectine, amidon et glycogène), avec la rétention de la configuration alpha-anomérique dans les produits obtenus. Ces enzymes hydrolysent de manière aléatoire à partir de l'extrémité réductrice, tout en contournant le point de ramification en libérant le glucose, le maltose et surtout les α -dextrines limites comme produits (Antranikian, 1992 ; Gupta et al., 2003 ; Sivaramakrishnan et al., 2006).

1.2.1. Source d' α -amylases

Les α -amylases sont des enzymes ubiquitaires produites par les plantes, les animaux et les microorganismes, où elles jouent un rôle dominant dans le métabolisme des glucides (Varel et al., 1994).

- Origine animale : Les amylases animales sont généralement extraites de la salive humaine et du pancréas des mammifères tels que les porcs et les veaux (Bertheau et al., 1985 ; Chatterton et al., 1996).

- Origine végétale : Les α -amylases sont généralement obtenues par extraction à partir des céréales. Elles sont souvent formées au cours de la germination des grains, qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (**Brawn et Kelly, 1993**).
- Origine microbienne : Cette origine est la plus utilisée dans le domaine de la biotechnologie, ainsi nous distinguons deux types de l' α -amylase :
 - les α -amylases bactériennes : parmi les bactéries productrices d'amylase nous citons les bactéries du genre *Streptomyces* comme : *Streptomyces* SLBA-08, *Streptomyces avermitilis* et *Streptomyces rochei* BTSS 1001 (**Santos et al., 2012; Hwang et al., 2013 ; Acharyabhatta et al., 2013**) et du genre *Bacillus* qui est le plus étudié comme : *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* (**Farooq et al., 2021**).
 - les α -amylases fongiques : parmi les champignons producteurs nous citons *Aspergillus oryzae*, *Penicillium brunneum*, *Thermomyces lanuginosus*, *Cryptococcus flavus* et *Mucor* sp. (**Farooq et al., 2021**). Les amylases fongiques et bactériennes sont principalement utilisées pour des applications industrielles. Cela en raison de leur rentabilité, du temps et de l'espace requis pour la production et de la facilité d'optimisation et de modification du procédé (**Ellaiah et al., 2002**). Quelques exemples de travaux de recherches sur des champignons et des bactéries productrices d'amylase sont représentés sur le **Tableau 01**.

Tableau 01: Diversité des micro-organismes amylolytiques et propriétés biochimiques de leurs amylases.

Microorganisme	pH opt.	Mr (kDa)	T° opt. (°C)	Références
Champignons				
<i>Aspergillus niger</i>	5-6	60	-	Angelia et al., 2019
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-	Dar et al., 2015
<i>Aspergillus niger</i> WLB42	7	50	45	Wang et al., 2016
Bactéries				
<i>Nocardiosis aegyptia</i>	-	-	-	Abou-Elela et al., 2009
<i>Streptomyces sp.</i> Al-Dhabi-46	8	44	40	Al-Dhabi et al., 2020
<i>Streptomyces sp.</i> SLBA-08	7	-	50	Santos et al., 2012
<i>Tepidimonas fonticaldi</i> HB23	8	48	80	Allala et al., 2019
<i>Streptomyces badius</i> DB-1	6	57	50	Shivlata et Satyanarayana, 2017
<i>Bacillus licheniformis</i> TSI-14	7	31	70	Deb et al., 2013
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> P-001	6.5	-	60	Shukla et Singh, 2015

1.2.2. Mécanisme d'action

L'activité catalytique de l'enzyme implique la participation des trois acides aminés du site actif : acide aspartique : Asp193 (nucléophile catalytique), acide glutamique : Glu 219 (donneur catalytique de l'hydrogène) et acide aspartique : Asp294 (l'aide de catalyse). En effet, la réaction catalytique est réalisée en trois étapes (**Figure 03**) :

- Protonation de l'oxygène glucosidique par le donneur de proton Glu 219 suivi d'une attaque nucléophile sur C1 du résidu du sucre en position 1 par Asp193 et l'élimination de l'extrémité réductrice du substrat. Le résidu Asp 294 aide à lier étroitement le substrat au site catalytique.
- Activation d'une molécule d'eau, varie semblablement par le maintien du Glu 219 déprotonné.

- Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile d'Asp193 et le C1 de résidu du sucre en position 1 (Sharma et Satyanarayana., 2013).

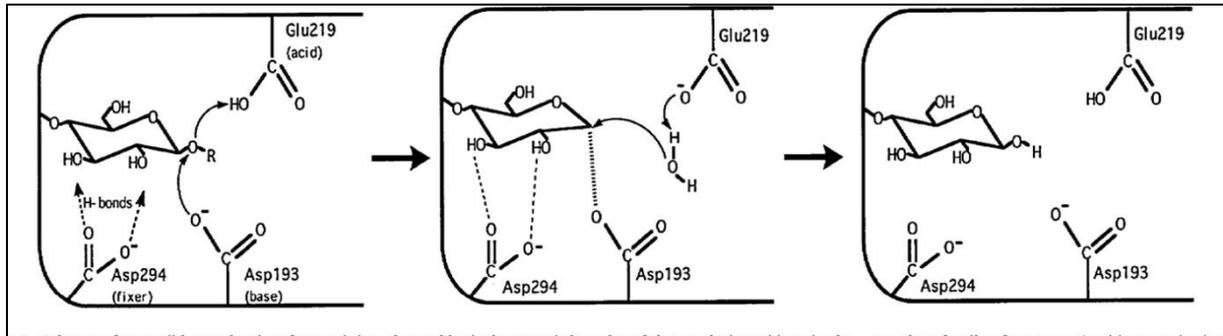


Figure 03: Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (Sharma et Satyanarayana, 2013).

1.2.3. Structure

Les α -amylases sont des enzymes multi modulaires. Elles sont caractérisées par un cœur structural conservé, composé principalement de trois domaines A, B et C (Ramasubbu et al., 1996) (Figure 04).

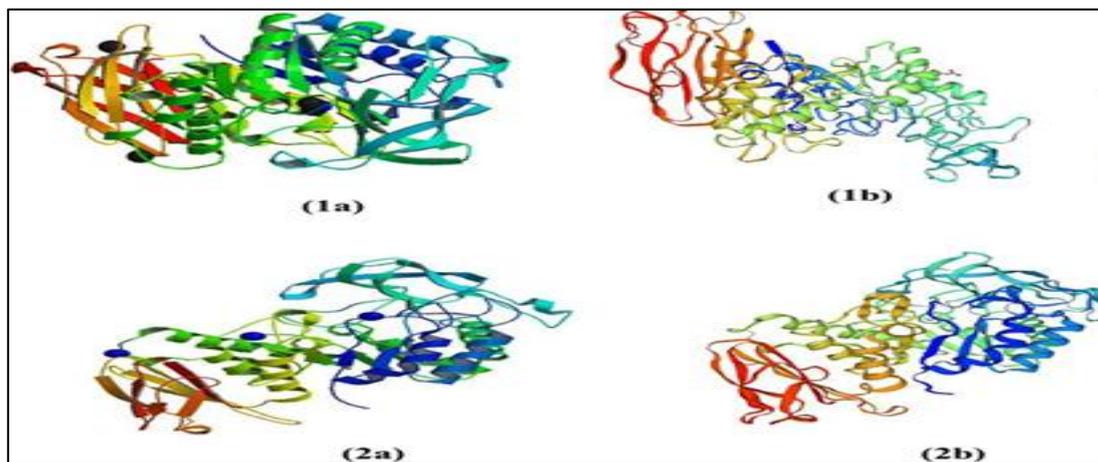


Figure 04: 1a, 1b Structure cristalline d' α -amylase de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* PDB ID 3BH4, composée de 483 acides aminés (Alikhajeh et al., 2010). 2a, 2b Structure cristalline de *Bacillus* sp. Indépendant du calcium (Ca^{2+}). α -amylase KM-K38 PDB ID 1UD4 (Nonaka et al., 2003). Le domaine A de couleur rouge, le domaine B de couleur bleue et le domaine C de couleur verte.

Le domaine A est le plus long et renferme le site actif et le site de fixation du substrat. Il a la forme d'un cylindre appelé cylindre TIM (**Banner et al., 1975 ; Mobini-Dehkoedi et Javan, 2012**) et contient les acides aminés Glu et Asp de la catalyse (**Fujimoto et al., 1998**). Ces deux acides aminés jouent aussi un rôle important dans la thermo résistance (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997**).

Le domaine B a une structure irrégulière riche en feuilletts β (**Jespersen et al., 1993**). Il est impliqué dans la liaison des ions Ca^{2+} qui jouent un rôle structural et participent à la stabilité de l'enzyme (**Boel et al., 1990, Mobini-Dehkoedi et Javan, 2012, Elleuche et Antranikian, 2013**). Le calcium est également indispensable pour préserver l'enzyme de l'attaque des protéases (**Souza et Magalhães, 2010**).

Le domaine C, le coté C-terminal a une structure dite en sandwich de feuilletts β (**Qian et al., 1993 ; Brayer et al., 1995**) qui participe au repliement post-traductionnel de l'amylase pancréatique de rat, garantissant ainsi l'activité et la sécrétion de cette enzyme (**Doyon et al., 2002**).

1.2.4. Caractéristiques biochimiques de l' α -amylase

- **Masse molaire**

La masse molaire des α -amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Les masses moléculaires des α -amylases microbiennes sont généralement situées entre 40 et 70 kDa (**Gupta et al., 2003**), cependant, on a montré que l' α -amylase de la souche *Chloroflexus aurantiacus* a une Mr de 210 kDa et qui semble être la plus élevée (**Ratanakhanokchai et al., 1992**) alors que la souche *Bacillus caldolyticus* produit une α -amylase avec une Mr de l'ordre de 10 kDa (**Gupta et al., 2003**).

- **pH optimum**

Les α -amylases d'origine fongique sont généralement actives à une gamme de pH acide allant de 4 à 5 alors que celles produites par les bactéries ont un pH allant de 6 à 8.5. Ces enzymes d'origine bactérienne et fongique sont également stables entre les pH 4 et 9 (**Schomburg et Salzmann, 1991**). En conséquence, cette propriété leur confère une bonne utilisation dans le domaine biotechnologique.

- **Température optimale**

La température optimale d'activité varie avec l'espèce et l'origine de l'enzyme. Elle est souvent supérieure à celle de la croissance de la bactérie productrice de l'enzyme. La température optimale des α -amylases bactériennes varie entre 50 à 95°C (**Schomburg et Salzmann, 1991**).

- **Effet des ions métalliques sur l'activité de α -amylase**

Les α -amylases sont des métalloprotéines fortement liées à la présence des ions métalliques de Ca^{2+} , qui intervient comme activateur allostérique (**Egas et al., 1998**).

Le calcium est responsable dans le maintien de la conformation optimale de l'enzyme et leur stabilité vis-à-vis de la dénaturation thermique et leur dénaturation par protéolyse (**Savcheko et al., 2002 ; Peixoto-Nogueira et al., 2008 ; Nigam et al., 1995 ; Mc Tighe et al., 1995**). L'activité enzymatique de l' α -amylase reste non-modifiée en présence des ions K^+ , Na^+ , NH_4 , mais elle est fortement inhibée par l'éthylène diamine tétra acétate (EDTA) et les métaux lourds (**Talamond et al., 2002**).

1.2.5. Substrats préférentiels

Il existe plusieurs types de substrats organiques (amidon, amylopectine, agro-déchets et autres) accessibles pour la production d' α -amylases. Cependant, l'amidon est considéré comme le meilleur inducteur de la production de l' α -amylase par les bactéries (**Paul et al., 2021**).

1.2.5.1. L'amidon : structure, origine, propriétés physiques et fonctionnelles

L'amidon, aussi appelé "fleur de farine " est une macromolécule glucidique, la plus répandue chez les végétaux qui l'utilisent pour stocker de l'énergie dans les organes de réserves. L'amidon est synthétisé à partir du D-glucose, les unités glucoses sont reliées entre elles par des liaisons α (1-4) et α (1-6) (**Figure 05**). Il se forme un polysaccharide de formule chimique brute $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ (**Laouini, 2011**). L'amidon est constitué majoritairement d'une fraction glucidique (98 à 99%) et d'une fraction non glucidique mineure (1 à 2%). Cette dernière, malgré sa présence en faible quantité, ne doit pas être négligée, car elle modifie les propriétés fonctionnelles, en particulier la présence des lipides (**Eliasson, 1983; Melvin, 1979**).

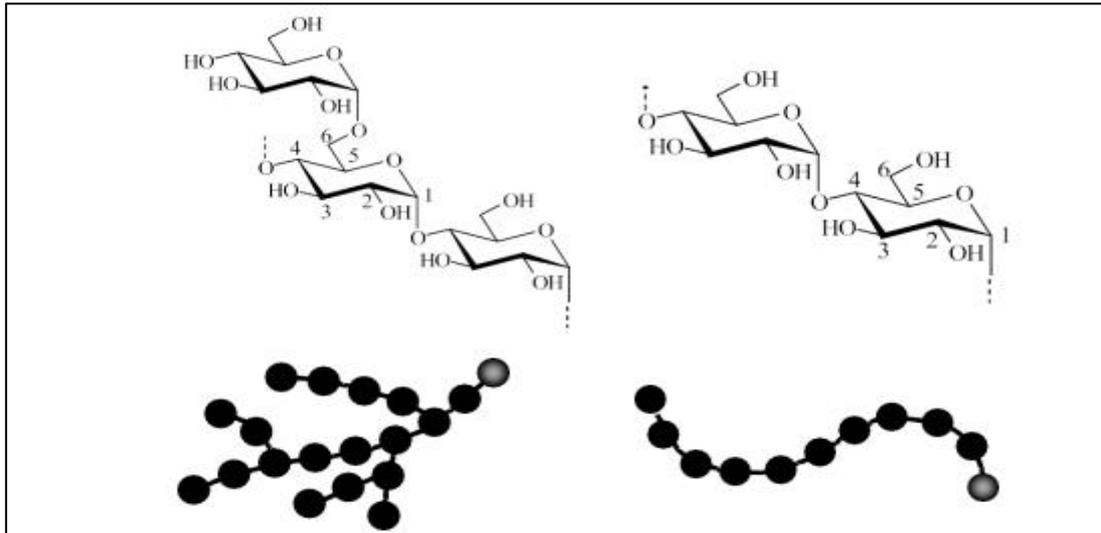


Figure 05 : Structure de l'amidon (Zou et al., 2020).

L'amidon est composé de deux polymères de structure primaire différente: l'amylose, molécule essentiellement linéaire et l'amylopectine, molécule ramifiée (Pigman et al., 1948). Selon l'origine botanique, les teneurs en amylose et en amylopectine varient respectivement de 20 à 30% et de 70 à 80% pour les amidons standards. Cependant, certains substrats d'amidon peuvent contenir moins de 1% d'amylose (maïs cireux ou waxy) ou entre 45 à 80% d'amylose (Zobel, 1984).

➤ L'amylose

L'amylose est caractérisée par une macromolécule de structure linéaire constituée d'unités α -D-glucose, liées par des liaisons de type α -(1-4) (Figure 06). L'amylose se compose de plusieurs chaînes présentant des degrés de polymérisation variables, en fonction de l'origine botanique, entre 500 et 6000 unités glucose. Du fait de son caractère essentiellement linéaire et de la présence de liaisons de type α -(1-4), l'amylose est susceptible de former des complexes d'inclusion avec de nombreuses molécules organiques ou minérales, comme l'iode, les acides gras libres, les lipides mono-acylés et certaines molécules aromatiques. Dans ces complexes, l'amylose a une conformation hélicoïdale (6 unités glucose/tour), dans laquelle tous les groupements hydrophiles de la chaîne sont tournés vers l'extérieur et les groupements hydrophobes vers l'intérieur (Buléon et al., 1990).

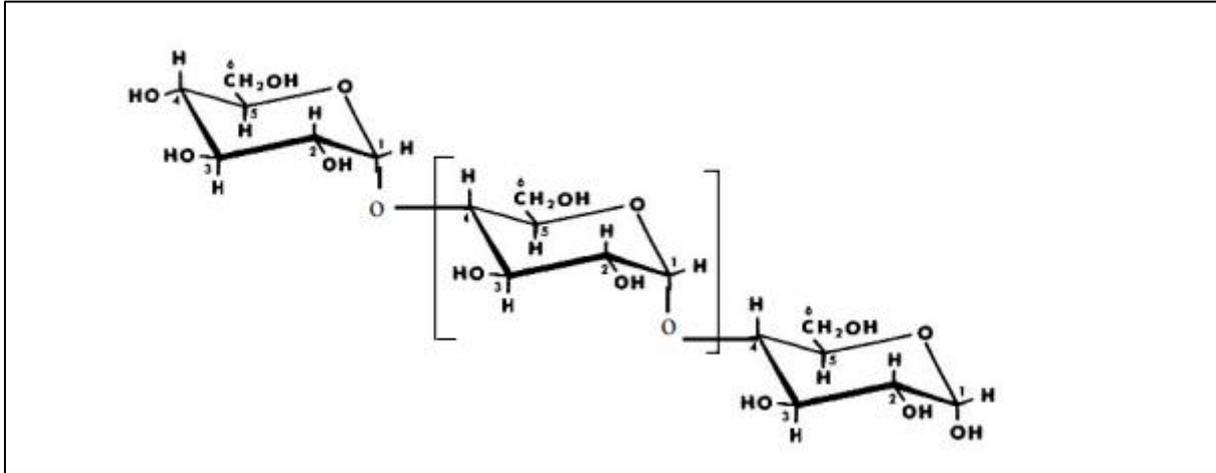


Figure 06 : Structure chimique de l'amylose (Buléon, 2001).

➤ L'amylopectine

Contrairement à la longue chaîne linéaire d'amylose, l'amylopectine est une macromolécule de structure ramifi e (Figure 07). L'amylopectine est form e par la polymérisation d'un seul monomère D-glucose, lié principalement par des liaisons α -(1-4) et quelques liaisons α -(1-6)   l'origine des ramifications, ces dernières représentent environ 5   6% du nombre total de liaisons. La masse moléculaire moyenne de l'amylopectine est assez  lev e, les valeurs les plus souvent cit es dans la littérature se situent entre 107 et 108 g/mole) (Whistler et Daniel, 1984).

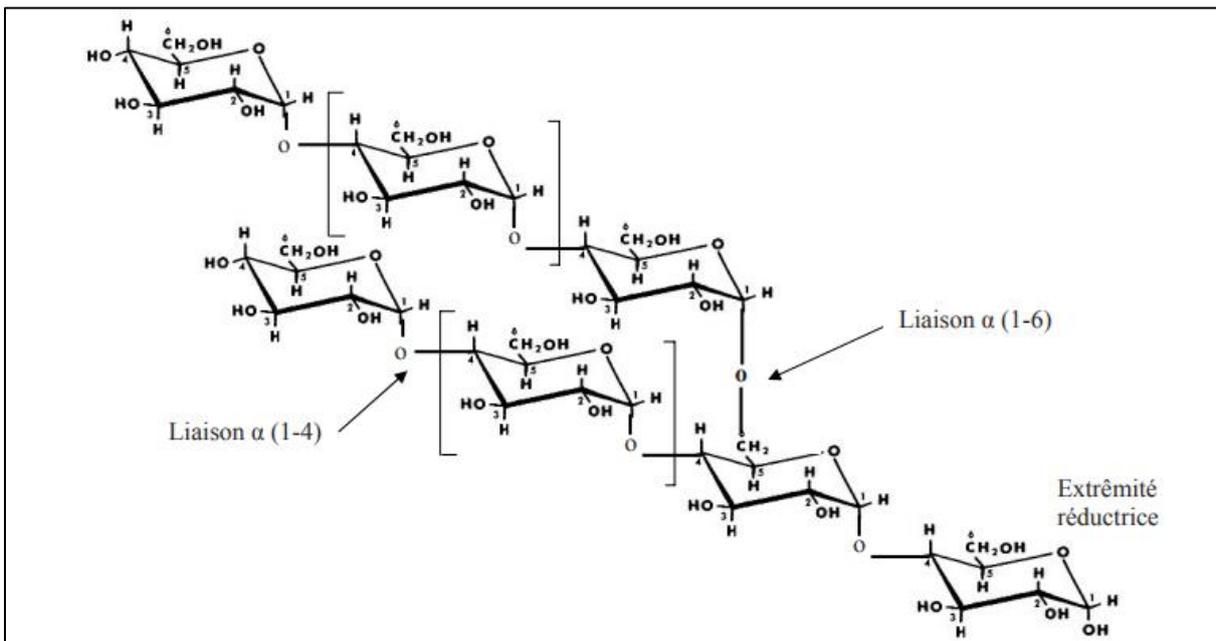


Figure 07 : Structure chimique d'amylopectine (Buléon, 2001).

➤ **Propriétés physiques**

L'amidon comme tout produit, possède des propriétés physiques qui lui sont propres.

-Influence de la température : l'amidon est insoluble dans l'eau. Il forme, en revanche à chaud (70°C) une solution colloïdale qui épaisse en donnant un gel communément appelé empois d'amidon avec une température de gélification qui commence à partir de 50°C (**Regiant et al., 1998**).

-Effet stabilisant: l'épaississement ayant lieu à une température inférieure à celle de la coagulation du jaune d'œuf, les crèmes aux œufs contenant de l'amidon peuvent être portées à ébullition. Les amidons sont influencés par trois types d'action : thermique, chimique et enzymatique. L'action thermique change la couleur et le goût de l'amidon par dextrinisation. L'actions chimique et enzymatique entraînent une hydrolyse partielle de l'amidon qui conduit à la formation de dextrans (**Regiant et al., 1998**).

➤ **Propriétés fonctionnelles**

Les propriétés fonctionnelles des amidons sont très connues et exploitées dans les industries alimentaires. En effet, 60% de la production mondiale en amidon est utilisée en alimentation humaine et 40% dans le domaine pharmaceutique et les utilisations non alimentaires (**Regiant et al., 1998**). Leurs utilisations comme aliments énergétiques, les amidons du maïs sont utilisés comme épaississants, gélifiants, stabilisants, liants et agents de rétention d'eau (**Copeland et al., 2009**).

L'amidon est utilisé industriellement sous plusieurs formes. Il peut être utilisé à l'état naturel, sous forme de poudre, en film, cuit en milieu aqueux et chimiquement modifié ou non. Cependant, ce dernier est largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire dans la production des boissons, confiseries et boulangeries. L'industrie chimique utilise des procédés de fermentation pour la production de bioéthanol, les traitements de surface, la formulation de colles, l'encapsulation de produits pharmaceutiques, les cosmétiques et la papeterie (**Boursier, 2005**).

1.2.5.2. Les agro-déchets

Au cours de ces dernières décennies, il a été remarqué qu'une tendance récente des chercheurs à utiliser des substrats d'agro-déchets et cela pour minimiser le coût total de production d' α -amylase par rapport à l'utilisation de l'amidon. En effet, les agro-déchets sont suffisamment riches en amidon, moins chers, facilement disponibles et résolvent problème d'élimination des déchets solides. Ces substrats d'agro-déchets proviennent le plus souvent de la paille de riz, du son de riz, du riz déshuilé, des épis de maïs, des écorces de légumes et de fruits, de la bagasse de canne à sucre, de la fibre de coco, et du lactosérum (Paul et al., 2021). En conséquence, l'utilisation de ces agro-déchets représente une valorisation de la biomasse végétale et une valeur ajoutée dans le domaine de la biotechnologie blanche.

1.3. Les β -amylases

Les β -amylases sont des exo-amylases qui hydrolysent les liaisons oligosidiques de type α -(1,4) à partir de l'extrémité non-réductrice de la chaîne glucanique et libèrent du maltose (Figure 01). L'amylose est hydrolysé à 100% alors que l'amylopectine ne sera hydrolysé qu'à 55-60%. Etant incapable d'hydrolyser les liaisons α -(1,6), la β -amylase va agir sur l'amylopectine et s'arrêter à 3 ou 4 résidus glucosyl avant la ramification pour libérer des dextrans limités. Ce sont des enzymes qui inversent l'anométrie de la liaison selon un mécanisme en une seule étape. La β -amylase est active de manière optimale à gamme de pH de 4.0 à 5.5. Il est à signaler que les graines de certaines plantes, les fruits et la pomme de terre sont les principales sources de β -amylases (Devin, 2010 ; Farooq et al., 2021).

1.4. Les pullulanases

La pullulanase (EC 3.2.1.41) est une carbohydrase extracellulaire capable d'hydrolyser les liaisons α -1,4 ou α -1,6 contenues dans l'amidon, l'amylopectine, le pullulane et d'autres oligosaccharides apparentés (Hii et al., 2012b; Kar et al., 2012). Les pullulanases sont également appelées enzymes debranchantes. La pullulanase est également connue sous le nom de: dextrinase, amylopectin 6-glucanohydrolase, enzyme debranchante, alpha-dextrine endo-1,6-alpha-glucosidase, pullulane alpha-1,6- glucanohydrolase (Hii et al., 2012a).

Il existe cinq types de pullulanases et qui sont classées selon le substrat et les produits résultants et qui se présentent comme suite : pullulanases type I, amylopullulanases, néopullulanases, isopullulanases, et pullulane hydrolases type III (Hii et al., 2012b) (Figure 01).

➤ **Pullulanases type I**

Ce type de pullulanases catalyse l'hydrolyse de façon préférentielle d'oligo- et polysaccharides et de pullulane pour produire, respectivement, des α -1,4 oligomères linéaires et du maltotriose (**Bertoldo et al., 2004**). Son mode d'action est de type endo (**Domań-Pytka et Bardowski, 2004**). Plusieurs pullulanases de type I thermostables ont été caractérisées à partir d'*Anaerobranca gottschalkii*, *Bacillus acidopullulyticus*, *Bacillus flavocaldarius* (**Jasilionis et al., 2014**).

➤ **Pullulanases type II (amylopullulanases)**

Les amylopullulanases présentent un grand intérêt dans l'industrie de l'amidon, dû à leur capacité d'hydrolyser les deux types de liaisons présentes, α -1,6 et α -1,4, c'est-à-dire, elles possèdent une activité amylase et une activité pullulanase en même temps (**Domań-Pytka et Bardowski, 2004**). Elles permettent la production du maltotriose à partir du pullulane, et un mélange de produits composé majoritairement de glucose, maltose et maltotriose dans le cas des oligo- et poly-saccharides (**Hii et al., 2012b**). Les amylopullulanases thermostables sont des candidates potentielles pour le remplacement des α - et β -amylases pour l'hydrolyse de l'amidon en une seule étape (liquéfaction et saccharification en même temps) (**Nisha et Satyanarayana, 2013a**).

➤ **Autres types de pullulanases**

Il existe trois autres types de pullulanases mais qui ont été moins étudiées : les pullulanehydrolases type I (néopullulanases), les pullulane-hydrolases type II (isopullulanases), et les pullulane-hydrolases type III. Les néopullulanases et les isopullulanases n'ont pratiquement pas d'activité sur l'amidon, et elles peuvent exclusivement hydrolyser les liaisons α -1,4 du pullulane pour libérer respectivement le panose et l'isopanose (**Hii et al., 2012b**). Concernant les pullulane-hydrolases type III, elles hydrolysent les deux types de liaison glycosidique, α -1,4 et α -1,6, du pullulane pour donner un mélange composé majoritairement de panose, maltose et maltotriose, et dans le cas de l'amidon, les produits seront un mélange composé principalement de maltotriose et de maltose (**Niehaus et al., 2000**).

1.4.1. Propriétés biochimiques

➤ Masse moléculaire

Contrairement à la masse moléculaire de l' α -amylase, celle de la pullulanase est plus élevée et varie de 55 à 450 kDa selon les souches productrices : 90 à 450 kDa pour la pullulanase type II. L'amylopullulanase de *T. thalophilus* a une masse moléculaire de 79 à 210 kDa (**Odibo et Obi, 1988**).

➤ pH

La plupart des pullulanases ont des pH optimum acides ou neutres, mais certaines ont des pH optimum alcalin (**Dakhmouche-Djekrif, 2016**).

➤ Température

La température optimale de la pullulanase se situe entre 40°C et 50°C. Cependant, la température optimale des pullulanases thermoactives des archées hyperthermophiles est de 85°C pour les genres: *Pyrococcus Woesei* (**Rudiger et al., 1995**) et 105°C pour *Pyrococcus Furiosus* (**Brown et Kelly, 1993**).

➤ Effet des minéraux et certains oligoéléments

L'activité de la pullulanase est fortement inhibée par certains cations Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} à une concentration de 0,2 mM, par contre, les cations Ca^{2+} augmentent l'activité de la pullulanase (**Ling et al., 2009**).

1.4.2. Substrat préférentiel et mode d'action

Le pullulane est un polysaccharide hydrosoluble produit à partir d'amidon par le champignon de type levure *Aureobasidium pullulans* dans des conditions aérobies (**Marvdashti et al., 2018**). C'est un homopolysaccharide linéaire neutre dans laquelle les unités de glucose sont polymérisées en des unités répétitives maltotriose. Il a été établi que le pullulane est un glucane avec une structure linéaire relativement simple dans lequel les unités de maltotriose (trois unités de α -1,4-molécules de glucose liées) sont polymérisées de manière répétée par l'intermédiaire de liaisons α -1,6 sur les résidus terminaux de glucose (**Figure 08**) (**Hui, 1995 ; Chetouani, 2018**).

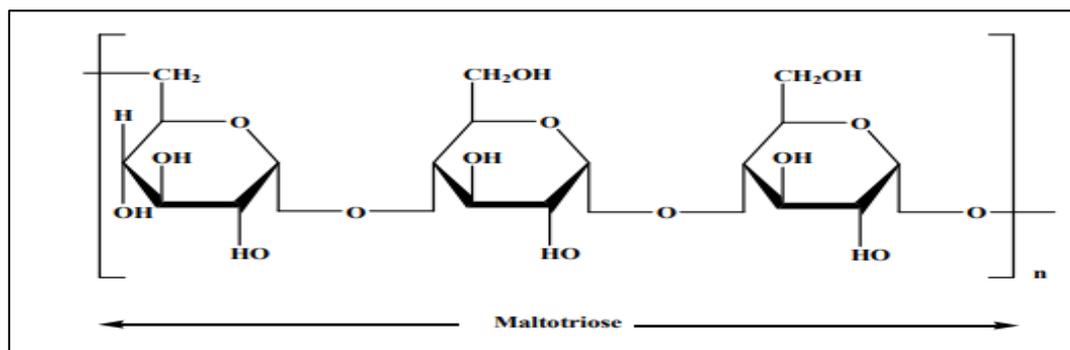


Figure 08: Structure chimique du pullulane (Hui, 1995 ; Chetouani, 2018).

Mode d'action : La pullulanase attaque le pullulane par l'un des deux modes ci-dessous:

-Un mode de type exo dans laquelle l'hydrolyse est limitée à la liaison glycosidique α -1, 6, la plus proche de l'extrémité non réductrice, avec la libération progressive du maltotriose. (Figure 02).

-Un mode de type endo où l'enzyme hydrolyse au hasard les liaisons glycosidiques (α -1, 6) avec la production mixte de l'hexa-, nona- et des oligosaccharides plus grands, en plus de maltotriose comme produit final (Figure 02) (Drummond et al., 1969).

1.4.3. Sources des pullulanases

Les pullulanases sont produites par les plantes, les animaux (Wei et al., 2015) et les microorganismes tels que les bactéries, les champignons et certaines levures (Nisha et Satyanarayana, 2013b). De nombreuses bactéries et archées mésophiles, thermophiles et hyperthermophiles produisent de la pullulanase et c'est le cas des espèces *B. acidopullulyticus*, *Klebsiellaplanticola*, *B. deramificans*, *B. cereus* FDTA-13 et *Geobacillus stearothermophilus* (Hii et al., 2012b). Par ailleurs, peu d'études sont consacrées aux pullulanases fongiques (Mizuno et al., 2008) et leuvuriennes (Moubasher et al., 2010).

1.5. Facteurs affectant la production des amylases

Il est important de mettre en exergue les différents facteurs (source de carbone, source d'azote, source de phosphore et les inducteurs) qui influencent qualitativement et quantitativement la production d'enzymes chez les microorganismes.

A défaut d'études sur les actinomycètes, nous présentons d'une manière générale les facteurs influençant la production d'enzymes chez les microorganismes. Ainsi, selon Lonsane et al

(1990), la composition du milieu de croissance, le pH du milieu, la concentration de phosphate, de l'âge inoculum, la température d'incubation, l'agitation, la source de carbone et source d'azote constituent des facteurs physiologiques majeurs.

➤ **Source de carbone**

La source de carbone constitue l'un des facteurs primordiaux exigés pour la croissance des bactéries, car il s'embble que l'amylase est une enzyme inductible, généralement induite en présence du substrat l'amidon ou de ses dérivés obtenus lors de l'hydrolyse (**Merkeberg et al., 1995**). Dans certains cas, la présence du glucose, du fructose et du lactose peuvent réprimés la synthèse de cette enzyme.

➤ **La source d'azote**

La physiologie de la synthèse des amylases chez les bactéries a motivée les chercheurs dans le domaine de la biotechnologie enzymatique. En conséquence des sources d'azote organiques et minérales ont été étudiées cependant les sources d'azotes organique sont préférées pour la production des amylases (**Mc Mahon et al., 1999**). C'est le cas de la source d'azote sous forme d'extrait de levure qui augmente dans la production d'une α -amylase à partir de souches de *Streptomyces* sp. et *Bacillus* sp. De même d'autres sources peuvent être utilisées tels que l'extrait de bœuf, le peptone pour une meilleure production des d'amylases chez quelques souches bactériennes (**Mc Mahon et al., 1999**) tel que la souche *Bacillus brevis* MTCC 7521 (**Ray et al., 2008**).

➤ **Source de phosphate**

Le phosphate joue un rôle régulateur important dans la synthèse des métabolites primaires et secondaires chez les micro-organismes et affecte considérablement la croissance de du microorganisme et la production de l' α -amylase. Des travaux de recherche ont ainsi montré que la souche de *B. amyloliquefaciens* où à de faibles niveaux de phosphate, que seulement la croissance est affectée alors que la production des amylases ne l'est pas. En revanche, d'autres travaux de recherche ont montré que des concentrations de phosphate élevées inhibent la production d'enzymes chez la souche *B. amyloliquefaciens* (**Hillier et al., 1997**).

➤ **Les inducteurs et les répresseurs**

Selon divers travaux de recherche, l'amidon est un bon inducteur pour la production des amylases. De même certaines petites molécules tels que: les maltodextrines qui induisent la production d'amylases chez l'espèce *Bacillus stearotherophilus*. Chez les microorganismes, il est également connu que la synthèse des amylases subit une répression catabolique par le glucose (**Larpent et Sanglier, 1992**).

1.6. Immobilisation des amylases

L'application industrielle des amylases est limitée et cela est due à plusieurs paramètres en l'occurrence courte durée de vie, sensibilité aux facteurs environnementaux, une mauvaise stabilité de stockage opérationnel et des coûts de production élevés qui entraînent des difficultés pour leur réutilisation et leur valorisation (**Luo et al., 2010 ; DiCosimo et al., 2013**). L'immobilisation est l'une des méthodes permettant de pallier à ces inconvénients (**DiCosimo et al., 2013**). Ainsi, l'immobilisation permet d'améliorer la stabilité de l'enzyme, paramètre très important à l'échelle industrielle. En effet, cette approche permet donc une meilleure stabilité du biocatalyseur, une séparation plus facile des substrats et des produits, et la récupération de l'enzyme afin qu'elle puisse être réutilisée (**Al-Najada et al., 2019**). Pour ce faire, divers supports organiques et inorganiques ont été utilisés nous citons la silice (**Saville et al., 2004**), le chitosan (**El-Ghaffar et Hashem, 2009**) et verre organique poreux (**Kurt, 2020**). Actuellement les biotechnologues utilisent également les agro-déchets comme support pour une meilleure valorisation (**Girelli et al., 2020**).

Différentes méthodes d'immobilisation sont utilisées ayant des avantages et des inconvénients, nous citons : l'adsorption, liaison de covalence, réticulation, encapsulation. En général, les conditions réactionnelles (température, nature du support, concentration du ligand, pH et temps de contact) de l'immobilisation sont optimisées pour une meilleure immobilisation de l'enzyme. Il est à noter que les différentes liaisons de la protéine avec le support peuvent, en effet, avoir un impact sur la conformation de la macromolécule et par conséquent sur le fonctionnement de l'enzyme et particulièrement sur son énanti-sélectivité (**Bouchagra, 2010**). Almulaiky et ses collaborateurs (**2018**) ont immobilisé une amylase sur des microfibres acryliques amidoximées activées par le chlorure cyanurique.

1.7. Aspect moléculaire de la production des amylases

L'ingénierie des enzymes y compris les amylases propose une stratégie pour améliorer d'une part la stabilité de l'enzyme vis à vis de la température, le pH, les sels et les solvants organiques et d'autre part augmenter le niveau d'activité de l'enzyme. Pour se faire divers techniques de génie génétique (mutagenèse et clonage) sont utilisées par les biotechnologues. En conséquence, les demandes accrues d'amylases ayant différentes propriétés physiologiques et biochimiques poussent les industriels à investir plus dans ce domaine.

Mutagenèse : l'ingénierie des enzymes est donc connue pour être une technique prometteuse pour atteindre ce but. Elle permet d'une part d'intégrer les propriétés recherchées et d'autre part d'avoir une hyperproduction (**Sivaramakrishnan et al., 2006**). Plusieurs approches ont été adoptées par les chercheurs comme la mutagenèse dirigée ou la mutagenèse aléatoire induite par les rayons UV ou mutagène chimique tel que l'éthyle sulfonate de méthane (EMS) (**Paul et al., 2020**).

➤ **Mutagenèse aléatoire**

Nous signalons quelques travaux recherche sur la technique de mutagenèse aléatoire sont appliquée sur l' α -amylase produite par la souche de *B. licheniformis* irradiée aux UV qui a conduit à une augmentation du niveau de production d'enzymes par rapport à celui produit par la souche sauvage. Par ailleurs, le niveau de production d'une α -amylase par le mutant *B. licheniformis* est augmenté de 1,4 fois après traitement par l'EMS par rapport à celui produit par la souche parentale. Egalement, la mutagenèse aléatoire par irradiation UV a augmenté la sécrétion d'enzymes intracellulaires (868 UI/ml) produite par *Bacillus tequilensis* par rapport au rendement de la souche parentale (418 UI/ml) (**Wang et al., 2020**).

➤ **Mutagenèse dirigée**

Aujourd'hui, la technique préférée de l'ingénierie des protéines pour améliorer la performance des enzymes est la mutagenèse dirigée. La mutagenèse dirigée joue un rôle important dans l'amélioration des aspects catalytiques et structurels d'une enzyme via l'ajout, la modification ou la suppression de résidus d'acides aminés spécifiques du site catalytique. **Wang et al. (2020)** ont travaillé sur l'amélioration de la thermostabilité et mode d'hydrolyse des amylases produites par la souche *Bacillus subtilis* CN7 en introduisant plusieurs mutations dans le domaine B invariant du tonneau de la triose-phosphate isomérase,

le tonneau TIM est un motif structurel présent dans un grand nombre de protéines et consistant typiquement en l'alternance de huit hélices α et huit feuillets β), une augmentation de 7,1°C a été constaté dans l'amylase modifiée par rapport à celle de l'amylase sauvage. De plus, Yang et ses collaborateurs (2013) ont amélioré l'efficacité catalytique, la stabilité des protéines et la tolérance au pH acide de l' α -amylase produite chez la souche *B. subtilis* en utilisant la mutagenèse dirigée. Ainsi, la substitution des quatre résidus Histidines (His 222, His 275, His293, His 310) du domaine catalytique par des résidus Asp ont permis d'améliorer les performances de l'enzyme (Paul et al., 2020).

Clonage: cette méthode à la fois ancienne et la fois moderne a permis d'améliorer considérablement le niveau d'activité des amylases produites par des souches sauvages (bactéries, champignons et levures). Ainsi, les travaux de Bahri et Ward (1990) ont permis d'isoler un gène d' α -amylase extracellulaire chez une souche d'actinomycète thermophile *Streptomyces thermoviolaceus* CUB74 et cloné chez *Escherichia coli* JM107 et *Streptomyces lividans* TK24. En conséquence, cela a pu d'une part amplifier le niveau activité amylosique et d'autre part faciliter la purification de l'amylase. D'autres travaux de recherche sur le clonage des gènes codant pour une α -amylase ont été effectués nous citons à titre d'exemple : Le clonage et l'expression des gènes codant pour des activités amylolytiques de la souche *Streptomyces sp.* 20r (Oussadi, 2018) et le clonage d'un gène d'amylase hautement thermostable de *Thermotoga petrophila* chez *Escherichia coli* (Zafar et al., 2016).

2. Applications des enzymes amylolytiques

Les amylases sont d'une grande importance en biotechnologie. Elles sont considérées comme les enzymes les plus polyvalentes avec des applications industrielles très diverses dans les secteurs de la détergence, de l'alimentaire, des bioénergies, de l'industrie du papier, des colles, ou encore la production de cyclodextrines pour l'industrie pharmaceutique (Marc et al., 2002). De plus, les enzyme thermophiles se distinguent par une résistance envers les agents dénaturants et aux solvants organiques, accélèrent la vitesse de réaction et sont pratiques pour la séparation pendant les processus de purification (Singh et al., 2019; Singh et Kumar, 2019 ; Thapa et al., 2019).

2.1.Liquéfaction de l'amidon et saccharification

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon en glucose a depuis longtemps remplacé la voie d'hydrolyse acide par l'acide chlorhydrique. Le processus enzymatique produit moins de composés secondaires et n'implique pas d'acide corrosif. Dans la majorité des cas le produit final obtenu par l'hydrolyse de l'amidon est un sirop de sucres dont la composition glucidique dépend de l'utilisation lui étant destinée (**Garske et al., 2017; Yoo et al., 2017a; Mohanan et Satyanarayana, 2019**). Les enzymes utilisées dans l'hydrolyse de l'amidon comprennent essentiellement l' α -amylase, la β -amylase, l'amyloglucosidase, la pullulanase et la glucose-isomérase. La composition finale du sirop dépend uniquement du type/nature des enzymes ou de la combinaison d'enzymes et de la qualité de la matière première utilisée pendant le processus de production de sirops de glucose, fructose ou maltose (**Yoo et al., 2017b; Mohanan et Satyanarayana, 2019; Okafor et al., 2019; Singh et al., 2019**).

2.2.Désencollage des textiles

Pendant le processus de tissage, les fils sont soumis à une contrainte mécanique considérable entraînant le cassage des fils. Pour remédier à cela, une couche de protection gélatineuse temporaire va être appliquée sur les fils, dont l'amidon, Il sera ensuite facilement éliminé par dégradation enzymatique à l'aide d'amylases (**Hendriksen et al., 1999**).

2.3.Industrie de la boulangerie

Une autre application majeure de ces enzymes est dans l'industrie de la boulangerie. Pour éviter le rassissement du pain et d'autres produits de boulangerie ainsi que pour améliorer sa texture et sa durée de conservation. La pâte est complétée avec divers additifs tel que les produits chimiques, et les émulsifiants (**Azizi et al., 2003**). Une autre alternative consiste à la supplémentation en α -amylases thermorésistantes qui améliore la granulation, le volume, la texture, la saveur et la durée de conservation du pain (**Amigo et al., 2016**).

2.4.La détergence

Les amylases sont les enzymes les plus utilisées dans la formulation des détergents enzymatiques après les protéases. Plus de 90% des détergents liquides en contiennent (**Gupta et al., 2003**). Dans les domaines des lessives et des détergents, ces enzymes sont utilisées pour

la dégradation des résidus ainsi que l'amélioration de la digestibilité (**Roy et Mukherjee, 2013**). La stabilité des amylases est l'un des critères les plus importants pour leur utilisation dans les détergents qui sont très agressifs du fait du pH, de la température et de l'environnement très oxydant.

2.5. Domaine médical et pharmaceutique

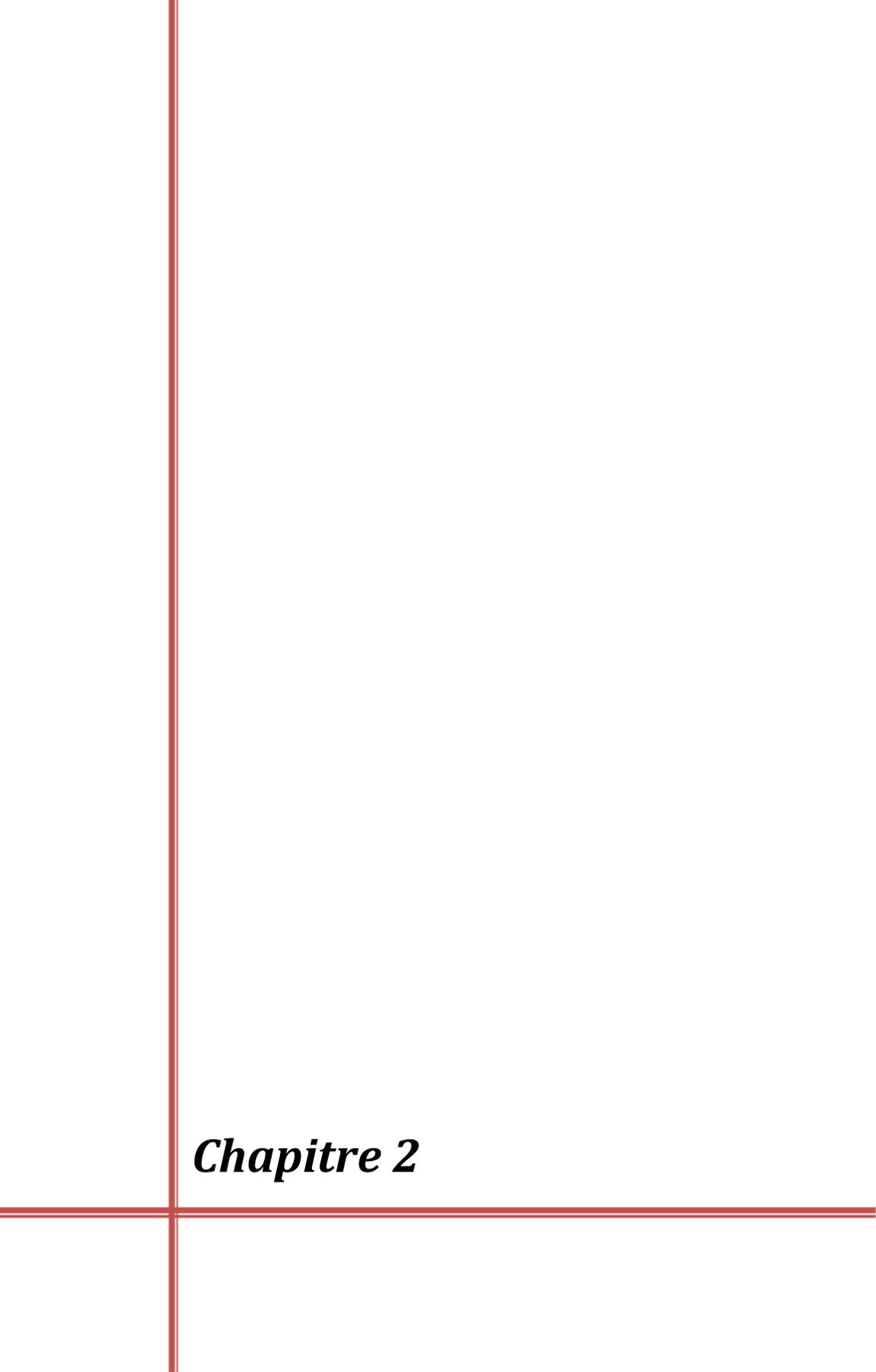
Dans le domaine pharmaceutique, les amylases sont utilisées comme agent anti-inflammatoire et aussi comme aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (**Pandey et al., 2000**).

2.6. Production du bioéthanol

La teneur totale des lentilles d'eau en amidon peut varier de 3 à 75% du poids sec en fonction des espèces des lentilles d'eau (**Landolt et Kandeler, 1987**). La biomasse de la lentille d'eau est hydrolysée par l'action de l'enzyme pullulanase et l'amyloglucosidase pour produire des sucres réducteurs (**Chen et al., 2007**). Ces sucres sont ensuite convertis en bioéthanol, le taux global de la conversion de l'amidon, par l'action de la pullulanase, est très élevé (**Prakash et al., 2012**).

2.7. La valorisation des agro-déchets

Les amylases sont également utilisées dans la dépollution et de la valorisation des déchets (**Chen et al., 2007; Hmidet et al., 2010**), en particulier les déchets alimentaires comme les restes de boulangerie, y compris le pain, la pâtisserie et d'autres matières féculentes comme les déchets de céréales (blé, maïs, riz, etc.) et les agro-déchets (oranges, paille, mars de raisins, grignons d'olives), le contenu en amidon de ces déchets est converti en sucres réducteurs (glucose, du maltose et un mélange de malto-oligosaccharides), ces précieux produits biotechnologique trouvent de nombreuses applications nutritionnelles, cosmétiques et pharmaceutiques (**El-Aty et Mostafa, 2015 ; Rashid., et al., 2018**).



Chapitre 2

Chapitre 2 : Les actinomycètes producteurs d'hydrolases et leur importance économique

1. Généralités

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif, aérobies, formant des spores, appartenant à l'ordre des Actinomycetales caractérisées par une croissance du mycélium aérien et de substrat avec un (GC%) élevé compris entre 60-70 % (Chaudhary *et al.*, 2013). Les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses formées par un réseau ramifié d'hyphes, se développant à la fois à la surface et à l'intérieur du substrat, pendant une semaine ils forment sur milieu solide des colonies souvent pigmentées en fin de croissance (vert, gris, rouge, rose...etc.). Elles ont une croissance lente par rapport aux autres bactéries, le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (Beckers et van der Hoeven, 1982). Les actinomycètes ont un cycle de développement complexe (Figure 09), il débute par la germination d'une spore, qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes qui se ramifie. Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium "secondaire" ou aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores, qui sont la forme de résistance et de dissémination (Kim *et al.*, 2004 ; Smaoui, 2010).

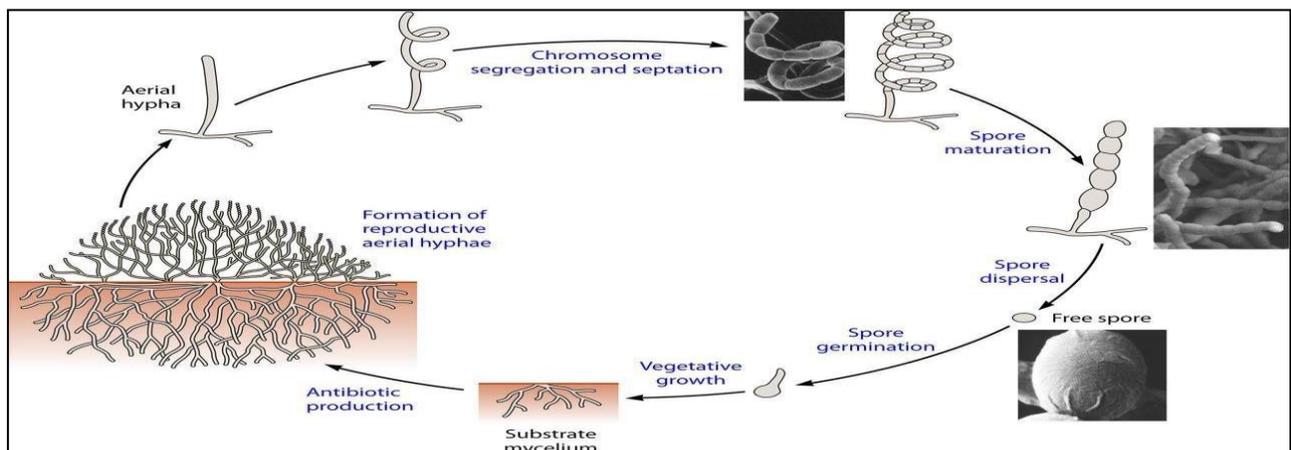


Figure 09: Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes (Barka *et al.*, 2016).

2. Ecologie et distribution dans la nature

Les actinobactéries sont largement distribuées dans la nature (**Tableau 02**) à savoir le sol, l'eau, les plantes (**Alexander, 1961 ; You et Park, 1996**), l'air, le fumier, les composts, le foin, les débris des végétaux, les résidus fibreux de cannes à sucre, le pollen des plantes, les sédiments marins, les lacs, les rivières, les mers et les océans (**Lacey, 1973 ; Cross, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983; Lacey, 1997**), ainsi que dans les environnements extrêmes tels que les milieux très salés. Ils sont présents dans les sols glaciaires de l'arctique, les déserts chauds et secs de divers continents, les sols des régions industrielles polluées par du pétrole ou des métaux lourds, dans les lacs extrêmement alcalins (**Lechevalier, 1981**). Plusieurs actinobactéries sont également isolées des composts, il s'agit de genres thermophiles tels que *Thermoactinomyces*, *Sacharomonospora* et d'autres thermotolérants tels que *Microbispora*, *Micropolyspora*, *Pseudonocardia* (**Ensign et al., 1993 ; Lacey, 1997**). La recherche de telles souches thermophiles ou hyper thermophiles permet de viser la production d'amylases thermostables pouvant les utiliser dans les agro-industries et c'est le cas de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 isolée du compost de poulet, qui produit des protéases (**Habbeche et al., 2014**), des xylanases (**Habberra et al., 2013**) et des lipases (**Semache et al., 2021**).

Les actinobactéries sont aussi retrouvées dans les milieux aquatiques : les rivières et les ruisseaux et même dans des sédiments océaniques situés à plus de 4000 m de profondeur (**Cross, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983**). Actuellement de plus en plus les travaux de recherche sont orientés vers l'isolement de souches d'actinomycètes du milieu aquatique en l'occurrence de la mer. Ainsi, les différentes investigations ont montré que près de 30 souches d'actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces* sont isolées produisant des molécules bioactives (**Cheema et al., 2016**). Nous citons quelques exemples d'actinomycètes isolés des milieux aquatiques producteurs d'amylases : *Nocardiosis Dassonvillei* Kas11 (**Rathore et al., 2020**), *Streptomyces gancidicus* ASD KT852565 (**Ashwini et Kumar, 2016**).

Tableau 02 : Répartition des Actinomycètes dans la nature (Goodfellow, 1983).

Genre	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol et compost
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière.
<i>Frankia</i>	Nodule des racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière.
<i>Sacharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière.
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermoospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

3. Classification

La taxonomie des actinobactéries est basée sur un ensemble de critères et qui sont : caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques, chimio-taxonomiques et moléculaires. Les actinobactéries représentent l'une des plus grandes unités taxonomiques actuellement reconnues dans le domaine des bactéries (Barka et al., 2016). Selon le **Bergey's Manual de Systematique Bactériologique (2012)** les actinomycètes sont classés dans le domaine Bacteria et le phylum *Actinobacteria* qui est subdivisé à son tour en 06 classes. La plus importante est la classe des *Actinobacteria* qui se divise en 15 ordres. Les plus importants sont ceux des *Actinomycetales* et *Streptomycetales* (Goodfellow et al., 2012).

La figure 10 représente les intra-classe apparentées des Actinobactéries et les relations phylogéniques entre les ordres, les sous-ordres et les familles, montrant la présence de cinq ordres sur la base de la comparaison des séquences du gène de l'ARNr 16S (Zhi et al., 2009).

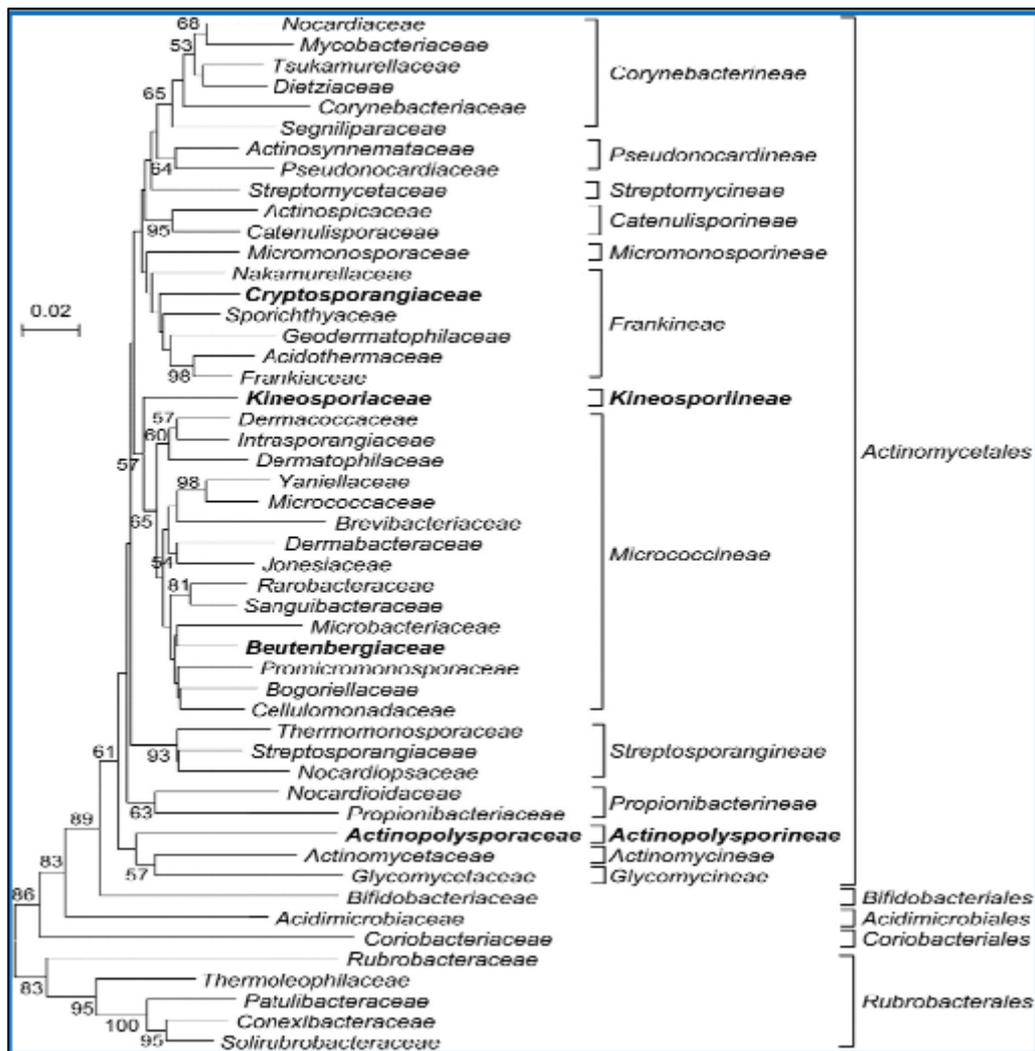


Figure 10 : Classification du phylum des *Actinobacteria* basée sur des données de séquençage de l'ADN r 16S. Les familles contenant des membres soumis au séquençage complet du génome sont représentées en gras (Zhi et Stackebrandt, 2009).

4. Le genre *Actinomadura*

Le genre *Actinomadura* qui nous intéresse le plus dans ce travail de recherche est rattaché à la famille des *Thermomonosporaceae* et à l'ordre des *Streptosporangiales* (Puhl et al., 2009; Whitman et al., 2012). Le sol représente le premier réservoir des espèces du genre *Actinomadura* (Yassin et al., 2010; Badji et al., 2011; Bonnet et al., 2011; Lee, 2012, Taibi et al., 2012; Habbeche et al., 2014). Elles ont un mycélium aérien qui peut être blanc, jaune, jaune grisâtre, rose pâle, rose jauneâtre, vert bleuâtre ou gris, sur lequel se forme des chaînes de spores courtes (en général de 2 à 8 spores par chaîne seulement, plus rarement jusqu'à 15) portées par de très courts sporophores; ceci les distingue des espèces de *Streptomyces*

à chaînes de spores longues et portées par des sporophores bien développés. Les chaînes peuvent être droites, incurvées (sous forme de crochet ou de boucle), ou spiralées (spires à un à deux tours) (**Figure 11**).

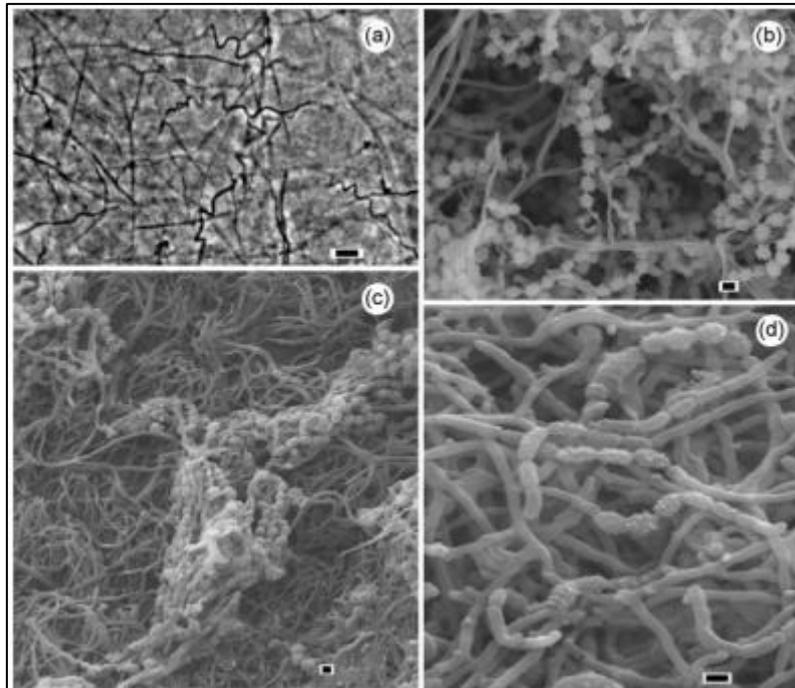


Figure 11 : Photographies de la morphologie de la souche *Actinomadura keratinilytica* sp. nov. vue par : (a): microscope optique montrant hyphes cultivées dans le milieu ISP2; (b): microscope électronique montrant des spores matures; (c): microscope électronique montrant les hyphes aériennes; (d): microscope électronique montrant la différenciation des hyphes aériennes en conidies (**Puhl et al., 2009**).

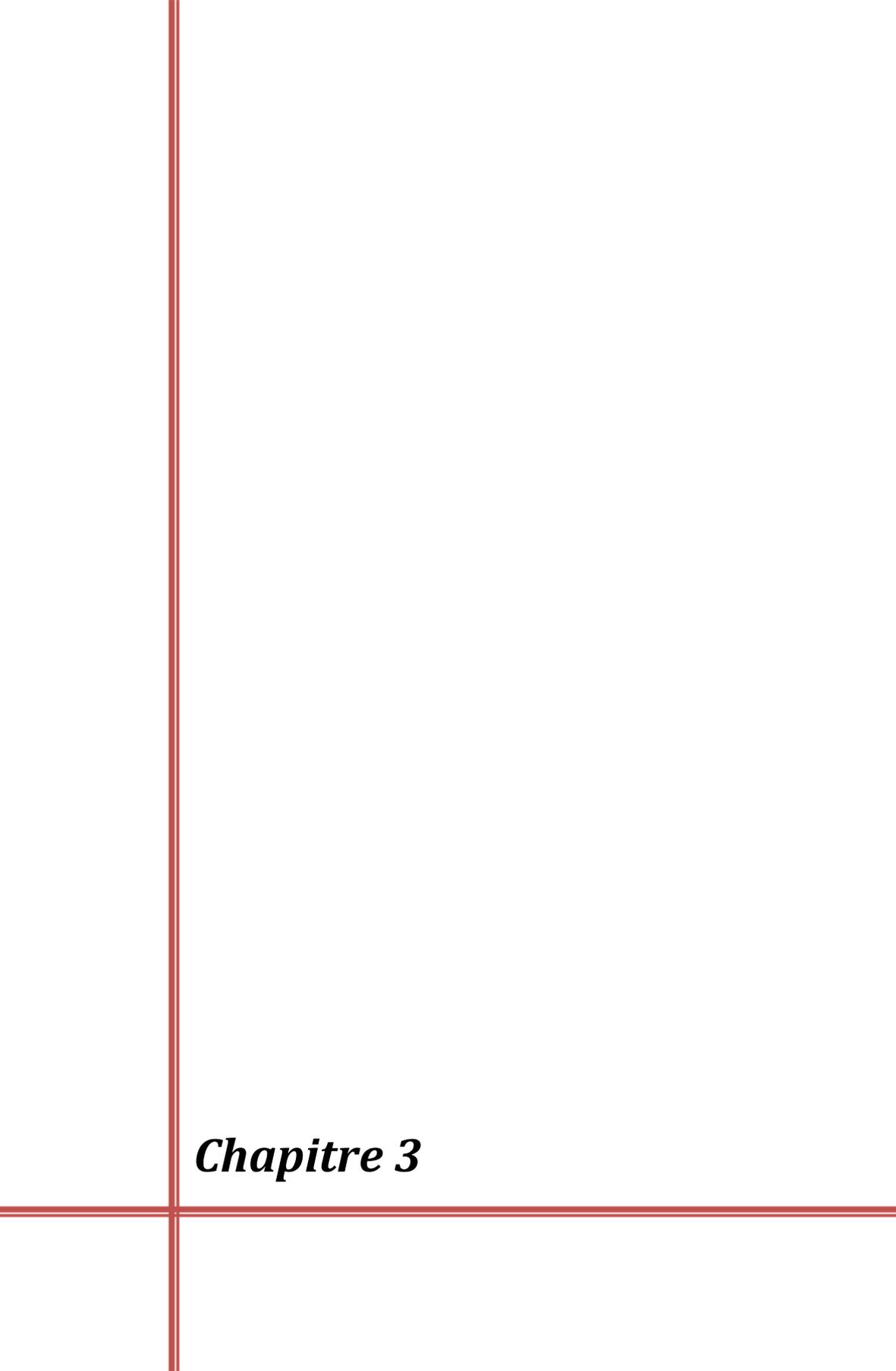
5. Les actinomycètes en tant que sources d'enzymes

Les actinobactéries sont doués d'activités importantes de biodégradation, et sont capables de métaboliser des molécules difficiles à dégrader en produisant plusieurs enzymes hydrolytiques (pectinases, amylases, cellulases, xylanases, lipases, protéases, et chitinases) dont certains sont utilisés industriellement (**Addou, 2009 ; Kumar et Khare, 2015; Mukhtar et al, 2017**). Le **tableau 03** regroupe quelques enzymes produites par les actinobactéries.

Toutefois, Il existe de nombreuses espèces actinomycétales productrices d'amylases et c'est le cas des espèces: *Streptomyces lophurensis* KaM5 (Rathore et Singh, 2021), *Streptomyces griseorubens* (Bukhari et al., 2021), *Streptomyces* VITMK1 (Manimaran et Kannabiran, 2018) et *Streptomyces* Al-Dhabi-46 (Al-Dhabi et al., 2020).

Tableau 03: Quelques enzymes hydrolytiques commerciales produites par les actinomycètes et leurs applications (Manimaran et Kannabiran, 2018).

Enzymes	Espèce d'actinobacteria	Température optimale et pH optimum	Applications industrielles
Cellulases	<i>Streptomyces ruber</i>	6 et 37°C	Détergent, Industrie textile
	<i>Thermobifida halotolerans</i>	7 et 45°C	
Proteases	<i>Streptomyces pactum</i>	7.5 et 40°C	Pharmaceutique, Tannage de cuir
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	6.5 et 65°C	
Keratinases	<i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt29 (espèce) (Habbeche et al., 2014)	10 et 70 °C	Tannage de cuir, Pharmaceutiques
Amylases	<i>Streptomyces erumpens</i>	9 et 45°C	Détergent, Boulangerie, Industrie textile
	<i>Thermobifida fusca</i>	6 et 60°C	
Xylanases	<i>Streptomyces spp.</i>	9 et 50°C	Boulangerie, Alimentation des animaux
	<i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt 29 (espèce) (Habberra et al., 2013)	9 et 75°C	
Lipases	<i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt 29 (espèce) (Semache et al., 2021)	8 et 37.9 °C	Détergent
	<i>Nocardiopsis alba</i>	7 et 30°C	
Chitinases	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	6 et 60°C	Agent anti-moustique et nématocide
	<i>Nocardiopsis prasina</i>	7 et 55°C	
Pectinases	<i>Streptomyces lydicus</i>	6.5 et 45°C	Clarification des jus de fruits
	<i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt 20 (espèce) (saoudi et al., 2015)	10.5 et 70 °C	



Chapitre 3

Chapitre 3 : les plans d'expériences

1. Généralités

De nombreuses expériences en laboratoire deviennent de plus en plus complexes car elles dépendent d'un grand nombre de variables (**Kimouche et Gheribi, 2008; Tinsson, 2010**); ceci concerne par exemple les conditions optimales qui conduisent à une production enzymatique maximale par un microorganisme. Toutefois, avec le développement des outils informatiques et de leur puissance de calcul, et surtout par la planification expérimentale et la méthode des plans d'expériences qui en a résulté, il est devenu plus aisé d'aborder cette problématique. Dans une production enzymatique, les facteurs peuvent être de différentes sortes. Leur influence sur la production diffère d'un microorganisme à un autre mais aussi d'une enzyme à une autre. D'une manière générale ils sont représentés par la composition du milieu et les conditions de culture, plus particulièrement par le pH, la température, l'aération, l'âge et la taille de l'inoculum, la concentration en phosphate et les sources de carbone et d'azote. D'autres facteurs spécifiques à certaines enzymes comme le calcium sont aussi à considérer (**Garske et al., 2017; Sindhu et al., 2017; Debnath et al., 2019**).

Il est à souligner l'avantage économique offert par cette méthode ; car les plans d'expériences organisent mieux l'expérimentation d'une recherche scientifique, et permettent d'obtenir un maximum d'informations avec un minimum d'expériences. Les plans d'expériences se définissent comme étant des méthodes mathématiques et statistiques permettant de modéliser et d'organiser au mieux des essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles (**Goupy et Creighton, 2006**).

Il existe deux types de plans :

- Plans factoriels complets : Il s'agit d'un remplissage de l'espace de façon régulière dans le domaine expérimental, plus le nombre de niveaux sera important plus le remplissage de l'espace sera satisfaisant mais cela entraîne un nombre énorme d'expériences (**Franco, 2008**).
- Plans factoriels fractionnaires : Dans les plans fractionnaires, l'expérimentation n'est qu'une fraction des essais du plan complet qui inclue tous les effets principaux

et toutes les interactions. Bien que les plans fractionnaires réalisent des économies d'expériences, des contreparties et des ambiguïtés peuvent survenir lors de l'interprétation des résultats surtout dans le cas où le degré de fractionnement du plan complet est plus grand (**Hoinard, 2009**).

Les plans d'expériences sont divisés en deux grandes catégories, selon leurs propriétés et leurs capacités à répondre à certaines problématiques particulières.

2. Plans pour screening

Ces plans permettent de choisir les facteurs qui influencent significativement la réponse.

2.1. Plan de Plackett et Burman

Ce design consiste essentiellement en une fraction très spécifique d'un plan factoriel complet. Il permet d'évaluer les effets. Bien que ce design se base sur deux niveaux de chaque facteur, nous pouvons aussi introduire un certain nombre de points centraux. Situés au milieu de l'écart pour chacun des facteurs, ces points servent à évaluer le degré de non-linéarité que possède la surface de réponse en question (**Plackett et Burman, 1946**). Ce type de plan expérimental ne permettant d'évaluer que l'importance des effets principaux, il est nécessaire de poursuivre l'étude à l'aide d'un plan expérimental plus élaboré.

2.2. Plan de Taguchi

C'est une conception factorielle qui indique l'influence de différents paramètres sur une réponse donnée par un petit nombre d'expériences au lieu de tester toutes les combinaisons possibles (**Clément, 2000**). Grâce à cette approche, on peut déterminer une combinaison des paramètres de conception de sorte que la réponse peut être proche de la cible souhaitée (**Bharti et al., 2010**).

3. Plans pour l'optimisation des niveaux des facteurs

La méthodologie des surfaces de réponse (MSR) consiste en un groupe de techniques mathématiques et statistiques utilisées dans le développement d'une relation fonctionnelle adéquate entre une réponse d'intérêt et un nombre de variables. Cette relation peut être approchée par un modèle polynomial (**Khuri et Mukhopadhyay, 2010**). Les surfaces

de réponse n'utilisent que les facteurs précédemment jugés influents (**Vivier, 2002**). Les plans du second degré les plus utilisés pour l'optimisation des milieux sont :

3.1. Plan composite centré

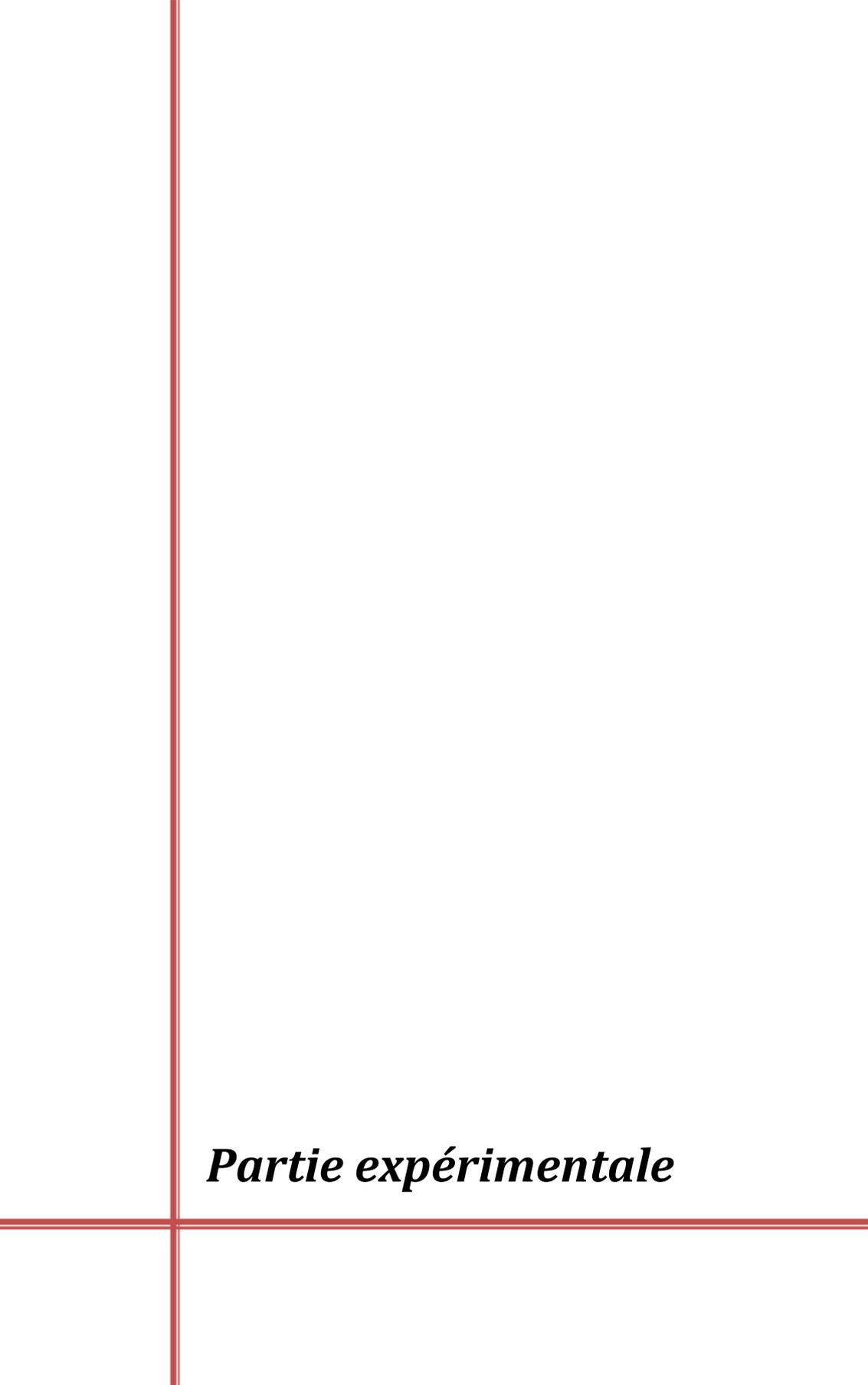
Ce plan a été décrit par **Box et Wilson (1951)**. La matrice est en réalité la réunion de 3 séries de points :

- les expériences d'un plan factoriel complet ou fractionnaire à deux niveaux par facteur
- Les expériences axiales placées sur les axes propres au plan.
- Les expériences au point central (**Vivier, 2002**). Le nombre d'expériences pour un plan composite central est : $n = 2^k + 2k + c_0$, où k est le nombre de facteurs et c_0 est le nombre de points centraux (**Ferreira et al., 2007**).

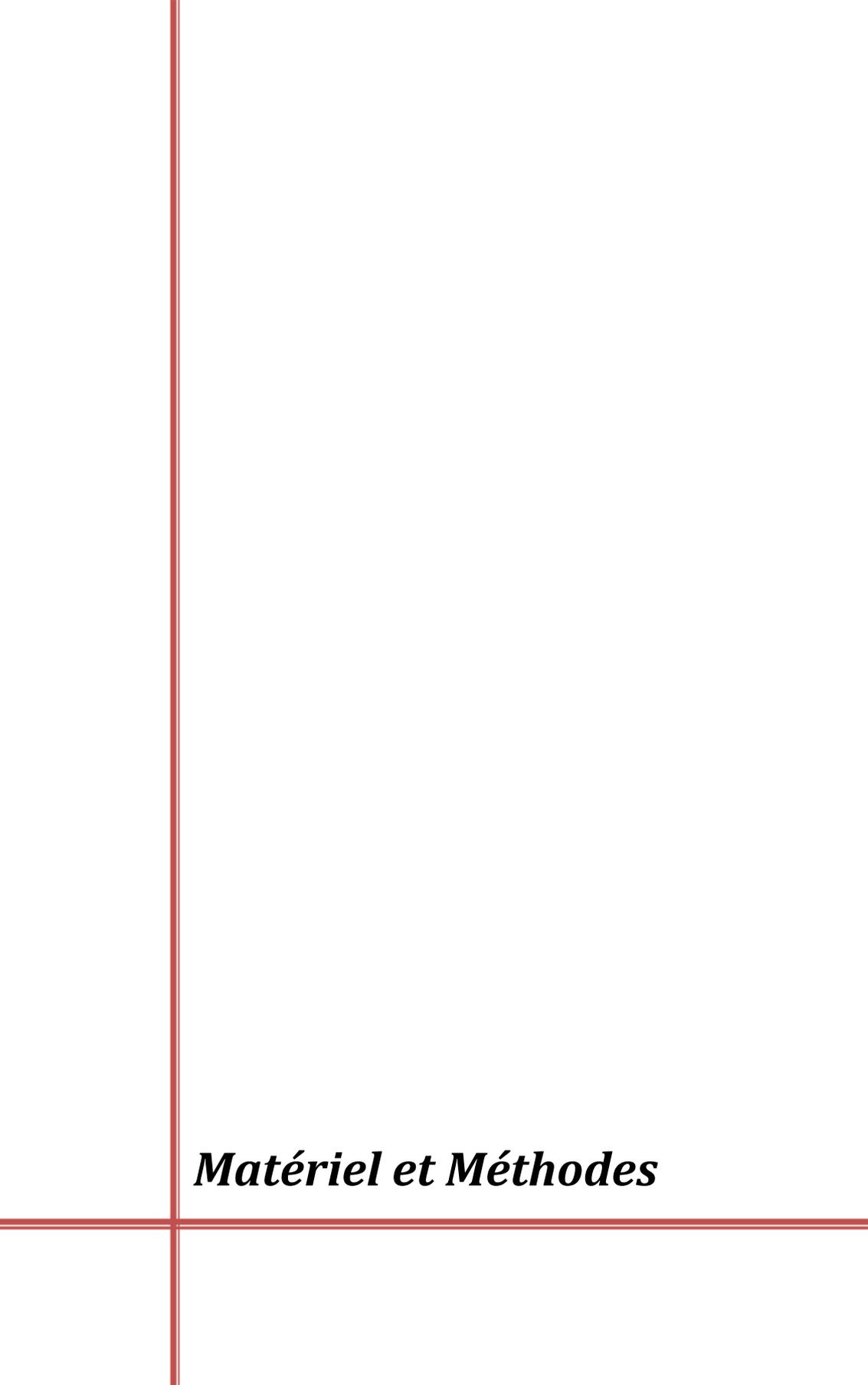
3.2. Plan de Box Behnken

C'est un plan facile à mettre en œuvre qui permet d'établir des modèles du second degré dans les quelles chaque facteur prend trois niveaux (-1, 0 et +1). Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est construit sur un cube dont les points expérimentaux sont placés au milieu, avec une répartition de tous les points expérimentaux à égale distance du centre de domaine d'étude. Les plans Box-Behnken à trois facteurs contient 15 points expérimentaux, dont 12 essais sont situés au milieu de chaque arrêtes de cube avec trois essais répétés au centre de domaine prennent des coordonnées (0, 0, 0) (**Box et Behnken, 1960; Goupy et Creighton, 2006**).

Nous rappelons que dans notre cas ces méthodes mathématiques sont appliquées dans l'optimisation de la production d'amylases sur milieu liquide avec comme but d'augmenter le niveau de production de cette enzyme.



Partie expérimentale



Matériel et Méthodes

Partie 1: Optimisation de la production des amylases par plan d'expériences.

1.1.Souche utilisée

Le microorganisme utilisé pour la production des amylopullunases est une souche d'actinomycète thermophile, isolée du compost de poulet dans la région d'Annaba (Nord-est algérien). Les échantillons ont été collectés à partir d'échantillons de compost de poulet au niveau de l'Unité de Chair Engraissement Poulet appartenant au Groupe Avicole de l'Est (GAE) et la Société des Abattoirs de l'Est (SAE) Algérien. La souche est isolée au niveau du Laboratoire Biochimie et Microbiologie Appliquées (LBMA) et identifiée au niveau du Centre de recherche de Biotechnologie de Sfax (CBS) (Tunisie) par techniques moléculaires (Gène ARNr 16s) sous le nom : *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 avec un numéro d'accès (KC447297) (**Habbeche et al., 2014**) et qui est enregistrée dans la base de données Gen Bank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

La souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 est cultivée sur milieu ISP2 (International Streptomyces Project Medium-2) (**Annexe n°01**). Ce milieu est préconisé par **Shirling et Gottlieb (1966)** pour la croissance et la sporulation des actinomycètes. Le milieu de culture est ajusté à pH 6.5 avant l'addition de l'agar à raison de 20g/l. Le mélange est autoclavé à 121°C pendant 16 minutes, puis coulé dans des boîtes de Petri. Les boîtes de Petri gélosées et ensemencées sont incubées à 45°C pendant 4 jours.

Pour la conservation, la souche est mise en culture en milieu liquide approprié (ISP2). La suspension cellulaire est mélangée avec du glycérol stérile à 20% et répartie dans des Cryo-tubes puis conservée à -20°C.

1.2. Production de l'enzyme et conditions de culture

1.2.1. Recherche de l'activité amylolytique globale sur milieu solide (Test qualitatif)

Afin de mettre en évidence la production des amylases par la souche *A.keratinilytica* Cpt29, nous avons dans un premier temps procédé à un test qualitatif sur milieu solide (**Annexe n°01**). La souche est cultivée sur milieu solide contenant l'amidon comme seule source de carbone à 1% de concentration (**Abd-Elhalem et al., 2015**). Le milieu de culture est ajusté à pH 6.5 avant l'addition de l'agar à raison de 20g/l. Le mélange est autoclavé à 121°C pendant 16 minutes, puis coulé dans des boîtes de Petri.

La détection de l'activité globale amylopullulansique se fait par utilisation d'une solution de Lugol à 0,1% étalée sur les colonies en boîte de Petri pendant 30 secondes et suivie d'un

rinçage avec de l'eau distillée (**Annexe n°01**). Le principe repose sur la fixation du Lugol sur l'amidon non-dégradé pour donner une couleur bleu-violacée, par contre les zones hydrolysées apparaissent sous forme de zones claires ce qui explique une sécrétion d'amylopullulanases. Ce test est à la fois qualitatif et semi-quantitatif car il y a une relation de proportionnalité entre le diamètre des halos (cm) et l'activité enzymatique (**Msarah et al., 2020**).

1.2.2. Recherche de l'activité amylopullulansique sur milieu liquide (Test quantitatif)

Ce test a pour but d'une part de détecter l'activité amylopullulansique en milieu liquide et d'autre part de mesurer cette activité. La souche *A.keratinilytica* Cpt29 est donc cultivée sur le milieu liquide à base d'amidon soluble à raison de 1% (p/v) (**Annexe n°01**).

Le milieu liquide est préparé et réparti dans des Erlenmeyers stériles de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture, l'ensemencement se fait par 2% (v/v) de pré-culture.

Après ensemencement, l'incubation se fait à 45°C sous agitation (180 rpm) pendant 3 jours à pH 6.5. Après incubation, la culture est arrêtée et centrifugée pendant 20 min à 10000 g. Le surnageant est par la suite filtré et utilisé pour la recherche de l'activité amylopullulansique et le dosage des protéines. Il constitue l'extrait enzymatique brut.

1.3. Méthodes analytiques

1.3.1. Dosage de l'activité amylopullulansique

Les activités amylolytiques et pullulansiques sont déterminées en utilisant la méthode de Miller qui consiste à doser les sucres réducteurs par le DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) (Miller, 1959).

➤ Principe de la méthode

Le principe de cette technique est basé sur l'augmentation de l'intensité de la couleur du complexe sucres réducteurs-réactif DNS, mesurée à une longueur d'onde de 540 nm. En effet, l'action de l'amylase sur l'amidon le transforme en produits libres sous forme de sucres-réducteurs, puis dans un milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5- DNS) « jaune orangé » est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique « rouge orangé ».

➤ Mode opératoire

Le mélange réactionnel préalablement mis au point est composé de :

- 0,1 ml d'extrait enzymatique
- 0,9 ml d'amidon soluble (ou pullulane) à 1% (p/v) solubilisé dans le tampon Tris HCl à 50 mM pH 8.
- Le mélange est incubé pendant 10 min à 70°C dans un bain-Marie sous agitation.
- La réaction est arrêtée par l'addition de 2 ml de DNS (**Annexe n°02**).

Le dosage des sucres réducteurs obtenus après réaction enzymatique est déterminé par référence à la courbe d'étalonnage du maltose (2 mg/ml) (**Annexe n°02**).

L'unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la libération de sucres réducteurs équivalent à 1 μ mol de maltose par minute et par millilitre d'enzyme dans les conditions d'essai.

L'activité amylopullulansique (UI/ml) est déduite à partir de l'équation ci-dessous:

$$\text{Activité amylasique (UI/ml)} = \frac{[\text{SR}] \times d \times D}{M \times t}$$

SR : concentration des sucres réducteurs en mg/ml

d : facteur de dilution

D : dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel.

t : temps de la réaction en minutes.

M : masse molaire du maltose en mg

1.3.2. Dosage des protéines

La teneur en protéines dans les préparations enzymatique brute a été déterminée par la méthode de **Bradford (1976)**.

Le principe de la méthode colorimétrique est basé sur la réaction entre les groupes chimiques de la chaîne latérale des différents acides aminés avec le réactif bleu brillant de Coomassie (G250) (BBC) pour donner une couleur bleue pourpre avec un maximum situé à une longueur d'onde de 595 nm. Il y a donc une proportionnalité entre l'absorbance (DO) et la concentration des protéines. Par ailleurs une courbe d'étalonnage utilisant la Sérum Albumine Bovine (SAB) comme solution mère à (0,1 mg/ml) est utilisée et le dosage de l'échantillon se fait par rapport à la courbe d'étalonnage. Les résultats obtenus sont exprimés en µg/ml ou mg/ml. (**Annexe n°01** et **Annexe n°02**).

1.3.3. Mesure de l'activité spécifique (AS)

L'activité enzymatique spécifique (AS) est déterminée à partir de l'activité enzymatique exprimée en micromoles (µM) de sucres réducteurs /volume (ml)/ minute et la concentration des protéines en (mg/ml). Ainsi, l'activité spécifique est le nombre d'unités d'enzymes (UI) par unité de masse de protéines, exprimée en mg. L'activité spécifique a été donc exprimée selon l'équation suivante :

$$AS = \frac{\text{Activité enzymatique (UI/ml)}}{\text{mg de protéine}}$$

1.4. Optimisation de la production d'amylases de la souche *A.keratinilytica* Cpt29

L'optimisation de la production des amylases a été réalisée en deux étapes. Tout d'abord, nous avons procédé à l'identification des meilleures sources de carbone et d'azote. La deuxième étape concerne l'optimisation des paramètres de culture et de fermentation pour une production maximale de l'enzyme. Dans cette dernière étape de notre travail, l'étude sur la modélisation et l'optimisation du milieu de culture dans le but d'augmenter la production des amylases est très importante. La méthode classique d'optimisation consiste à faire varier un paramètre à la fois en ignorant les interactions combinées entre les conditions expérimentales du processus (**Kizhakedathil et Chandrasekaran, 2018**). Pour cela, nous avons dans un premier temps identifié les paramètres de cultures (les influents) qui permettent une meilleure optimisation de la production enzymatique. L'identification des facteurs significativement influençant la production amylosique par la souche *A.keratinilytica* Cpt29, a été réalisée en utilisant le plan de Plackett-Burman (**Plackett et Burman, 1946**). Les facteurs influents ont été utilisés dans l'étude d'optimisation en utilisant la méthodologie de surface de réponse (RSM). Cette méthode est un ensemble de techniques mathématiques et statistiques qui peut être utilisé pour définir les relations entre la réponse et les variables indépendantes (**Myers et al., 2004**).

1.4.1. Sélection de la meilleure source d'azote et de carbone

Afin de déterminer la meilleure source d'azote et de carbone pour la production d'amylases sur milieu de culture liquide **M1**. Différentes sources de carbone ont été testées à raison de 1% (p/v) (Amidon de maïs, amidon de riz, son de blé, poudre d'orange, lactosérum, pelures de pomme de terre, flocons d'avoine et amidon soluble) et de différentes sources d'azote organiques et inorganiques (Tryptone, extrait de levure, peptone, urée, extrait de viande, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ et KNO₃).

Le milieu est réparti dans des Erlenmeyers stériles de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture liquide. L'ensemencement se fait par 2% (v/v) de pré-culture de la souche *A.keratinilytica* Cpt29 déjà préparée et incubée à 45°C pendant 48 h.

Après ensemencement, l'incubation se fait à 45°C sous agitation (180 rpm) pendant 3 jours. Après incubation, la culture est arrêtée et centrifugée pendant 20 min à 10000 g. Le surnageant est par la suite filtré et utilisé pour la recherche de l'activité amylopullansique.

1.4.2. Criblage des facteurs influençant la production d'amylases par l'utilisation du plan Plackett-Burman

Le plan de Plackett et Burman est un plan factoriel fractionné de premier ordre utilisé pour étudier les principaux effets, dans le but de ressortir celles les plus influents sur la production des amylases. Ce plan est généralement le plus employé dans les études similaires à la nôtre, en raison de son économie en termes de nombre d'essais. Il est également utile pour évaluer la pertinence d'un modèle de premier degré. Ce plan a été déjà utilisé dans de nombreux travaux pour la sélection des facteurs influençant la production d'enzymes tel que production d'enzymes gélatinolytiques chez *Bacillus amyloliquefaciens* H11 (Sai-Ut *et al.*, 2014), la α -galactosidase chez *Fusarium moniliforme* NCIM 1099 (Gajdhane *et al.*, 2016) et la lipase de la *Ochrobactrum intermedium* MZV101 (Ebrahimipour *et al.*, 2017).

Dans notre étude, le plan factoriel de Plackett-Burman est utilisé pour sélectionner les facteurs significativement influents, qui seront utilisés dans l'optimisation de la production d'amylases par la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29. La matrice de ce plan a été générée par huit (08) facteurs composant le milieu de culture tels que : la température d'incubation, le temps d'incubation, pH, CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄, tryptone et l'amidon de maïs (Tableau 04). L'espace expérimental opéré au niveau supérieur et inférieur de chaque facteur, est résumé dans le tableau 05.

Le traitement de la matrice est réalisé par Minitab18 dont l'analyse statistique consiste à identifier les variables qui ont un effet significatif sur la production d'amylases.

Tableau 04 : Matrice de Plackett et Burman pour l'étude de 8 variables avec 12 expériences.

Expériences	A	B	C	D	E	F	G	H
1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
2	1	1	-1	1	-1	-1	1	1
3	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
4	1	-1	1	1	1	-1	-1	1
5	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
6	1	1	1	-1	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	1	1	1	-1	-1
8	-1	-1	1	1	-1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1
11	-1	1	-1	-1	1	1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

+1 niveau supérieur,

-1 niveau inférieur.

Tableau 05 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Plackett et Burman.

Codes	Variables	Unité	Niveaux	
			Inférieure	Supérieure
			(-1)	(+1)
A	Temps	(d)	2	5
B	Témpérature	(°C)	40	45
C	pH	-	5	7
D	Amidon	(g/l)	5	30
E	Tryptone	(g/l)	2	10
F	CaCl ₂	(g/l)	0	0.5
G	MgCl ₂	(g/l)	0	0.5
H	KH ₂ PO ₄	(g/l)	0	1

Le modèle polynomial du premier ordre a été utilisé pour analyser les réponses expérimentales à l'aide de l'équation du premier degré (Eq.1) ci-dessous :

$$(Eq.1): Y = \beta_0 + \sum X_i \beta_i$$

Y: la réponse expérimentale

β_0 : constante

β_i : coefficient de régression de la variable explicative X_i ;

X_i : variable explicative ;

1.4.3. Optimisation des composants sélectionnés par Méthodologie des Surfaces de Réponse (RSM) basée sur un plan Box-Behnken

Sur la base des résultats obtenue par le plan Plackett et Burman, un plan expérimental Box-Behnken est mené pour déterminer les valeurs optimales des trois facteurs sélectionnés (Amidon de maïs, tryptone et le pH du milieu de culture).

Chaque facteur dans le plan est étudié à trois niveaux codés -1, 0 et 1 (15 combinaisons représentés dans le **tableau 07**, Le plan de Box-Behnken avec des valeurs codées et réelles est présenté dans le **tableau 06**. Ce processus comporte les étapes importantes suivantes :

la réalisation du plan statistique, l'estimation des coefficients dans un modèle mathématique, et la prédiction de la réponse ainsi que la vérification de l'adéquation du modèle (Elibol, 2004).

Tableau 06 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan composite centré.

Codes	Variables	Unité	-1	0	+1
A	Amidon	(g/l)	20	30	40
B	Tryptone	(g/l)	6	10	14
C	pH	-	6	7	8

L'équation polynomiale de second ordre suivante (Eq.2) a été utilisée pour calculer les réponses :

$$(Eq.2): Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

Où Y représente la réponse, β_0 est la réponse moyenne (constante), β_i est le coefficient linéaire, β_{ii} est le coefficient des carrés, β_{ij} est le coefficient d'interaction, et $X_i X_j$ sont des variables indépendantes qui influencent la réponse.

Tableau 07 : Matrice de Box-Behnken pour l'étude de 3 variables avec 15 expériences.

Expériences	A	B	C
1	-1	1	0
2	0	0	0
3	1	1	0
4	0	1	-1
5	-1	0	-1
6	0	1	1
7	1	0	1
8	1	0	-1
9	0	0	1
10	-1	0	0
11	1	1	0
12	0	0	0
13	-1	1	0
14	0	1	-1
15	0	1	1

1.4.4. Analyses statistiques et modélisation

La génération des matrices expérimentales utilisées dans cette étude, le traitement statistique, l'interprétation des résultats du plan Plackett-Burman et Box-Behnken (le calcul des coefficients de régression, l'analyse de la variance (ANOVA), la détermination des valeurs de la probabilité de signification (p) et le test de Fisher), la réalisation des diagrammes de Pareto, des courbes tridimensionnelles et les graphiques de contour sont réalisées à l'aide du logiciel MINITAB version 18.

Tous les essais ont été menés en triple et la valeur expérimentale a été présentée comme moyenne \pm écart type.

Les données obtenues sont soumises à l'analyse de variance (ANOVA).

1.4.5. Test de validation

Une culture est réalisée en triple avec les optima calculés afin de confirmer la validité du modèle mathématique généré par la méthode RSM. Les données obtenues expérimentalement ont été comparées à celles prédites et l'erreur de prédiction a été calculée.

Partie 2: Extraction, purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application de l'amylase dans la détergence.

Après l'optimisation de la production des amylases, nous nous sommes intéressés à la purification de ces enzymes pour pouvoir les caractériser.

2.1. Purification

Le protocole de purification se fait selon les différentes étapes suivantes :

2.1.1. Préparation de l'extrait enzymatique brut

Après 5 jours de culture en milieu liquide de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt 29 à 45°C et pH 6.8 et sous agitation à 180 rpm, le milieu de culture obtenu est centrifugé à 10000 g pendant 20 min à 4°C et de nouveau filtré sur membrane de diamètre 45 µm. Le filtrat obtenu constitue l'extrait enzymatique brut.

2.1.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation est une technique sélective utilisée pour purifier partiellement et concentrer les protéines solubles dans un surnageant. Le sulfate d'ammonium à forte concentration entre en compétition avec les protéines pour réagir avec les molécules d'eau. Ceci entraîne une désolvatation suivie d'une précipitation.

La précipitation au sulfate d'ammonium de la totalité des protéines a été effectuée en ajoutant du sulfate d'ammonium solide jusqu'à 80% de saturation. Après 2 h d'agitation, on centrifuge à 10000 g pendant 20 min. Ensuite, les protéines précipitées recueillies par centrifugation ont été remises en suspension dans un volume minimal de tampon phosphate 0,05 M (pH 6.8) (**Annexe n°01**) et dialysées à 4°C pendant une nuit contre le même tampon pour éliminer les sels.

La précipitation fractionnée des protéines de chaque extrait brut a été réalisée de la manière suivante : On ajoute au surnageant, en faible quantité sous une agitation douce et à froid, du sulfate d'ammonium solide jusqu'à 40% de saturation. On laisse sous agitation pendant 2 h puis on centrifuge à 10000 g pendant 20 min, le surnageant recueilli est additionné de sulfate d'ammonium solide jusqu'à 60% de saturation. Après 2 h d'agitation, on centrifuge à 10000 g pendant 20 min. Ensuite, les protéines précipitées recueillies par centrifugation ont été remises en suspension dans un volume minimal

de tampon phosphate 0,05 M (pH 6.8) (**Annexe n°01**) et dialysées à 4°C pendant une nuit contre le même tampon pour éliminer les sels.

L'activité amylasique et pullulanasiq ue a été estimée dans chaque fraction collectée comme décrit précédemment (**Miller, 1959**) et l'absorbance à 280 nm a été vérifiée. Les fractions présentant l'activité amylasique la plus élevée ont été regroupées et stockées à 4°C pour poursuivre la purification.

2.1.3. Chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-75)

La séparation des molécules se fait en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise pour cela des granules de gel poreux qui constitue la phase stationnaire et qui est le gel de Sephadex G75 (Pharmacia) ayant un domaine de fractionnement situé entre 3 à 80 kDa.

Nous présentons brièvement les différentes étapes ci-après :

-Le gel de Séphadex est d'abord mis dans le tampon de travail pendant une nuit et cela pour gonfler et donc établir les mailles. Par la suite le gel est coulé dans une colonne une colonne en verre de dimensions (1x60cm) est préparée puis équilibrée avec le tampon phosphate 0,05 M à pH 6.8 (**Annexe n°01**).

- pour chaque tournée chromatographique, un volume de 2 ml de la préparation enzymatique (dialysat) est déposé au sommet de la colonne. L'élution est réalisée avec le même tampon phosphate à un débit de d 0,8 ml/min et des fractions de 1,5 ml/tube sont recueillies.

- Pour chaque tube (fraction collectée) on mesure d'une part l'absorbance des protéines à 280 nm et d'autre part l'activité amylasique et pullulanasiq ue par la même méthode de Miller (citée déjà).

- A défaut d'un enregistreur, le profil chromatographique est tracé manuellement.

2.2. Caractérisation biochimique de l'enzyme purifiée

2.2.1. Contrôle de la pureté et détermination de la masse molaire par électrophorèse (PAGE-SDS)

La méthode utilisée est électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (PAGE-SDS) selon la méthode décrite par Laemmli (**Laemmli, 1970**) en utilisant un gel de séparation à 12% (pH 8.5) et un gel de concentration à 5% (pH 6.8). Le détail du mode opératoire figure dans **Annexe n°02**.

Le contrôle de la pureté est effectué par électrophorèse en PAGE-SDS. Ainsi, au cours des différentes étapes de purification: précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie sur gel. Les différents pics de l'activité amylolytique sont récupérés. Les tubes sont réunis, dialysés contre l'eau, lyophilisés et redissouts dans un minimum d'eau pour être visualisé par électrophorèse. Parallèlement, sur d'autres pistes, le marqueur de taille (M) des protéines, l'extrait brut (dialysat) et le lyophilisat (activité amylolytique du pic élué) sont déposés sur le gel de polyacrylamide en PAGE-SDS.

Après migration à 70 mV constant, le gel est récupéré et les protéines sont révélées par une solution de coloration de bleu de Coomassie R250 pendant une nuit suivi par décoloration complète du gel par une solution de décoloration (**Annexe n°02**).

Les différents bandes qui apparaissent seront analysées par rapport aux autres pistes ce qui permet de contrôler à la fois la pureté de l'enzyme et la détermination de sa masse molaire.

La masse moléculaire relative (Mr) de l'enzyme purifiée est déterminée par comparaison avec des marqueurs protéiques de 10 standards de taille située entre 10 et 170 kDa (Protein Marker IV (peq GOLD)). Ainsi, le tracé de la courbe $\text{Log } Mr \text{ f (distance en cm)}$ permet de calculer avec précision cette masse molaire.

Parallèlement un zymogramme en conditions natives est effectué sur la bande purifiée (sans les agents dénaturants). Ainsi, 1 g/l d'amidon soluble est incorporé dans le gel de séparation. Une fois l'électrophorèse terminée, le gel a été incubée à 40°C pendant 1 h dans du tampon Tris HCl pH 8 (50 mM) et l'activité amylolytique a été observée par coloration avec une solution de Lugol. L'apparition d'une zone transparente correspondante à la bande de l'activité amylolytique sur un fond bleu indiquant l'emplacement de l'enzyme (**Xian et al., 2015**).

2.2.2. Effet du pH sur l'activité et la stabilité enzymatique

L'influence du pH sur les activités enzymatiques est déterminée par la mesure de l'activité enzymatique à différents pH, variant de 5 à 11. Tous les tampons utilisés sont à des concentrations de 50 mM: tampon acétate de sodium pH (5.0-5.5); tampon phosphate pH (6.0-7.5); tampon Tris-HCl pH (8.0-9.0); tampon Glycine NaOH pH (9.5-11.0) (**Annexe n°01**).

La stabilité des enzymes est déterminée par pré-incubation dans des tampons à 30°C et à différents pH (Tampon phosphate pH (6.0-7.0); tampon Tris-HCl pH (8.0-9.0); tampon Glycine NaOH pH (10.0-12.0)), pendant 3 h.

Les activités résiduelles (%) sont mesurées dans les conditions optimales de température et de pH de l'enzyme. Ainsi, à 100%, l'activité est représentée comme un témoin.

2.2.3. Effet de la température sur l'activité et la stabilité enzymatique

L'étude de l'effet de la température sur l'activité enzymatique est réalisée en utilisant différentes valeurs de température de 40°C à 100°C.

La thermostabilité a été également étudiée en incubant l'enzyme à différentes températures (70-90°C) pendant 3 h. Des aliquotes sont prélevées à des intervalles déterminés (30 min) et refroidis sur de la glace avant d'être utilisé pour déterminer l'activité enzymatique résiduelle dans des conditions optimales. L'enzyme non-traitée est considérée comme témoin (100%).

2.2.4. Effets des ions métalliques, des inhibiteurs et de solvants organiques sur la stabilité enzymatique

Dans cette partie de travail, nous avons étudié l'effet des ions métalliques bivalents, des inhibiteurs et les solvants organiques sur l'activité amylolytique et cela pour une ultérieure application dans le domaine biotechnologique.

-Les ions métalliques bivalents testés sont: (Ca^{2+} (CaCl_2), Co^{2+} (CoSO_4), Cu^{2+} (CuSO_4), Fe^{2+} (FeSO_4), Mg^{2+} (MgSO_4), Mn^{2+} (MnSO_4), Zn^{2+} (ZnSO_4)) à une concentration de 5 mM.

-Les inhibiteurs ou tensio-actifs sont les suivants : Acide éthylène diaminé traacétique (EDTA) (10 mM), dodécyl sulfate de sodium SDS (2%), β -mercaptoéthanol (10 mM), tween 80 (10%), urée (10 mM) et Triton X-100 (2%).

Les différents ions métalliques et les inhibiteurs ou tensio-actifs ont été ajoutés dans le mélange réactionnel. L'activité est ensuite exprimée en pourcentage de niveau d'activité en l'absence d'ions métalliques, des inhibiteurs ou tensio-actifs. Les activités amylolytiques, mesurées en l'absence de tout additif, sont prises comme témoin (100%).

Les solvants organiques utilisés sont les suivants: (Ethanol, acétone, DMSO) à 10%. L'incubation se fait pendant 1 h. Les activités résiduelles (%) sont mesurées dans les conditions optimales de température et de pH de l'enzyme.

2.2.5. Analyse des produits de dépolymérisation par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM, en anglais TLC Thin layer chromatography) est une technique analytique de séparation et d'identification des produits d'hydrolyse de la réaction des amylases sur le substrat amidon. Sur la base de ces produits identifiés, il est possible de montrer le mode d'action de l'enzyme (attaque endo ou exo).

✓ Principe:

Le principe de cette technique est basée sur le partage des solutés entre deux phases: une stationnaire (S)_s liquide fixée sur un solide (silice) et une phase mobile (S)_m liquide. Il y a donc un partage des solutés entre ces deux en fonction de leurs polarités, ainsi, plus une molécule est soluble dans la (S)_m et plus elle est éluée rapidement en premier, en revanche un soluté plus soluble dans la phase (S)_s sortira le dernier.

✓ Mode opératoire :

Sur une plaque de gel de silice (Schleicher et Schüll F-1500) de 20 x 20 cm, on dépose à l'aide d'un capillaire, des volumes approximatif de 20 µl des solutions suivante

-Milieu réactionnel des échantillons (ajouter à 0,1 ml d'enzyme, 0,9 ml de pullulan ou d'amidon dans le tampon tris HCl pH 8 (50 mM) et incuber à 70°C pendant 8h).

-Deux témoins G : glucose et M : maltose (à 1 mg/ml dans de l'eau distillée)

La plaque chromatographique est ensuite mise dans la cuve de migration contenant le solvant suivant : n-butanol, acide acétique, Eau (3, 1, 1.V/V) (Dakhmouche Djekrif et al., 2021).

Après 4 heures de migration, la plaque de silice est séchée sous hotte, puis pulvérisée avec un révélateur (Acide sulfurique 5%, éthanol (95%), 95% (v/v)). La plaque est enfin chauffée dans une étuve à 100°C pendant 5 à 10 min environ. Les produits de dépolymérisation donnent des taches noires sur le chromatogramme selon la réaction furfuralique basée sur la déshydratation des oses en milieu acide et à chaud.

Ainsi, le calcul des RF (rapport frontal) de chacun des solutés permet d'identifier l'oligomère inconnue.

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par l'oligomère}}{\text{Distance parcourue le solvant}}$$

2.3. Immobilisation d'enzyme

2.3.1. Mode opératoire (condition d'immobilisation)

Dans cette étape de travail qui concerne le protocole de l'immobilisation, l'enzyme est fixée sur le support solide par des liaisons covalentes (**Singh et al., 2012**) qui impliquent généralement des chaînes latérales telles que les amines de la lysine, les groupes thiol de la cystéine, ainsi que des groupes carboxyle, imidazole et phénoliques.

- ✓ L'amylase utilisée : il s'agit de l'extrait brut de l'enzyme sous forme de dialysat.
- ✓ Le support utilisé : il s'agit d'un film membranaire de type polyfluorure de vinylidène-co-hexafluoropropylène d'oxyde de nickel (PVDF-co-HFP-NiO) préparé par le Dr Volkan Eyupoglu au niveau du laboratoire de chimie Çankırı Turquie (**Annexe n°03**)
- ✓ Conditions d'immobilisation : l'immobilisation se fait à une température ambiante et aux conditions optimales de la réaction selon le protocole suivant :
 - Les capsules du support solide (25 mg) au nombre de 3 sont immergées dans un volume de 3 ml de solution enzymatique diluée au 1/10 soit une activité de 473 UI/ml et le contact se fait pendant 15 min sous agitation.
 - Les enzymes immobilisées sous forme de capsules formées (**Figure 12**) sont lavées avec de l'eau distillée pour éliminer les quantités d'enzymes non-liées, et l'eau de lavage est recueillie pour la détermination de l'activité enzymatique et le calcul du rendement d'immobilisation.

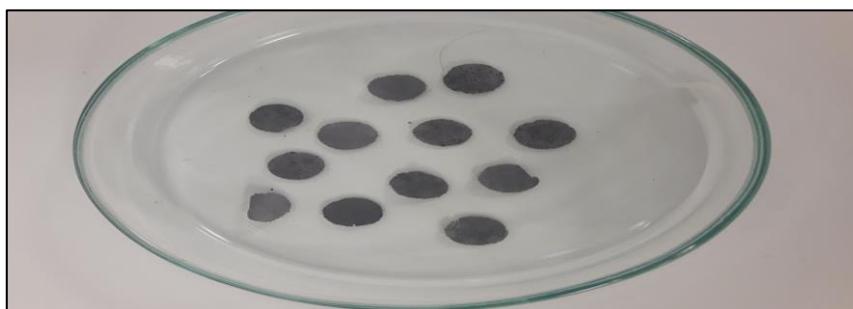


Figure 12 : Le film membranaire PVDF-co-HFP-NiO (support d'immobilisation).

- ✓ Rendement d'immobilisation : le rendement d'immobilisation est défini comme étant la rentabilité de l'enzyme immobilisée sur le film membranaire PVDF-co-HFP-NiO et exprimé par l'équation suivante :

$$\text{Rendement d'immobilisation (en \%)} = \left(\frac{\text{Activité de l'enzyme immobilisée}}{(A-B)} \right) \times 100$$

A : représente l'activité de l'enzyme libre ajouté.

B : représente l'activité de l'enzyme libre restant dans l'eau de lavage et non fixée par le support (Abdel-Mageed et al., 2019).

2.3.2. Efficacité de la réutilisation d'amylase immobilisée

L'avantage de l'utilisation de biocatalyseurs immobilisés est la possibilité de les utiliser à plusieurs reprises sans perte sensible d'activité. Chaque cycle dure 10 min à 70°C (Dakhmouche, 2016). Les enzymes immobilisées obtenues sont lavées avec de l'eau distillée pour l'utilisation suivante et le processus est répété pour plusieurs cycles jusqu'à ce que l'activité enzymatique diminue. L'activité résiduelle est calculée en prenant compte de l'activité enzymatique du premier cycle à 100%.

2.3.3. Caractérisation de l'enzyme immobilisée

- **Effet du pH sur l'activité et la stabilité de l'enzyme immobilisée**

L'effet du pH sur l'activité et la stabilité de l'enzyme immobilisée sont déterminées selon les mêmes conditions que sur l'enzyme libre (présentées déjà 1.4.2).

- **Effet de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme immobilisée**

L'Effet de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme immobilisée est également déterminées selon le même protocole que sur l'enzyme libre (présentées déjà 1.4.3).

2.4. Essais d'applications biotechnologiques de l'amylopullulanase (Extrait brut)

Pour des raisons à la fois économiques et pratiques, les tests d'application au laboratoire dans le domaine de la détergence utilisent le dialysat.

2.4.1. Test de la compatibilité avec divers détergents à lessive commerciaux

Le but de ce test est d'étudier l'effet de quelques détergents sur l'activité de l'amylopullulanase (le dialysat), pour éventuellement incorporer ces enzymes dans la lessive afin d'améliorer leurs performances. Ainsi, 9 détergents récupérés du marché algérien sont utilisés dont quatre solides (Bingo[®], ISIS[®], Omo[®], Le Chat[®]) et cinq liquides (Ariel[®], Force Xpress[®], Oro[®], Pro-Vit[®], Test[®]). Un témoin sans détergent est utilisé comme référence (100% d'activité).

Les solutions aqueuses de détergents solide sont à (7 mg/ml) et liquide à 10% (v/v) sont chauffées à 100°C pendant 60 min pour dénaturer l'activité enzymatique endogène. Par la suite, la réaction enzymatique de l'amylase est effectuée en présence de 1% de chaque solution de détergents liquide et solide préparée préalablement dans les conditions optimales de température et de pH, suivi par la mesure de l'activité de l'amylopullulanase résiduelle par la méthode standard (préalablement décrite) et par rapport au témoin 100% (réaction enzymatique dans les mêmes conditions sans mais sans addition du détergent) (Corrêa *et al.*, 2011; Uzun *et al.*, 2018).

2.4.2. Test de la performance de lavage

Dans le but de tester l'efficacité de l'amylopullulanase alcaline produite par la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 pour l'utiliser éventuellement comme additif bio-détergent. La performance de lavage est évaluée par la détermination de la capacité de l'enzyme à éliminer la tache de chocolat et de tomate sur des tissus en coton (Hmidet *et al.*, 2009).

- **Protocole**

- Des morceaux de tissu en coton blancs et neufs (4 cm × 4 cm) sont imbibés d'une tache de chocolat ou de sauce tomate. Ils sont laissés à sécher pendant 4 h à 60°C.

- Pour tester la performance de lavage, chaque morceau de tissu sale est plongé dans des Erlen de 500 ml contenant :

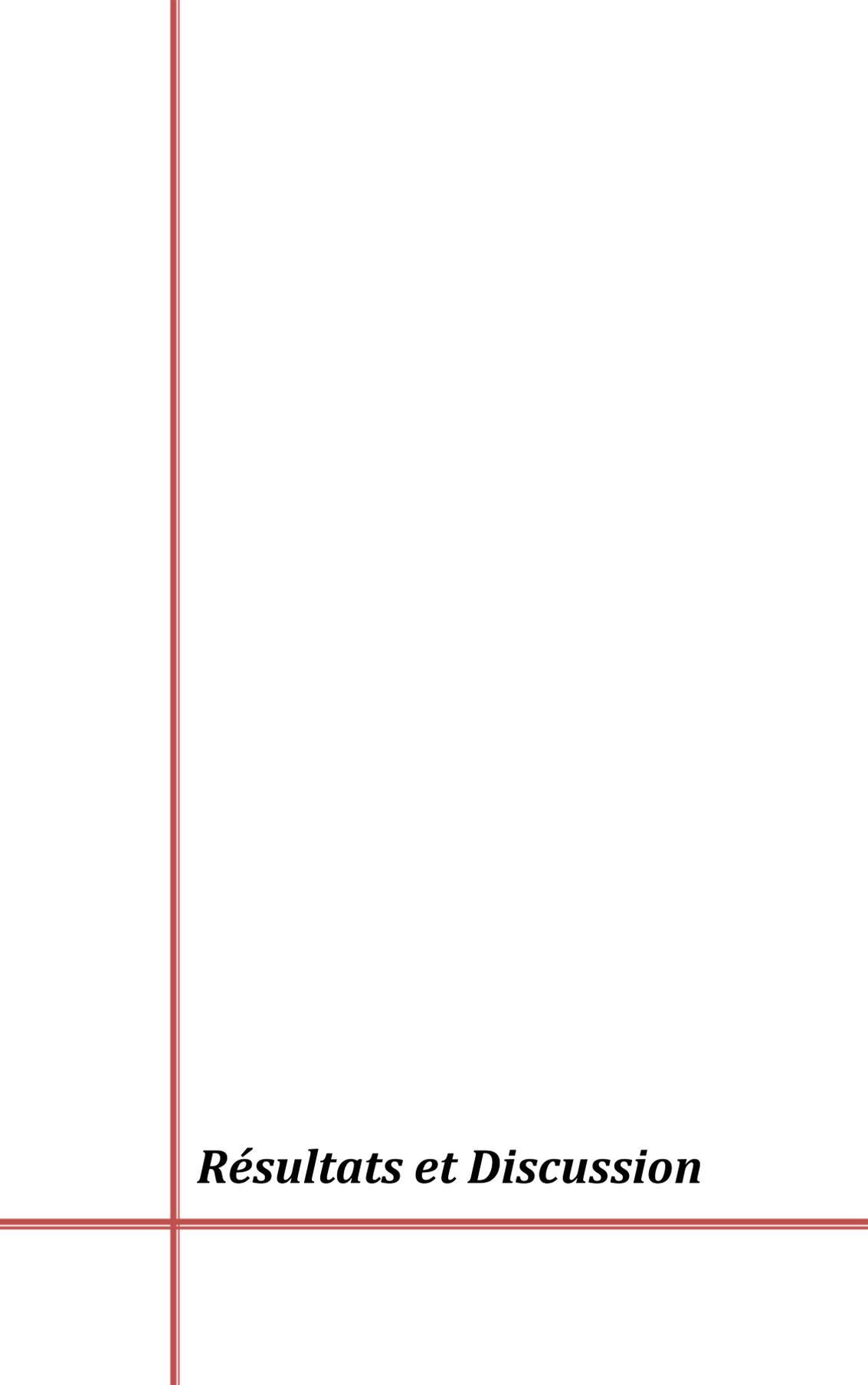
- Erlen (1) 100 ml d'eau du robinet (témoin)

Matériel et méthodes

- Erlen (2) 96 ml d'eau du robinet + 4 ml de détergent commercial (Test) (10% (v/v))
- Erlen (3) 96 ml d'eau du robinet + 2 ml de détergent commercial (Test) (10% (v/v)) + 2 ml l'amylopullulanase (473 UI/ml).

-Tous les Erlen sont incubés au shaker à 40°C pendant 30 min sous agitation 200 rpm.

-Après incubation, les morceaux de tissu sont retirés et rincés à l'eau puis séchés et soumis à une observation visuelle pour examiner les effets des enzymes sur les taches. Le morceau de tissu taché de chocolat ou de sauce tomate non-traité est considéré comme témoin.



Résultats et Discussion

Partie 1: Optimisation de la production des amylases par plan d'expériences.

1.1. Mise en évidence l'activité amylolytique de la souche Cpt29

1.1.1. Détection de l'activité amylolytique sur milieu solide

Après 3 jours de culture de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 à 45°C et à pH 6.5 sur milieu solide à base d'amidon l'observation macroscopique a révélé que la souche se cultive facilement sur ce milieu. Après addition de la solution de Lugol (0,1%) et rinçage avec de l'eau distillée, on remarque l'apparition d'un halo transparent autour des colonies avec un diamètre de 2,4 cm (**Figure 13**).

Ce test préliminaire prouve que la souche Cpt29 est active sur son substrat (Amidon) par sécrétion d'amylases. A ce stade, on peut dire que l'amidon constitue l'inducteur de la synthèse de l'enzyme. Ainsi, les oligomères libérées par cette enzyme ne réagissent pas avec le réactif (Lugol) qui se traduit par des zones translucides au tour des colonies.

Ce test semi quantitatif est en effet utilisé dans divers travaux de recherche dans la détection d'activité amylolytique chez les espèces : *Bacillus amyloliquefaciens* P-001 (**Deb et al., 2013**), *Streptomyces rochei* BTSS 100 (**Acharyabhata et al., 2013**) et *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 (**Al-Dhabi et al., 2020**). Toutefois, ce test d'activité est préliminaire et sera ultérieurement confirmé par la recherche d'amylases sur milieu liquide.

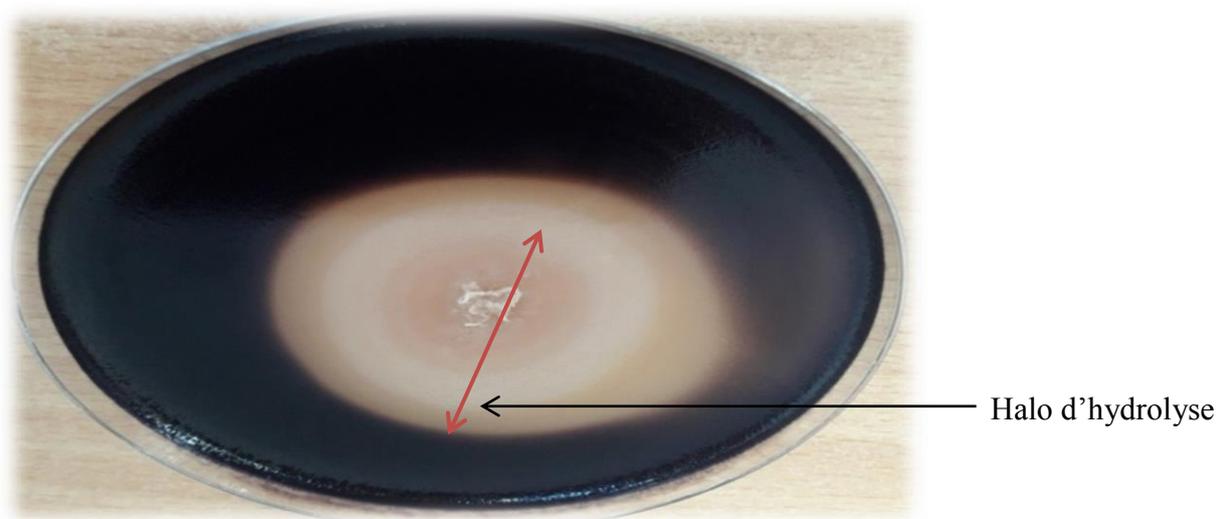


Figure 13 : Mise en évidence de l'activité amylolytique de la souche Cpt29 sur milieu solide à base d'amidon (test semi-quantitatif).

1.1.2. Mesure de l'activité amylopullulansique sur milieu liquide

La recherche de l'activité amylopullulansique en milieu liquide permet d'une part de confirmer ou infirmer le test d'activité sur milieu solide et d'autre part, mesurer le niveau d'activité amylopullulansique de cette souche pour pouvoir la comparer aux autres microorganismes en l'occurrence les actinomycètes thermophiles et mésophiles.

L'examen des différents résultats obtenus montre qu'après culture de la souche au bout 3 jours à pH 6.5 et température 45°C, le niveau d'activité obtenu est de l'ordre de 50 UI/ml. Ce test confirme donc d'une part que l'enzyme est induite (nature adaptative et non constitutive) par la source de la carbone et d'autre part l'enzyme est secrété dans le milieu extra-cellulaire et il s'agit d'enzymes extracellulaires ce qui facilite leurs extractions et leurs purifications. De même que le polymère d'amidon étant une macromolécule de taille élevée qui ne peut pénétrer dans la cellule et c'est plutôt l'enzyme qui traverse la membrane pour dégrader le substrat amidon en unités simples facilement assimilable par le microorganisme.

La comparaison de l'activité amylyasique de la Cpt29 aux autres souches d'actinomycètes montre que celle-ci est supérieure à celles obtenues chez d'autres espèces d'actinomycètes telles que : *Streptomyces* 20r (Oussadi et Kitouni, 2015), *Streptomyces* SLBA-08 (Santos et al., 2012) et *Streptomyces aureofasciculus* AE-19 (Poornima et al., 2008) qui obtiennent une activité amylyolytique entre 3 et 12 UI/ml. Par ailleurs une étude sur une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 et une souche fongique *Trichoderma harzianum* F-2082 (Kalia et al., 2021) donne une activité de 63 UI/ml et de 5,91 UI/ml (Prajapati et al., 2015).

En ce qui concerne la recherche de l'activité pullulanasique, l'analyse des résultats obtenus donne une activité de l'ordre de 24 UI/ml. Cette activité semble être peu compétitive comparativement aux espèces de bactéries thermophiles comme le cas de *Klebsiella pneumonia* qui donne un niveau d'activité de 87,21 UI/ml (Abdul-Hadi et Al-Bayyar, 2019), soit presque 4 fois plus élevée que la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29. De même l'espèce *Thermus thermophilus* HB8 présente une activité pullulansique de 76 UI/ml (Akassou, 2018). Par ailleurs le résultat obtenu chez l'espèce *Bacillus cereus* a montré une activité de 0,549 UI/ml qui est très faible par rapport à celle obtenue par la souche Cpt29 (Waleed et al., 2015).

A ce stade on peut dire que la Cpt29 synthétise deux amylases de type α -amylase et une pullulanase. Ce résultat montre aussi que l'activité pullulansique est plus faible que l' α -

amylase, soit la moitié. Cela peut s'expliquer par la taille de l'amylose largement supérieur aux branchements α -(1-6).

Dans la nature, ces deux enzymes agissent en synergie pour dégrader la totalité de l'amylopectine composée d'amylose (α (1-4) et de pullulanane α (1-6), pour les métaboliser comme source de carbone.

Il est à noter que cette même souche (Cpt29) a fait déjà l'objet de travaux recherches sur d'autres hydrolases au niveau de notre laboratoire (LBMA), et c'est le cas de xylanases, kératinases et lipases (**Haberra et al, 2013 ; Habbeche et al, 2014 ; Samache et al, 2021**). Par ailleurs, une autre souche thermophile isolée du même milieu (compost de poulet) *Actinomadura keratinilytica* Cpt 20 s'est également montrée très active sur des polymères par production de xylanases, pectinases et protéases (**Taibi et al., 2012 ; Saoudi et al., 2015 ; Kerouaz et al., 2021**). En effet, le compost représente un réservoir d'actinomycètes thermophiles capables de dégrader la biomasse végétale par utilisation d'hydrolases (lipases, chitinases, xylanases, cellulases, protéases, polysaccharidases et d'autres enzymes) pour donner des unités simples assurant le métabolisme de ces microorganismes et également jouent un rôle capital dans la fertilisation des sols (**Sharma et al., 2021**). Ces mêmes hydrolases ont eu de multiples applications en biotechnologie blanche (détergence, tannerie, clarification de jus de fruits et autres).

1.2. Optimisation de la production d'amylases par plan d'expériences

Les conditions de culture et la composition du milieu de base de la fermentation peuvent affecter de manière significative la production des amylases. Cette partie de travail de recherche de la thèse est consacrée essentiellement à l'optimisation de production d'amylases par la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29. Ainsi, dans notre cas et dans les conditions de production sans optimisation sur le milieu initial contenant amidon soluble 1%, extrait de levure 0,5%, tryptone 0,5%, CaCl₂ 0,05%, KH₂PO₄ 0,1% et MgCl₂ 0,05% à un pH de 6.5 donne un niveau de production de l'ordre de 50 UI/ml d'activité amylolytique. Ce résultat reste faible par rapport aux travaux de recherches sur les actinomycètes : nous citons les souches suivantes : *Streptomyces* Al-Dhabi-46 avec un niveau de production de 208 ± 11,4 UI/ml (Al-Dhabi et al., 2020) et *Streptomyces gulbargensis* avec un niveau de production de 2216,6 UI/ml (Syed et al., 2009).

Dans ce contexte global, nous nous sommes intéressés à optimiser le niveau de production de cette souche afin d'évaluer son potentiel de production d'amylases par rapport à d'autres microorganismes connus dans la production de cette enzyme. Par ailleurs, l'optimisation peut se faire selon deux méthodes dont l'une est classique et l'autre avec plan d'expérience ou plan factoriel. Les méthodes classiques de l'optimisation des milieux de culture, tel que l'approche d'un facteur à la fois, sont longues, coûteuses et difficiles à réaliser quand un grand nombre de variables doit être exploré. Aussi, ce genre de méthodes ne permet pas de détecter les interactions entre les multiples facteurs impliqués. De ce fait, l'utilisation des plans statistiques tels que les plans d'expériences pour l'optimisation des milieux de culture peut pallier aux limites des méthodes classiques.

1.2.1. Sélection de la meilleure source d'azote et de carbone

Avant de chercher les conditions optimales de production d'amylases par la souche Cpt29, il est utile, dans une première étape, de déterminer les conditions préliminaires de production. Il s'agit de choisir les substrats de base (meilleure source de carbone et meilleure source d'azote).

1.2.1.1. Choix de la meilleure source de carbone

Les substrats carbonés servent à la fois comme source de croissance et d'énergie aux Actinomycètes. La production des amylases par la souche Cpt29 a été testée sur le milieu de base avec différentes sources de carbone solubles et insolubles (amidon de maïs, amidon

de riz, son de blé, poudre d'orange, lactosérum, pelures de pomme de terre, flocons d'avoine et amidon soluble)

L'ensemble des résultats obtenus sont présentés par l'histogramme qui représente l'effet des différentes sources de carbone sur l'activité enzymatique (**Figure 14**).

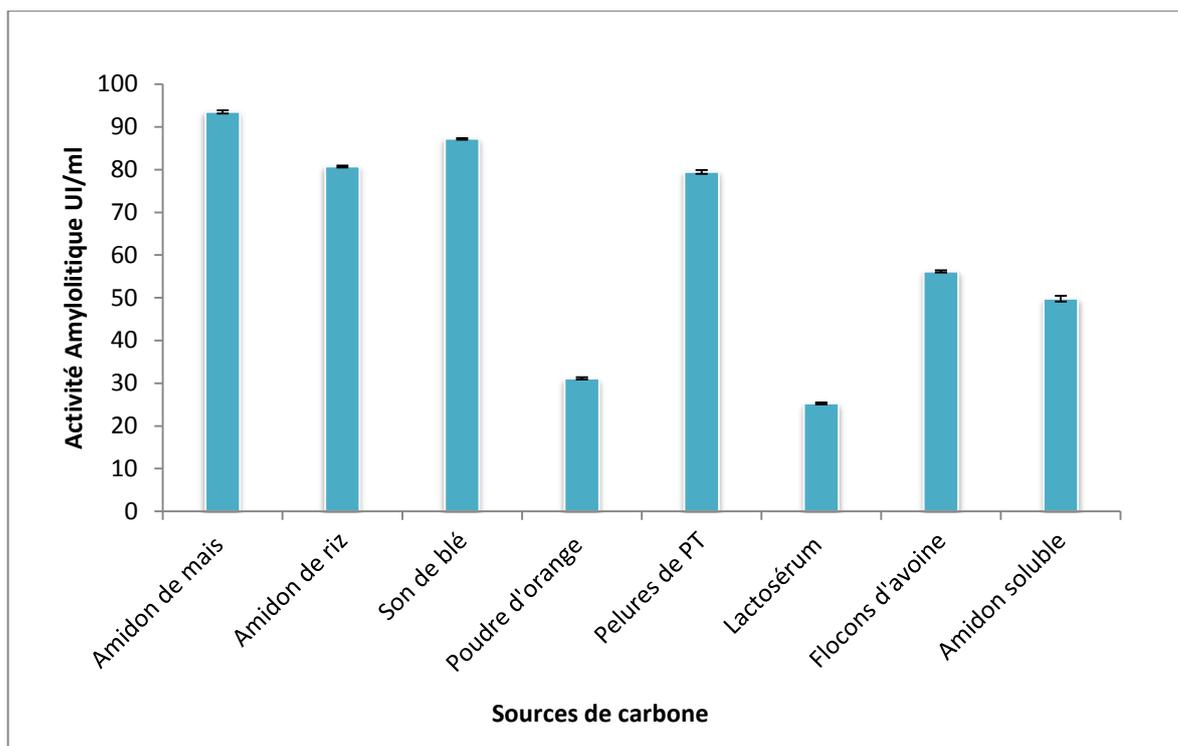


Figure 14 : Effet de différentes sources de carbone sur la production d'amylases chez la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29.

L'analyse des résultats montre que le niveau de production d'amylases est bien lié à la nature des sources de carbone. La production d'amylases par la souche Cpt29 a été fortement induite par les sources d'amidon complexe telles que l'amidon de riz, le son de blé et la pelure de pomme de terre. En outre, l'amidon de maïs semble être la meilleure source de carbone pour la production d'amylases par la souche étudiée ($93,5 \pm 0,4$ UI/ml) suivie par le son de blé ($87,2 \pm 0,16$ UI/ml), l'amidon de riz ($80,73 \pm 0,20$ UI/ml) et la pelure de pomme de terre ($79,45 \pm 0,44$ UI/ml). En revanche les autres sources de carbone donnent des activités amylopullansique relativement faibles et qui sont les déchets d'orange ($31,11 \pm 0,26$ UI/ml) et le lactosérum ($25,3 \pm 0,21$ UI/ml).

1.2.1.2. Choix de la meilleure source d'azote

Comme la source de carbone, la source d'azote est un facteur très important dans le milieu de croissance ou de production d'enzymes. Il est connu que les proportions relatives des sources de carbone et d'azote doivent être bien ajustées pour avoir une bonne croissance et une production maximale d'enzymes.

Dans le but de choisir la meilleure source d'azote, différentes sources de ce composé ont été testées (organiques et minérales), la source de carbone est maintenue constante dans les différentes conditions expérimentales (Amidon de maïs à 1%). L'ensemble des résultats obtenus sont représentés par l'histogramme (**Figure 15**).

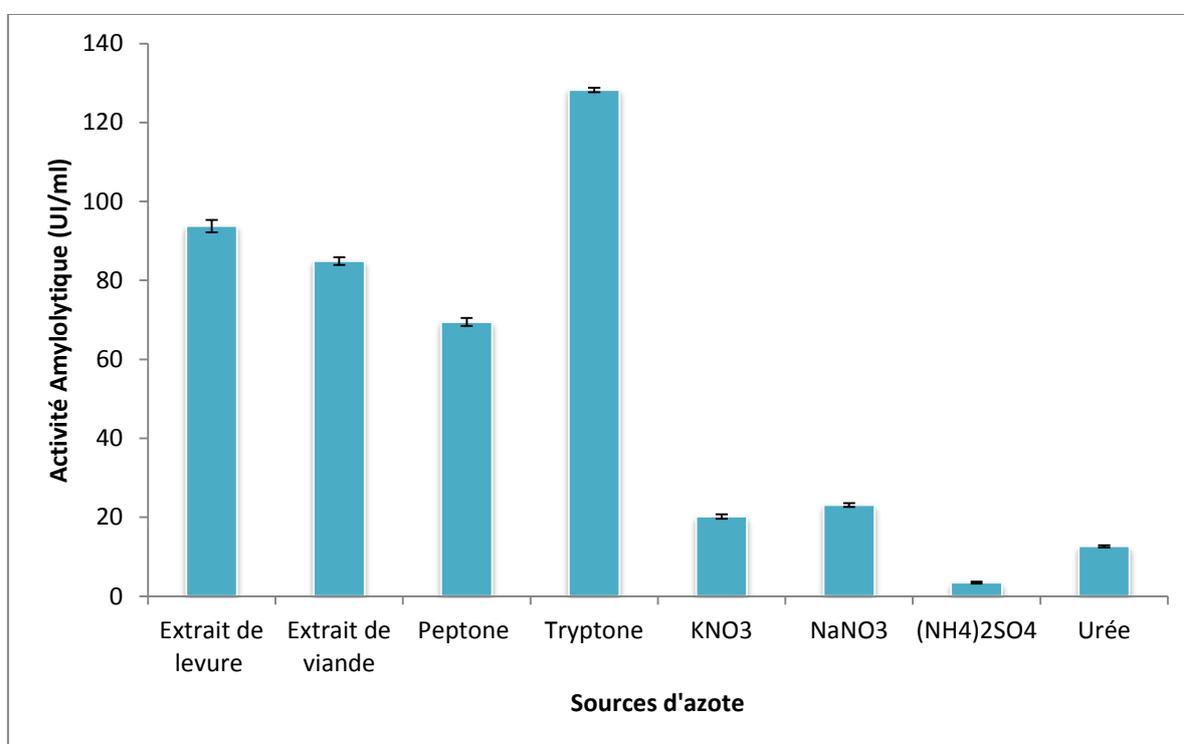


Figure 15 : Effet des différentes sources d'azote sur la production d'amylases.

L'analyse de la **figure 15** montre que la production des enzymes amylolytiques par la souche d'Actinomycète Cpt29 est mieux induite en présence de sources d'azote organiques. La préférence aux sources d'azote organiques comme la peptone et l'extrait de levure pour la production d'amylases a été décrite chez d'autres souches telles que *Chryseobacterium* (Hasan et al., 2017), la souche *Bacillus amyloliquefaciens* (Deb et al., 2013).

La tryptone donne une meilleure production d'amylases avec une valeur de $128,21 \pm 0,55$ UI/ml suivi de près par l'extrait de levure avec une production de $93,76 \pm 1,56$ UI/ml. La tryptone et l'extrait de levure sont des sources d'azote complexe qui fournit tous les acides aminés essentiels nécessaires pour la synthèse de l'enzyme (**Bandal et al., 2021**). Ozdemir et ses collègues ont signalé une production d'amylase inférieure ($1,06$ UI/ml) en utilisant 10 g/l de tryptone (**Ozdemir et al., 2018**).

Par ailleurs, on remarque que les sources d'azote minéral (inorganique) tel que : NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ et le KNO_3 donnent des activités amyliques faibles entre $3,5$ et 23 UI/ml. En revanche, d'autres travaux de recherche sur la production d'amylases chez la souche *Bacillus licheniformis* AT70 indiquent que le niveau d'activité amylolytique est corrélé à l'azote minérale sous forme de chlorure d'ammonium (**Afrisham et al., 2016**).

Ces résultats préliminaires ont permis donc de choisir l'amidon de maïs comme source de carbone et la tryptone comme source d'azote pour la production des amylases chez la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29.

1.2.2. Etude de l'optimisation de production d'amylases par plan d'expérience

1.2.2.1. Criblage des facteurs par le plan Plackett –Burman

L'effet de huit (08) facteurs exprimant les composants du milieu et certains paramètres cultureux sur l'activité amylolytique de la souche Cpt29 a été évalué suivant une étape de criblage statistique, utilisant un plan factoriel de premier degré type Plackett–Burman. Les facteurs utilisés ainsi que leurs valeurs réelles sont représentées dans le **tableau 05**.

Les réponses des différents essais expérimentaux du plan statistique de Plackett-Burman sont représentées dans le **tableau 08**.

Tableau 08 : Les résultats de l'activité amylasique sur les différents milieux formulés selon le plan expérimental de Plackett–Burman.

Expériences	Activité amylasique (UI/ml) ^a
1	25,78
2	160,50
3	32,10
4	182,30
5	15,30
6	37,22
7	178,65
8	164,50
9	168,00
10	29,70
11	24,00
12	15,33

^a Les valeurs représentent les moyennes des répétitions.

L'examen du **tableau 08** indique que les réponses obtenues en termes d'activité amylolytique, estimées par la méthode DNS varient de 15,30 (Essai 5) à 182,3 UI/ml (Essai 4). Ce qui montre l'importance de cette étape dans la sélection des facteurs les plus influents. Cependant une analyse plus profonde sera utilisée afin d'évaluer l'effet de chaque facteur pour une réponse donnée.

L'effet des facteurs sur la réponse en terme d'activité amylolytique, a été évalué par la probabilité de signification ($P \leq 0,05$). Les résultats de l'analyse de variance (ANOVA) montrent que parmi les huit facteurs testés par le plan de criblage seul l'amidon ($P = 0,000$), le tryptone ($P = 0,005$) et le pH ($P = 0,004$) ont une influence significative au niveau de probabilité $P \leq 0,05$ (**Tableau 09 et la figure 16**). Ces résultats montrent aussi que ces facteurs exercent un effet positif sur la production enzymatique. A partir de ces résultats l'amidon, le tryptone et le pH sont retenus pour l'étude d'optimisation.

Tous les autres facteurs (Temps, température, CaCl₂, MgCl₂ et le KH₂PO₄) ont montré des valeurs de p supérieures à 0,05 et sont alors considérés comme facteurs ayant des effets non significatifs sur l'activité amylolytique.

Compte tenu des résultats obtenus et après exclusion des variables non significatives (valeurs de P > 0,05), l'équation de l'effet des variables sur la production d'amylases s'écrit comme suite :

$$(Eq. 3): Y = -48,9 + 5,393 C + 5,65413 D + 1,320 E$$

Où C = pH, D = amidon et E = tryptone.

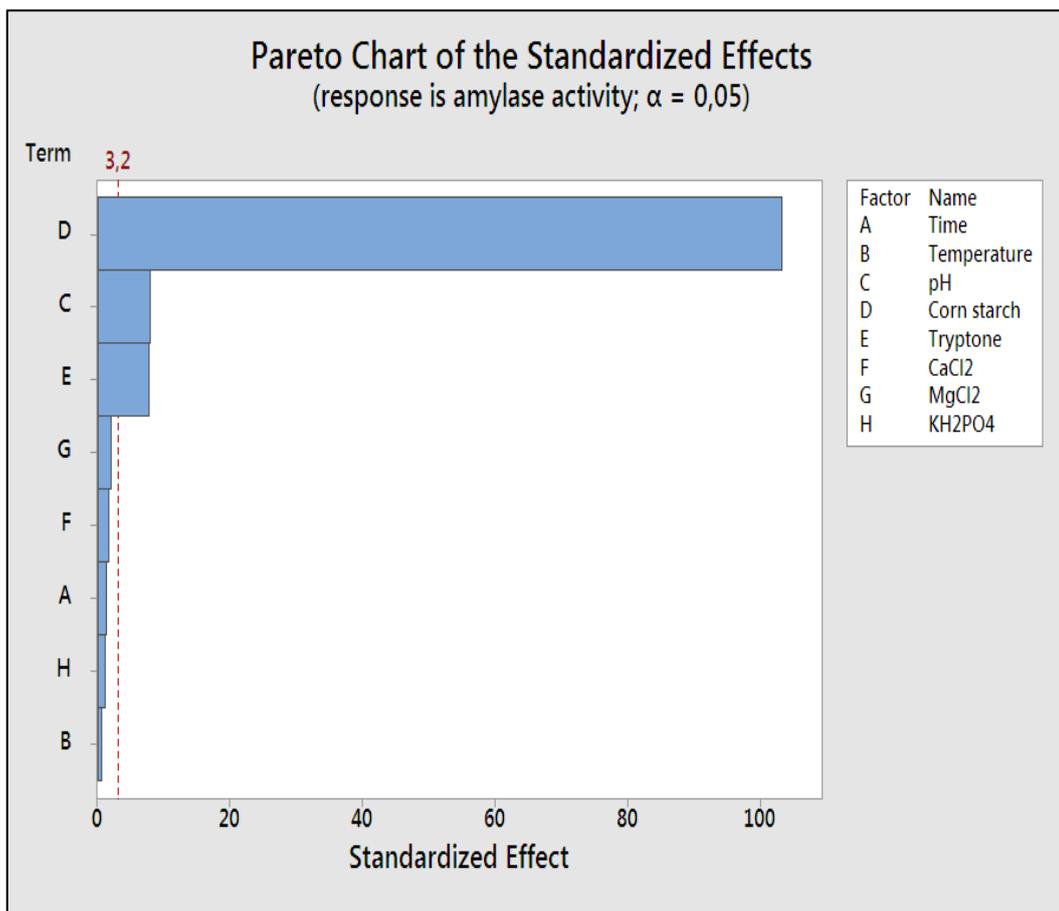


Figure 16 : Diagramme de Pareto montrons l'effet standard de chaque facteur.

Tableau 09 : Effets estimés et les Coefficients de différents facteurs sur la réponse.

Terme	Coefficient	Probabilité de signification ($P \leq \alpha = 0,05$)
Temps	0,623	0,266
Température	0,172	0,575
pH	5,393	0,004
Amidon	5,6541	0,000
Tryptone	1,320	0,005
CaCl ₂	4,84	0,175
MgCl ₂	5,46	0,140
KH ₂ PO ₄	1,64	0,318

Les résultats obtenus sont en accord avec divers travaux scientifiques indiquant que l'amidon et les sources d'azote sont nécessaire pour l'induction de la production d'amylases (**Prajapati et al., 2015; Ait Kaki El Hade El-Okki et al., 2017; et Trabelsi et al. 2019**). De plus, la synthèse de l'amylase extracellulaire par l'*A. keratinilytica* Cpt29 est également affectée par le pH du milieu, des résultats similaires ont été obtenus par **Oussadi et Kitouni (2015) et Bandal et al. (2021)**.

Par ailleurs, le niveau des facteurs significatifs avec un effet positif sera ultérieurement optimisé par RSM en utilisant le plan de Box-Behnken tandis que les variables à effet positif sur l'activité (Temps, température,) seront maintenues constantes à un niveau supérieur (+) alors que les variables ayant un effet négatif sur l'activité (CaCl₂, MgCl₂, temps, température, et KH₂PO₄) seront maintenues à leurs niveau inférieur (-).

1.2.2.2. Détermination des optima par le plan Box-Behnken

Dans le but d'optimiser la réponse en terme d'activité amylolytique les facteurs sélectionnés significativement influents par le plan de Plackett et Burman, sont utilisés dans le plan d'optimisation. Ce dernier a été généré à travers un plan de Box-Behnken avec 15 expériences (3 facteurs à 3 niveaux) (**Tableau 07**). Les différents niveaux des variables figurent dans le

tableau 06. Les valeurs observées et prédites des activités amylasique, obtenues par le plan Box- Behnken sont présentés dans le **tableau 10**.

Tableau 10 : Valeurs observées et prédites des activités amylasique, obtenues par le plan Box- Behnken.

Expériences	Activité amylasique Observée (UI/ml) ^a	Activité amylasique Prédite (UI/ml) ^a
1	171,31	171,61
2	189,07	188,71
3	171,42	170,62
4	182,28	182,13
5	173,03	173,32
6	177,03	177,65
7	168,28	168,44
8	172,37	173,30
9	171,35	170,41
10	188,67	188,71
11	176,13	175,81
12	188,40	188,71
13	176,00	176,79
14	187,36	186,73
15	183,30	183,44

^a Les valeurs représentent les moyennes de trois répétitions.

Une analyse de régression multiple a été appliquée sur les données expérimentales (**Tableau 11**) et une équation polynomiale du second degré (Eq.3) a été déterminée pour évaluer la production d'amylases par la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt 29:

$$(Eq. 3): Y= 144.7 + 8,129 A+ 60,21 C - 0,131 A^2 - 0,121 B^2 - 4.282$$

Où, Y est l'activité amylasique (UI/ml), A, B et C sont respectivement l'amidon (g/l), tryptone (g/l) et le pH.

Tableau 11 : Tous les coefficients de régression estimés pour la réponse (Y).

Terme	Coefficient	Probabilité de signification ($P \leq \alpha = 0,05$)
A	8,129	0,000
B	2,300	0,194
C	60,207	0,002
AB	0.000	0,992
AC	-0,049	0,343
BC	-0,074	0,551
A ²	-0,131	0,000
B ²	-0,121	0,010
C ²	-4,282	0,000

$R^2 = 0,9943$, $R^2 \text{ adj} = 0,9841$, $R^2 \text{ pred} = 0,9131$.

Les résultats d'analyse de variance (**Tableau 11**) montrent que les effets linéaires des variables (tryptone et pH), ainsi que les termes quadratiques (X_i^2) des différents facteurs sont importants et influencent significativement la production d'amylases par la souche utilisée. Par contre l'amidon et les interactions entre les différents paramètres n'ont aucun effet significatif sur la production de cette enzyme.

Le coefficient de détermination (R^2) du modèle ajusté à 98% (**Tableau 11**) testant l'ajustement du modèle montre que le modèle quadratique explique parfaitement le phénomène étudié. Aussi le coefficient de Fisher très significatif ($F_{0,95} = 3.58 \lll 97.08$) avec un coefficient de détermination élevé ($R^2 = 99\%$), confirment la validité de ce modèle (Tableau 12). Ainsi, ce modèle confirme la forte relation qui existe entre la production de l'amylase et les variables sélectionnées.

Tableau 12 : ANOVA du modèle obtenu par le plan Box- Behnken (Eq. 3).

Source	DL	SC	CM	F	P
Régression	9	758,68	84,30	97,10	0,000
Linéaire	3	85,96	101,04	116,37	0,000
Carré	3	671,42	223,81	257,75	0,000
Erreur résiduelle	5	4,34	0,87		
Manque d'ajustement	3	7,11	1,37	12.1	0,077 > $\alpha = 0,05$
Erreur pure	2	0,23	0,114		
Total	14	763			

DL: degree of freedom. SC: Somme des carrés. CM: Carré moyen. F : coefficient de Fisher. P : Probabilité de signification au niveau de confiance égale à 95%.

- **Tracés des surfaces de réponse (RSM)**

Des tracés de surface de réponse ont été utilisés pour illustrer les interactions entre les paramètres sélectionnés (Amidon, tryptone et pH) et leurs effets sur la production d'amylase, en maintenant une variable fixée à son meilleur niveau et en modifiant les deux autres paramètres.

La **figure 17** a, b représente le graphe tridimensionnel et le contour plot de l'activité amylasique montrant l'interaction entre l'amidon et la tryptone.

La **figure 18** a, b représente le graphe tridimensionnel et le contour plot de l'activité amylasique montrant l'interaction entre la tryptone et le pH.

La **figure 19** a, b représente le graphe tridimensionnel et le contour plot de l'activité amylasique montrant l'interaction entre l'amidon et le pH.

Ces différentes représentations graphiques fournissent une interprétation visuelle de l'interaction entre chaque deux facteur et elle permet ainsi de déterminer les niveaux optimaux

de chaque variable pour une activité enzymatique maximale. La forme concave de la surface de réponse, indique que nous pouvons trouver une valeur optimale pour la réponse dans la gamme des variables étudiées, ce qui est due à la signification statistique des effets quadratiques de ces variables.

Sur la base des représentations graphiques obtenues on peut voir que toutes les surfaces de réponse pour la production d'amylase sont caractérisées par des pics clairs ce qui indiquent que les réponses optimales se situent dans les limites supérieures de la conception. Une augmentation de la production amylosique est enregistrée aux niveaux moyens des deux facteurs. Une réduction de l'activité enzymatique est observée avec toute diminution ou augmentation des deux facteurs.

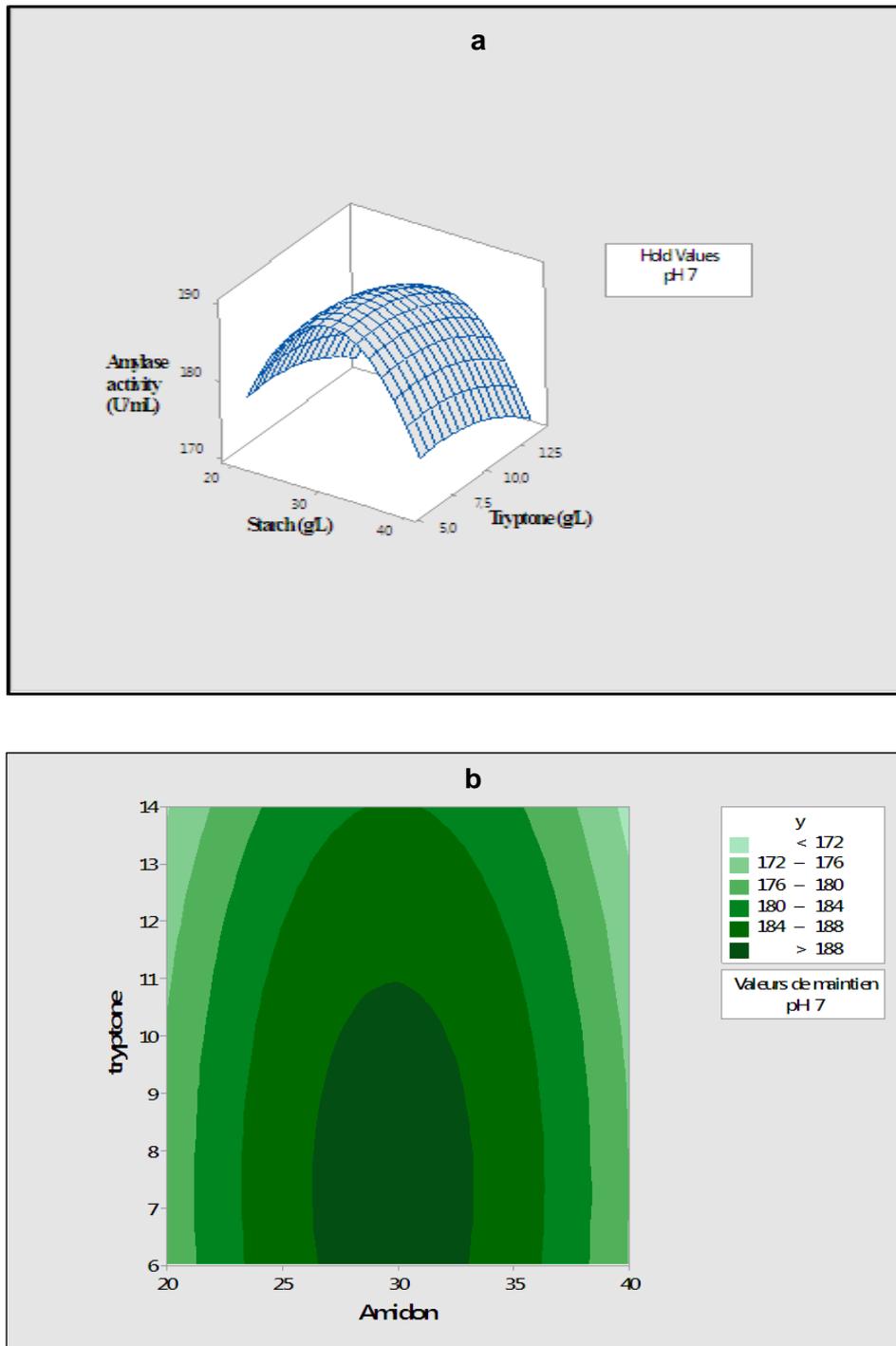


Figure 17 : Tracé des surfaces de réponse (a) et le contour plot (b) montrant l'interaction entre l'amidon et la tryptone.

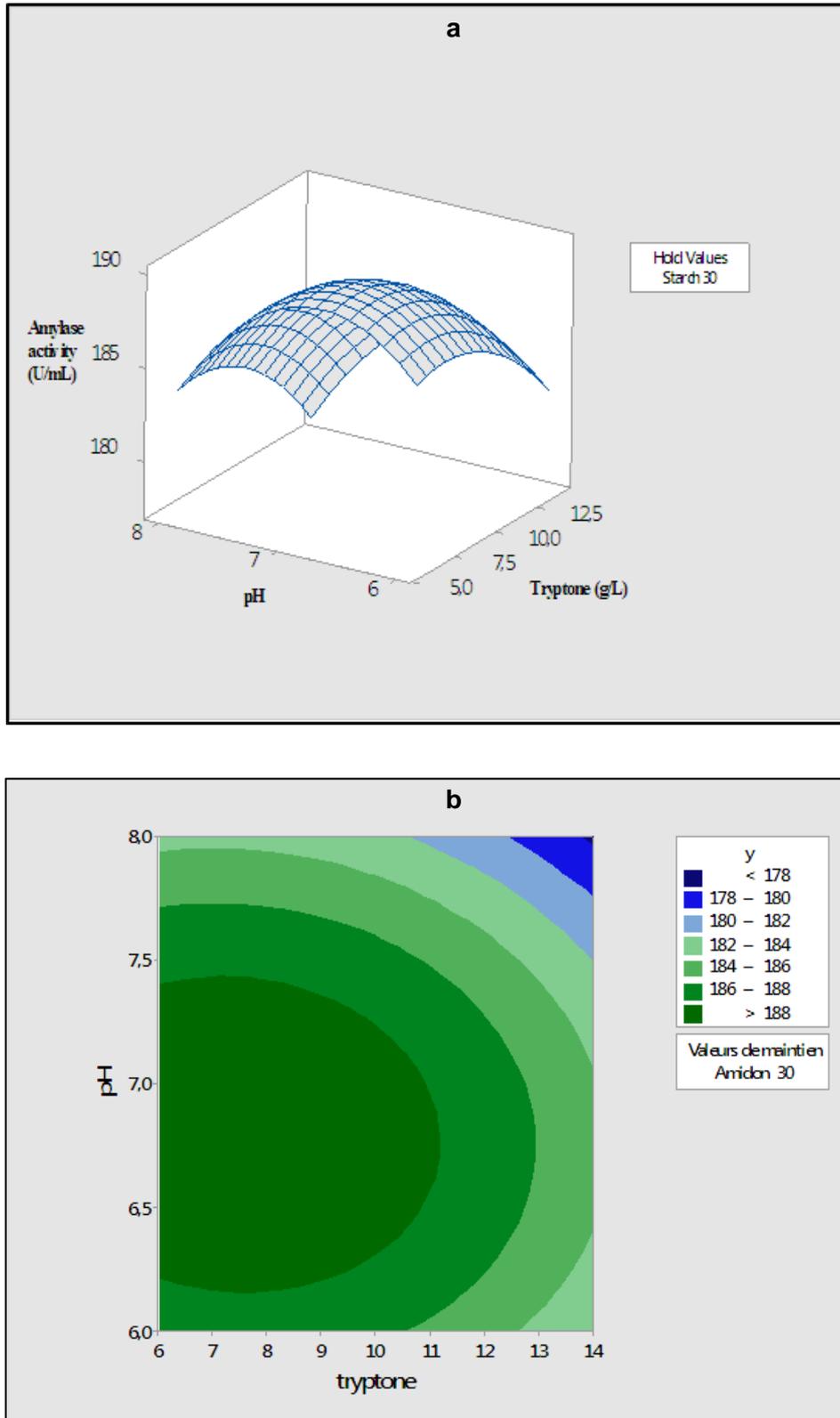


Figure 18 : Tracé des surfaces de réponse (a) et le contour plot (b) montrant l'interaction entre la tryptone et pH.

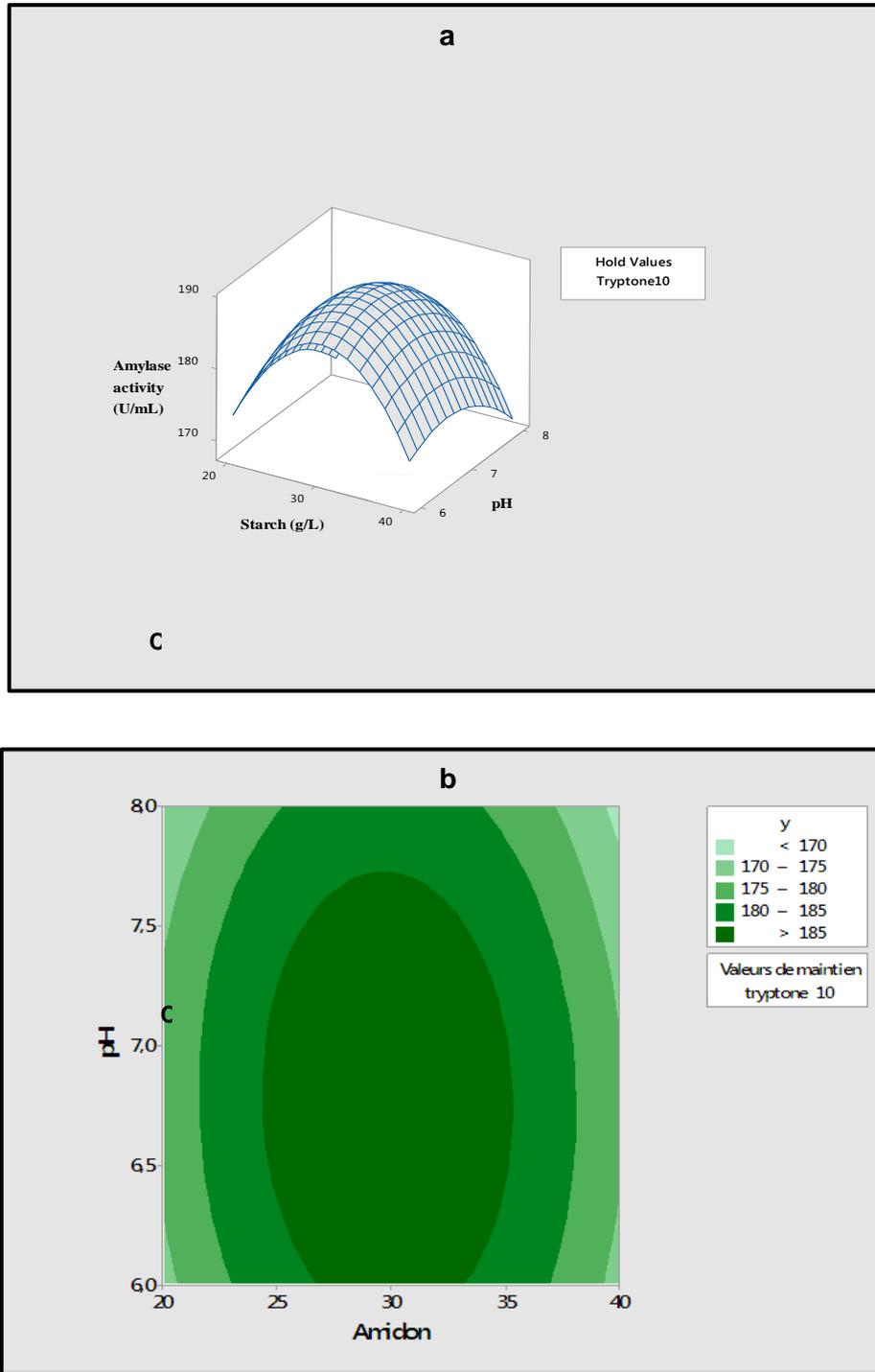


Figure 19 : Tracé des surfaces de réponse (a) et le contour plot (b) montrant l'interaction entre l'amidon et pH.

- **La validation de la conception expérimentale**

Afin de déterminer la précision du modèle et de confirmer les résultats d'optimisation, une expérience a été réalisée dans les conditions optimales de la culture prédites par le modèle (**Figure 20**) : une concentration d'amidon de 29,9 g/l, 7,4 g/l de tryptone, 1 g/l de KH_2PO_4 , une température de 45°C, un pH de 6.8 et un temps de culture 5 jours. Lors de ces conditions, la valeur optimale de production de l'amylase par *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 a atteint 192,27 UI/ml. Ce qui est en étroite accord avec la valeur prédite par le modèle statistique, qui évalue l'activité amylolytique à 189,76 UI/ml. La bonne concordance entre la valeur prédite et la valeur expérimentale confirme la validité du modèle et son haut degré de similitude indique que la méthodologie de surface de réponse est un outil d'optimisation puissant.

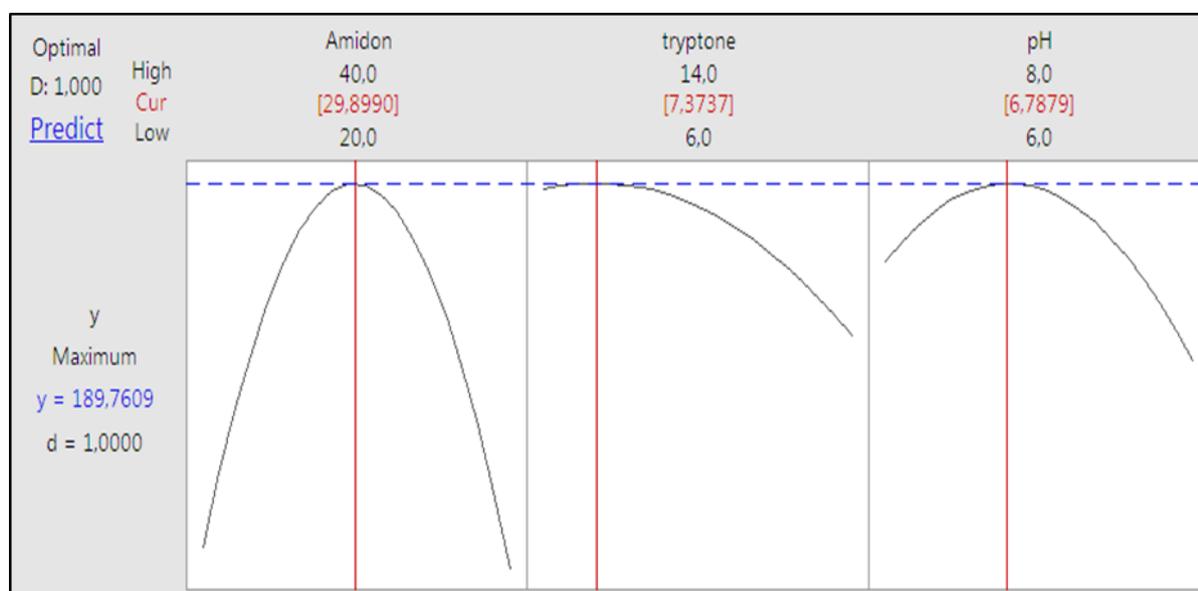


Figure 20 : Diagramme d'optimisation montrant l'effet de l'amidon, tryptone et le pH sur la production d'amylase.

Les résultats obtenus dans ce travail de recherche indiquent que la RSM est une méthode fiable pour développer le modèle d'optimisation des facteurs avec analyse des interactions. Cela améliore considérablement le rendement de la production avec un gain de temps.

La comparaison des activités avant et après optimisation donnent une augmentation d'activité allant de 50 UI /ml à 192,27 UI/ml, soit un ordre de grandeur de 3,84 fois. Il est à noter que des travaux de recherche **Khusro et al. (2017)** et **Xu et al. (2019)** sur l'optimisation de production d'amylases chez la souche *Bacillus* sp. et *Bacillus amyloliquefaciens* par plan

d'expériences donne des augmentations de 1,5 fois et 1,28 fois respectivement. Ces niveaux de production restent largement plus faibles par rapport à celles de la Cp29.

La bonne concordance entre la valeur prédite et la valeur expérimentale confirme la validité du modèle et son haut degré de similitude indique que la méthodologie de surface de réponse est un outil d'optimisation puissant.

Conclusion:

Dans cette première partie de thèse, l'étude de l'optimisation de la production d'amylases par plan d'expériences chez une souche autochtone *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 a permis d'une part de mettre en évidence deux activités enzymatiques, une amylase et une pullulanase et d'autre part d'optimiser la production de ce mélange sous forme d'un extrait brut par méthode de plan d'expériences. Ainsi, l'amidon de maïs à 29,9 g/l, le tryptone à 7,4 g/l, le KH_2PO_4 1 g/l, une température de 45°C, un pH de 6.8 et un temps de culture de 5 jours sont retenus pour la production de l'enzyme (conditions optimales). Les investigations montrent que la valeur prédite de la production est de l'ordre de 189,76 UI/ml et 192,27 UI/ml pour la valeur expérimentale ce qui est convenable. Ce modèle mathématique a permis donc d'augmenter le niveau de production qui passe de 50 UI/ml à 192,27 UI/ml, soit un facteur de l'ordre de 3,79 fois ce qui est relativement considérable. Le niveau de production obtenu avec cette méthode est compétitif aux autres souches productrices d'enzymes amylolytiques.

Partie 2: Extraction, purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application de l'amylase dans la détergence.

2.1. Purification et caractérisation biochimiques des amylases

2.1.1. Purification

Dans cette deuxième partie de thèse, nous nous sommes intéressés à la purification, la caractérisation biochimique, l'immobilisation et en fin à une application de l'amylase dans le domaine biotechnologique en l'occurrence la détergence.

Afin de purifier les amylases extracellulaires produites par la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29, une culture sur milieu optimisé a été réalisée. Après une incubation de 5 jours à 45°C, l'extrait enzymatique brut a été récupéré par centrifugation et filtration.

Ainsi, La purification est effectuée en deux étapes sur un extrait brut (précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium et chromatographie sur gel de filtration (Sephadex G-75). Les résultats obtenus sont illustrés par la **figure 21**. L'analyse du profil d'élution chromatographique de l'extrait enzymatique sur gel filtration G-75 (**Figure 21**) montre qu'il y a deux fractions protéiques absorbant à 280 nm avec une excellente séparation et dont l'activité amylolytique majoritaire est éluée dans le deuxième pic avec un volume d'élution (Ve) de 64,5 ml (entre la fraction 35 à 43). Par contre le premier pic avec un volume d'élution (Ve) de 45,5 ml correspond aux protéines contaminantes. En revanche aucune activité amylolytique n'a été détectée dans le deuxième pic. Cette technique a donc permis d'éliminer une bonne fraction d'impureté de l'enzyme se trouvant dans le premier pic. En ce qui concerne le fractionnement des pullulanases, il est à remarquer qu'aucune activité pullulanasiqque n'a pu être descellée sur le profil chromatographique. Ce résultat pourrait être lié à la faible activité de cette enzyme suite aux dilutions effectuées par la technique de chromatographie sur G-75. Probablement une lyophilisation de chaque fraction obtenue après chromatographie pourrait mettre en évidence cette activité qui existe dans l'extrait brut.

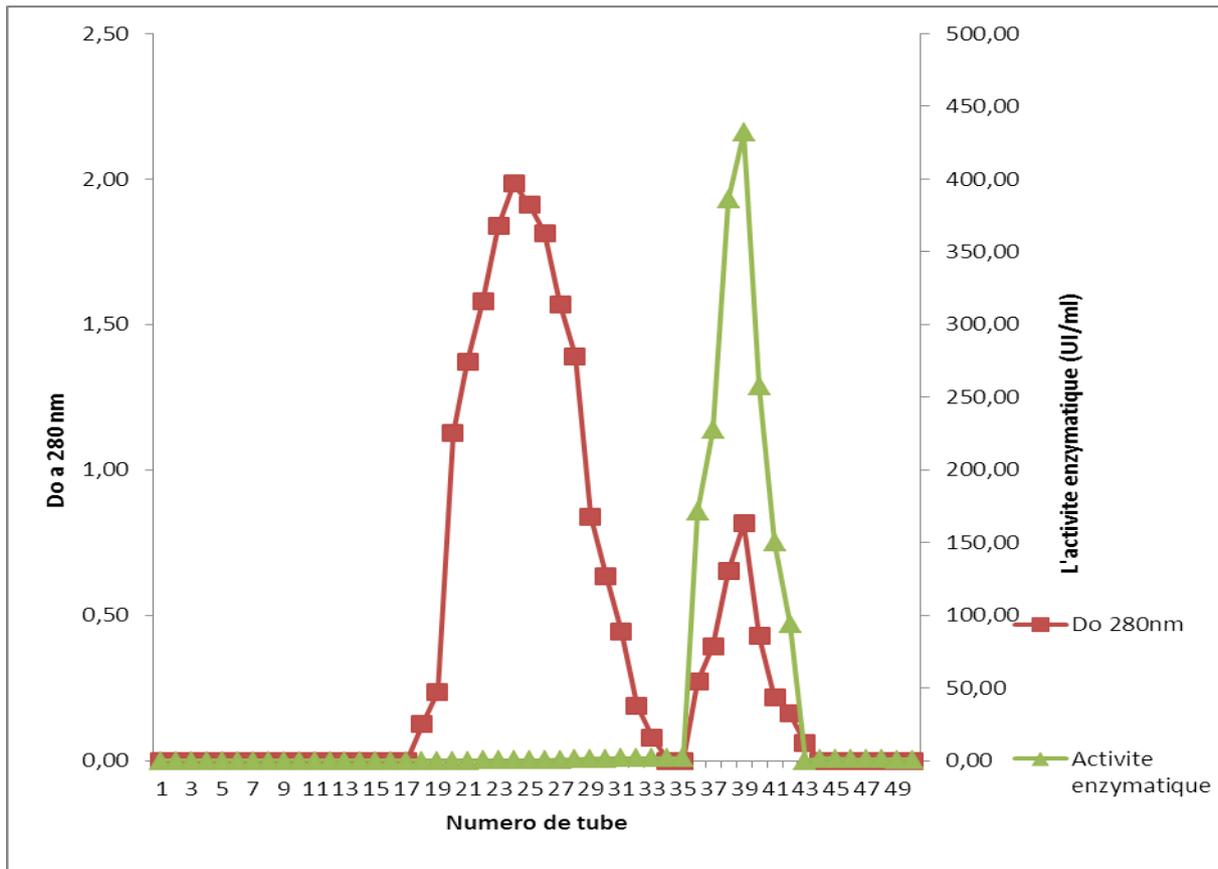


Figure 21 : Profil d'élution de l'activité amylolytique sur gel de filtration Sephadex G-75.

Parallèlement, un tableau de purification est effectué et cela pour suivre l'évolution de l'activité spécifique (AS) au cours de chaque étape de purification qui normalement doit augmenter d'une étape de purification à une autre (**Tableau 13**). Ainsi, l'examen du tableau de purification montre que la précipitation fractionnée des protéines au sulfate d'ammonium a permis la précipitation de l' α -amylase et de pullulanase par des concentrations de 40-60% et de 80% de sulfate d'ammonium respectivement et permettant d'atteindre une activité spécifique 2,38 fois plus élevée que celle de l'extrait brut avec un rendement de 24,61% pour l' α -amylase et une activité spécifique 1,61 fois plus élevée que celle de l'extrait brut et avec un rendement de 25,82% pour la pullulanase, ce qui indique que l'utilisation du sulfate d'ammonium est adéquate pour la précipitation d'amylases. Le tableau montre également que l'activité spécifique a augmenté après purification par chromatographie sur gel filtration jusqu'à 863,62 UI/mg avec un facteur de purification de l'ordre de 6,17. Toutefois, pour obtenir une enzyme totalement pure, il y a lieu d'une part procéder à une autre technique chromatographique tel que la chromatographie d'échange d'ions en mode HPLC et d'autre part, contrôler la pureté par électrophorèse pour évaluer techniquement la pureté de l'enzyme.

Par ailleurs du point de vue applications industrielles, souvent il est plus judicieux d'utiliser l'enzyme brute car cela plus économique.

Tableau 13 : Bilan de purification d'amylases.

Etape de purification	Enzyme	Activité totale (UI)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UI/mg)	Rendement d'activité (%)	Facteur de purification
Surnageant brut	α -amylase	28840,5	206,25	139,83	100	1
	pullulanase	3676,6	206,25	17,45	100	1
Précipitation fractionnée au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -dialyse	α -amylase (40-60%)	7098,9	21,3	333,33	24,61	2,38
	pullulanase (80%)	949,6	33,6	28,25	25,82	1,61
Sephadex G-75	α -amylase	1727,25	2	863,62	5,98	6,17
	pullulanase	Non détectée	Non détectée	Non détectée	Non détectée	Non détectée

Parallèlement à ce protocole de purification, une électrophorèse en conditions dénaturantes (PAGE-SDS) et un zymogramme sont effectués et cela a pour objectif à la fois de d'évaluer la pureté de l'enzyme, de localiser l'activité amylolytique sous forme de zymogramme et calculer la masse molaire relative (M_r) de l'enzyme. Les différents résultats sont représentés par le diagramme électrophorétique (**Figure 22**). L'examen de la figure montre que sur la piste M (Marqueurs de taille) font apparaitre 10 bandes avec une bonne qualité de séparation et les tailles sont situées entre 10 et 170 kDa. Sur la piste 1, le dépôt correspondant au dialysat, on observe au moins 14 bandes (protéines) relativement bien séparées. Sur la piste 2, une seule bande de protéine qui correspond à l'amylase purifiée par chromatographie d'exclusion-diffusion. Cette bande située entre 40 et 55 kDa est de couleur bleue intense ce qui montre la concentration de l'enzyme.

En ce qui concerne le zymogramme effectué, il est à remarquer qu'aucune zone d'hydrolyse (halos) de l'amidon par rapport à la bande correspondante à l'enzyme n'a été observée ce qui limite la fiabilité du résultat. Ce zymogramme est donc non exploitable. Les pullulanases

présentes également dans l'extrait brut n'ont pu être détectées ni par chromatographie ni par électrophorèse et cela est probablement lié à une faible activité pullulansique.

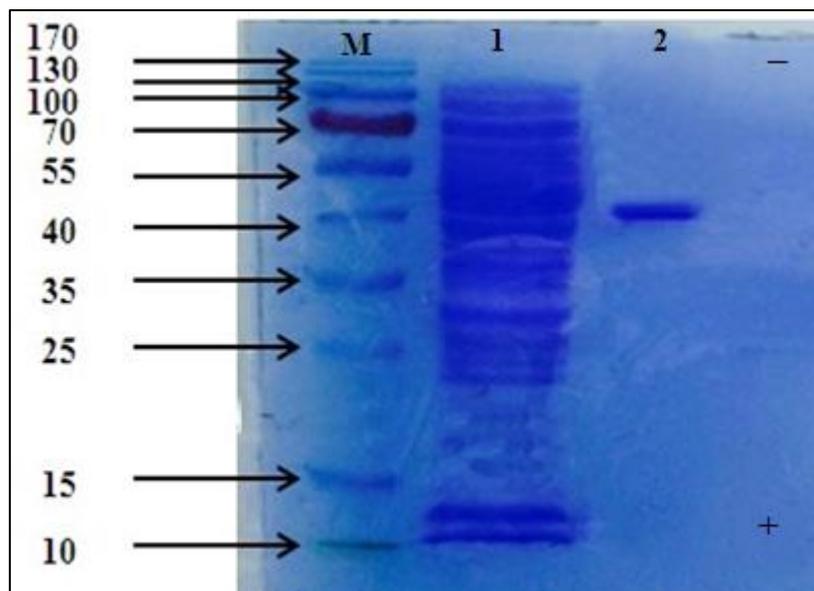


Figure 22: Electrophorèse des protéines en PAGE- SDS colorée au bleu de Coomassie. Piste M: marqueurs de taille marqueur (en kDaltons). 1: l'enzyme brute (dialysat). 2: l'enzyme après purification.

2.1.2. Caractérisation de l'enzyme purifiée

2.1.2.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité

Dans cette partie de travail de recherche, nous étudions d'une part l'effet du pH sur l'activité enzymatique et d'autre part sa stabilité vis à vis le pH. Ainsi, l'étude de l'effet du pH sur l'activité montre que l' α -amylase de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 est active sur une large gamme de pH allant de 6-12 (**Figure 23**) ce qui est très intéressant sur le plan biotechnologique.

L'examen de la courbe (**Figure 23**) indique que l'activité amylolytique maximale (100%) est atteinte à pH 8 (pH optimal), cependant l'activité reste importante en maintenant 73, 92, 94, 92, 81 et 71% de sa valeur initiale a un pH de 6, 7, 9, 10, 11 et 12 respectivement. Il est remarqué qu'à pH 12, l'amylase perd seulement 60 % d'activité ce qui est très intéressant notamment dans le domaine de la détergence utilisant souvent la soude dans la composition des détergents commerciaux.

L'analyse de cette étude par rapport aux données bibliographiques montre que le pH optimal observé est supérieur à celui des amylases produites par d'autres souches d'actinomycètes

appartenant au genre *Streptomyces* thermophiles tels que: la *Streptomyces* MSC702 et la *Streptomyces fragilis* DA7-7 qui ont un pH optimum de 5 et 6 respectivement (Singh et al., 2014; Nithya et al., 2017). Par ailleurs, on constate que la majorité des amylases microbiennes arrive à atteindre une activité maximale dans un intervalle de pH qui varie de 7.0 à 8.0 et cela est observé avec l'amylase de la souche *Geobacillus jabois* Nov (Ulya et al., 2019) et *Bacillus subtilis* N8 (Arabaci et Arıkan, 2018) qui ont un pH optimum de 8.0, l'amylase de la souche *bacterium Pontibacillus* sp. ZY (Fang et al., 2019) et *Halomonas meridiana* (Coronado et al., 2000) qui ont un pH optimum de 7.5 et 7 respectivement. Ce travail de recherche indique également que nos résultats sont plutôt proches des autres souches qui n'appartiennent pas à la classe des actinomycètes ce qui est assez surprenant. On note aussi, que dans le genre *Actinomadura*, aucune référence bibliographique n'a été signalée à notre connaissance. En conséquence, le choix de l'étude de la production des amylases chez le genre *Actinomadura* est à encourager pour diversifier les sources d'enzymes ayant des applications aussi bien industrielles qu'agro-alimentaires.

D'autres investigations bibliographiques montrent que certaines enzymes amylolytiques produites par les microorganismes ont un pH optimum en dehors de cette intervalle avec une activité maximale située à des pH légèrement acides tel que l'amylase de la souche *Geobacillus* K1C (Sudan et al., 2018). Ces enzymes acides sont plutôt utilisées comme additifs alimentaires alors que celle de la Cpt29 avec un pH alcalin pourrait avoir des applications dans le domaine de l'industrie de la détergence.

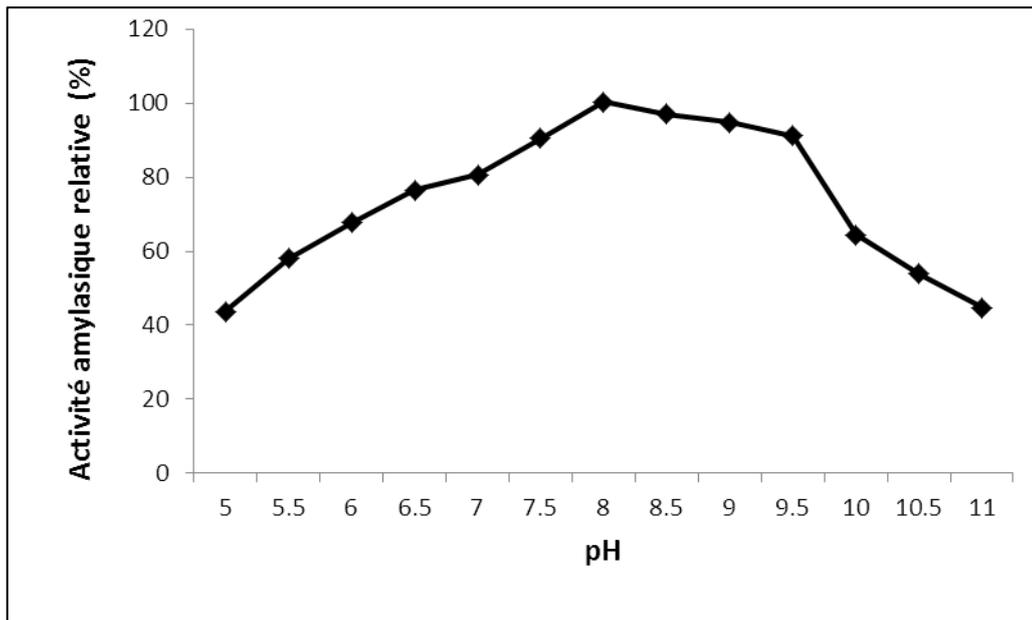


Figure 23: Détermination du pH optimum de l'α-amylase.

En ce qui concerne l'étude de la stabilité de l'enzyme vis à vis du pH, celle-ci est déterminée par une pré-incubation dans des tampons à différents pH pendant 3 h. Les activités amylolytiques résiduelles sont mesurées dans les conditions optimales de température et de pH de l'enzyme. Les différents résultats obtenus sont illustrés par la courbe (**Figure 24**). L'examen de cette dernière montre que l'enzyme est plus stable sur les pH basiques et neutres par rapport aux pH acides. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Arabaci et Arıkan (2018)** sur les souches : *Bacillus subtilis* N8 et **Allala et al. (2019)** sur la souche *Tepidimonas fonticaldi* strain HB23. Par ailleurs on remarque également que cette enzyme garde une stabilité à pH 12 et ne perd qu'approximativement 30% de son activité ce qui est considérable et un succès pour l'industrie. Cette caractéristique biochimique (stabilité vis à vis du pH) couplée au pH optimum alcalin, renforce d'avantage son utilisation dans de le domaine de la détergence (**Bandal et al., 2021**).

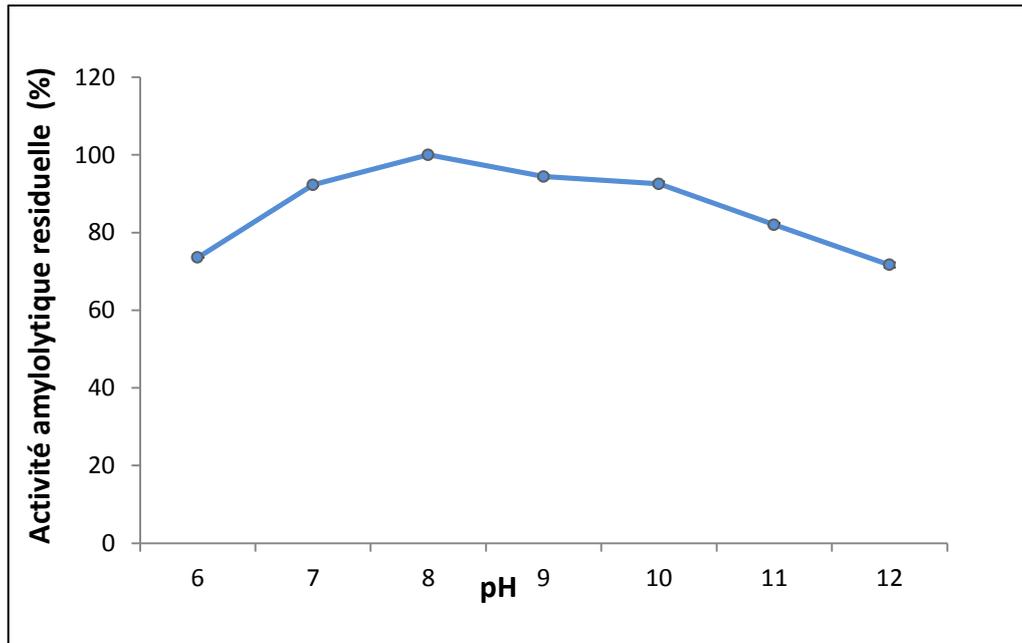


Figure 24: Effet du pH sur la stabilité de l'α-amylase.

2.1.2.2. Effet de la température sur l'activité et sur la stabilité

L'effet de la température sur l'activité de l'enzyme et sa stabilité est un facteur de choix pour son utilisation dans le domaine de l'industriel et c'est la raison pour laquelle nous avons pris en considération cette propriété biochimique.

En effet, l'étude de l'effet de la température sur l'activité α-amylasique est réalisée au pH optimum. A cet effet, des températures sélectionnées allant de 40 à 100°C sont testées et les différents résultats obtenus sont représentés par la **figure 25**. L'analyse de cette courbe montre que l'activité augmente avec la température et atteint son maximum à 70°C, et diminue brutalement à 40 et 100°C. Toutefois, l'amylase reste active sur une large gamme de températures comprises entre 60 et 90°C. On peut donc dire que cette nouvelle enzyme est thermostable est compatible avec son environnement où la Cpt29 est isolée du compost de poulet où les températures humides peuvent aller jusqu'à 100°C ce qui est justifié. En conséquence, cette caractéristique biochimique est souvent recherchée dans les industries travaillant à de hautes températures.

La comparaison de nos résultats à la bibliographie fait apparaître une similarité avec ceux obtenus chez certaines bactéries thermophiles: *Bacillus* IBT108 (Mahato et al., 2021), *Tepidimonas fonticaldi* HB23 (Allala et al., 2019).

Par ailleurs, des travaux de recherche sur les actinomycètes dont le genre *Streptomyces* ont rapporté que la température optimale pour l'activité α -amylasique de la *Streptomyces* MSC702 été de 55°C (Bano et al., 2011), 50°C pour la *Streptomyces* D1 (Chakraborty et al., 2009) et 45°C pour l' α -amylase de *Streptomyces gulbargensis* (Syed et al., 2009).

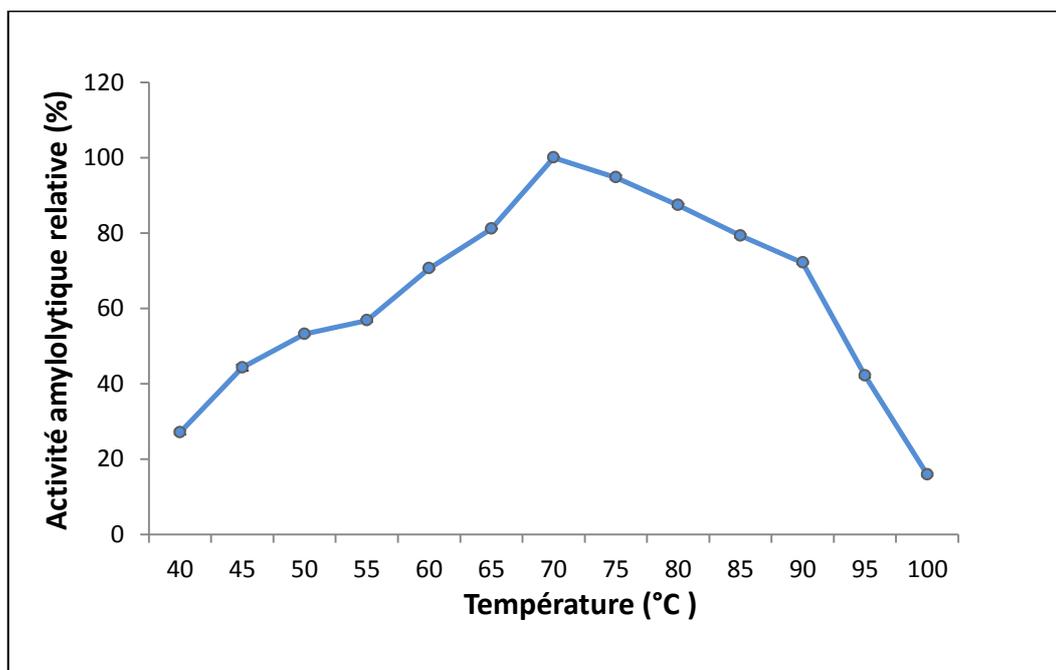


Figure 25: Effet de la température sur l'activité de l' α -amylase.

En ce qui concerne la stabilité de l' α -amylase vis-à-vis la dénaturation thermique, l'étude est effectuée en incubant cette enzyme à différentes températures et pendant différents temps, les températures testées sont en corrélation directe avec la température optimale, l'activité amylolytique résiduelle a été déterminée à pH 8 et à 70°C. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure 26**. L'étude comparative entre les différents traitements montre que l' α -amylase est stable à des températures élevées. L'enzyme maintient 50 % ($\frac{1}{2}$ vie) de son activité initiale, après incubation de 90 min à 90°C, 120 min à 80°C et 70°C pour une demi-vie supérieure à 180 min. D'après ces résultats, il apparaît que l' α -amylase produite par l'*Actinomadura keratinilytica* Cpt29 est thermostable et potentiellement utile dans les processus biocatalytiques opérant à haute température notamment dans le domaine de la détergence. Ces résultats corroborent avec ceux de Yasser Abdel-Fattah sur l' α -Amylase de la souche *Bacillus licheniformis* AI20, cette dernière est active à des températures comprises entre 70 et 80°C, avec une activité optimale entre 60 et 80°C (Abdel-Fattah et al., 2013).

Chez les actinomycètes thermophiles producteurs d'amylases thermostables on note quelques travaux de recherches (Kaneko *et al.*, 2005; Chakraborty *et al.*, 2009; Nithya *et al.*, 2017).

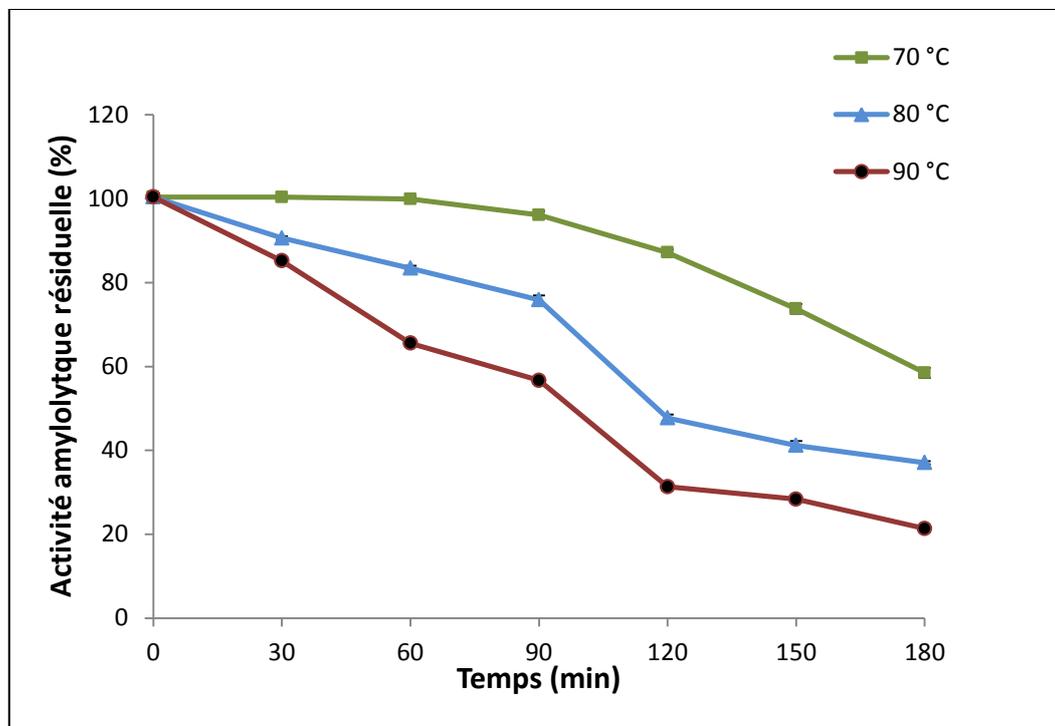


Figure 26: Effet de la température sur la stabilité de l'α-amylase.

2.1.2.3. Détermination de la masse molaire relative (Mr)

Dans le but d'analyser l'homogénéité et de déterminer la masse moléculaire de l'amylase purifiée, une électrophorèse en PAGE-SDS a été réalisée. Le résultat obtenu figure sur le diagramme électrophorétique déjà présenté (**Figure 22**) page 47. La bande protéique visualisée correspond à l'amylase (piste 2) et dont la masse molaire est calculée en se rapportant à la courbe de calibrage $\text{Log } M_r = f(\text{distance en cm})$ (**Annexe n°02**). Ainsi, la valeur de la masse molaire obtenue est de l'ordre 40,28 kDa.

La comparaison de ce résultat aux différents travaux de recherche montre que cette masse moléculaire est comparable à celles précédemment rapportées pour d'autres amylases provenant des actinomycètes telles que les souches *Streptomyces erumpens* MTCC 7317, *Streptomyces gancidicus* ASD et *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 qui ont une masse molaire de 54,5 kDa, 44kDa et 44 kDa respectivement (**Kar et Ray, 2008 ; Ashwini et Shanmugam,**

2019 ; Al-Dhabi et al., 2020). On note que les résultats obtenus sont relativement proches aux amylases produites par quelques souches d'actinomycètes thermophiles tels que : *Streptomyces* sp. E-2248 avec une taille de 47 kDa et la souche *Streptomyces fragilis* DA7-7 avec une Mr de 51 kDa (Kaneko et al., 2005; Nithya et al., 2017).

Chez les autres bactéries en particulier le genre *Bacillus* qui est le plus étudié, les travaux de recherches indiquent que l'amylase de l'espèce *Tepidimonas fonticaldi* HB23 (Allala et al., 2019) a une taille moyenne de 48 kDa. De même que l'espèce *Bacillus subtilis* strain US586 (Trabelsi et al., 2019) secrète trois amylases de masses molaires de 66, 140 et 232 kDa.

2.1.2.4. Effets des ions métalliques, des inhibiteurs et de solvants organiques sur la stabilité enzymatique

Il est connu dans la littérature que beaucoup d'enzymes produites par les microorganismes sont sensibles aux ions métalliques, aux inhibiteurs et aux solvants organiques. Ainsi, pour caractériser cette enzyme nous sommes intéressés à ces données.

Les différentes investigations sur l'effet des ions métalliques figurent sur le **tableau 14**. L'analyse des résultats montre que seulement les ions Ca^{2+} (137%) et Mg^{2+} (126%) et le Mn^{2+} (117%) augmentent l'activité de l'amylase. En effet, les ions métalliques sont connus pour stabiliser et activer les enzymes, en particulier, les ions calcium qui ont une influence significative sur la structure, la fonction et la stabilité des amylases thermophiles (Liao et al., 2019). Cet effet bénéfique peut être expliqué par un changement conformationnel de la protéine qui permet une meilleure accessibilité du substrat au site actif ou une stabilisation de la structure de l'enzyme (Arabaci et Arikan, 2018). Nos résultats semblent corroborer à ceux obtenus par Abdulaal (2018), Trabelsi et al. (2019) et Matpan Bekler et al. (2020).

En ce qui concerne les autres ions métalliques, on note que les ions Co^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} , ont un effet plutôt légèrement inhibiteurs en se fixant sur les acides aminés du site catalytique (Wu et al., 2018 ; Farooq et al., 2021).

L'addition du chélateur EDTA, affecte légèrement le niveau d'activité et cela par complexations des ions calcium qui sont activateurs de l'amylase, ceci renforce son potentiel d'utilisation en tant qu'additif dans la détergence.

Aussi, l'activité enzymatique est stable en présence d'agents disulfure-réducteurs tels que : β -ME, SDS et faiblement inhibée par l'urée (**Tableau 14**) ceci suggère que les liaisons

disulfures ne sont pas essentielles au maintien de la conformation active de l' α -amylase de l'*Actinomadura keratinilytica* Cpt29. L'enzyme conserve également plus de 90% de son activité en présence de Tween 80 et de Triton X-100. Nos résultats sont en désaccord avec ceux de **Singh et al. (2014)**, qui ont rapporté une inactivation complète de l' α -amylase en présence d'EDTA, le Triton X-100 et le Tween 80 diminuent largement cette activité. Il a été également rapporté que l'activité d' α -amylase de *Pseudoalteromonas* sp. M175 est inhibée par la β -ME et le Tween 80 (**Wang et al., 2018**).

L'enzyme étudiée a également montré une tolérance élevée aux solvants organiques où elle a conservé plus de 65% de son activité d'origine en présence d'éthanol, d'acétone et de DMSO, des résultats similaires ont été obtenus par **Sudan et al. (2018)**.

Tableau 14 : Effets de divers ions métalliques, inhibiteurs, détergent et solvant organique sur l' α -amylase de l'*Actinomadura keratinilytica* Cpt29.

Groupe	Additifs	Concentration (mM)	Activité résiduelle *(%)
Témoin	-	-	100± 0.87
Ions métalliques	Ca ²⁺ (CaCl ₂)	5 mM	137,52± 0.97
	Co ²⁺ (CoCl ₂)	5 mM	84,81± 0.69
	Cu ²⁺ (CuCl ₂)	5 mM	74,60± 0.91
	Fe ²⁺ (FeCl ₂)	5 mM	89,62± 0.57
	Mg ²⁺ (MgCl ₂)	5 mM	126,84± 0.95
	Mn ²⁺ (MnCl ₂)	5 mM	117,84± 0.45
	Zn ²⁺ (ZnCl ₂)	5 mM	61,01± 0.26
Inhibiteurs	EDTA	10 mM	89,62± 1.14
	Urée	10 mM	67,35± 0.67
	β -Mercaptoethanol	10 mM	73,91± 0.23
Détergent	SDS	2%	86,64± 0.95
	Tween 80	10%	100± 0.73
	Triton X-100	2%	90,76± 0.52
Solvant organique	Acétone	10%	75,41± 0.57
	Ethanol	10%	71,10± 0.98
	DMSO	10%	94,03± 1.09

* Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions indépendantes. Les écart-types sont affichés.

2.1.2.5. Analyse des produits d'hydrolyse par CCM et mode d'action

Cette analyse est effectuée dans le but de mettre en évidence les produits de dégradation des polymères (amidon et pullulane) pour éventuellement mettre en évidence le mode d'action de l'enzyme. Ainsi, les différents résultats obtenus figurent sur le chromatogramme (**Figure 27**).

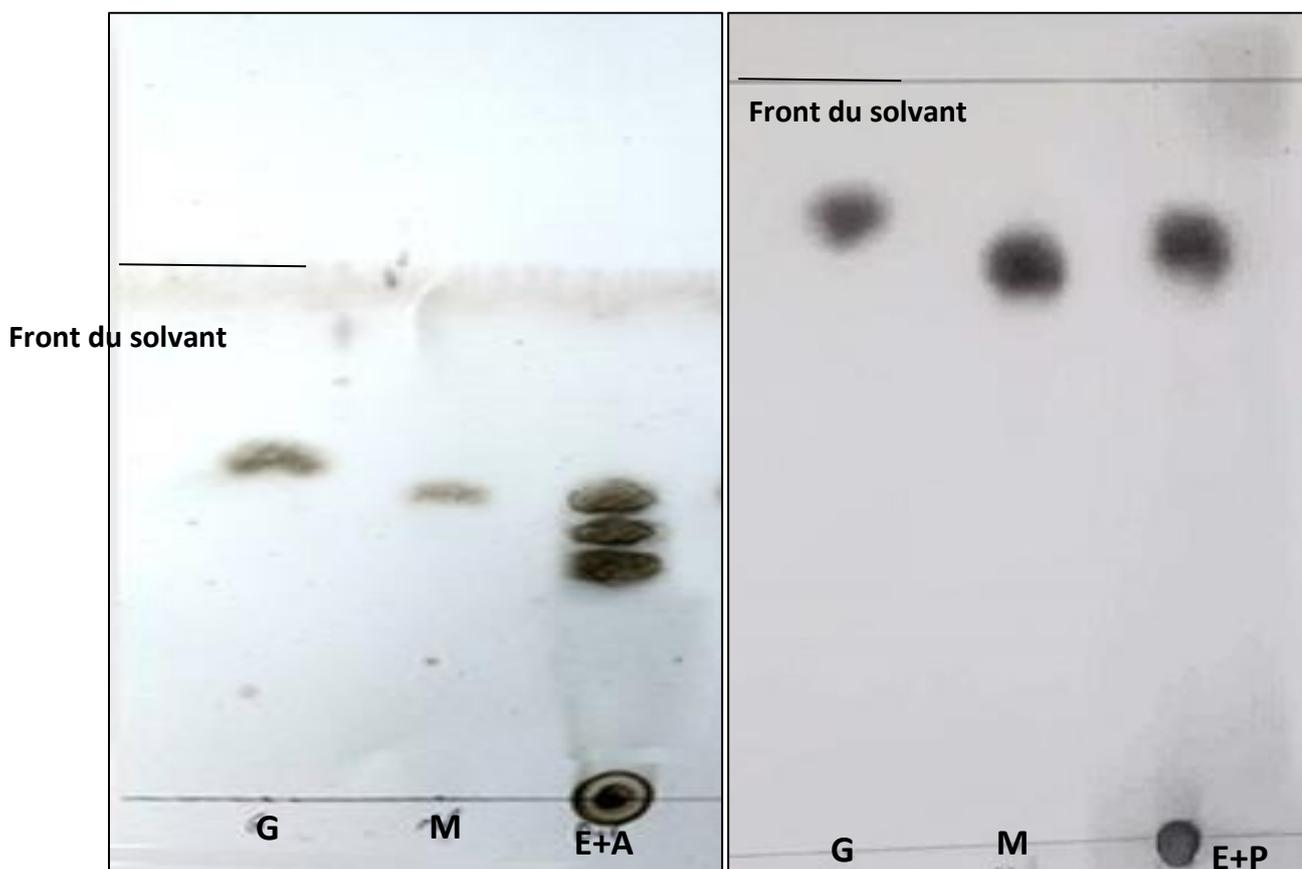


Figure 27: Analyse des composés d'hydrolyses enzymatiques de l'amidon et de pullulane par CCM

Témoin : Glucose (G) , Témoin. Maltose (M), Réaction : Enzyme + Amidon: (E+A),
Réaction :Enzyme + pullulane: (E+P)

L'examen du chromatogramme de la réaction enzymatique sur l'amidon (**Figure 27**) fait apparaître trois tâches dont la distance de migration est légèrement inférieure à celle du glucose (monomère) et proche à celle de Maltose (dimère). Le calcul des Rapports frontaux (Rf) des produits finaux sont de 0,66, 0,64, 0,62 pour le dépôt qui est différent du Rf du glucose 0,72 et il y a une tache qui est équivalente à celle du Maltose (0,66). Ce composé serait donc un dimère le maltose. On peut donc conclure que le produit final de la dégradation de l'amidon

est le maltose, et deux autres composés de masses molaires supérieures au maltose. Ainsi à défaut de témoins, ces deux oligomères de Rf 0,64 et Rf 0,62 seraient probablement un trimaire (maltotriose) et un tétramère. Ce mode d'attaque laisse penser qu'il s'agit d'une alpha-amylase avec une attaque au hasard de mécanisme "endo". En effet, les endo-enzymes sont connus pour attaquer le polymère à l'intérieur de la chaîne et libérer des oligomères de tailles plus élevées qui à leur tour seront dégradés par les exo-enzymes. Nos résultats sont similaires à ceux de (Madika et al., 2017; Timilsina et al., 2020; Maalej et al., 2021), qui ont travaillé sur le crabe bleu *Portunus segnis*, *Aeribacillus pallidus* BTPS-2 et la souche *Bacillus subtilis* RD4 respectivement et qui ont trouvé que le principal produit issu de l'amidon est le maltose. Par ailleurs, on remarque qu'au cours de cette attaque, le glucose n'apparaît pas sur le chromatogramme. Cette absence de glucose peut s'expliquer par les réactions de transfert (transférases) de l'unité glucose sur une autre chaîne avant 3 unités du branchement α -(1,6) (Inversion de walden) (Walden, 1896).

En ce qui concerne l'attaque du pullulane par l'extrait brut, le résultat obtenu est représenté par le chromatogramme (Figure 27). L'analyse de cette figure indique que seulement le maltose apparaît et aucun autre sucre n'apparaît dans le milieu réactionnel. La comparaison de nos résultats au schéma de (Bertoldo et Antaranikian, 2002) laisse penser qu'il s'agit probablement d'une amylopullulanase de type II (Nisha et al., 2013a). Toutefois, ce résultat reste très discutable car il y a lieu de purifier la pullulanase et étudier par la suite son mode d'action en cinétique.

2.2. Immobilisation de l'enzyme

L'utilisation des enzymes libres dans les bio-industries pose toujours un problème de stabilité et d'économie, d'où l'intérêt de procéder à leurs immobilisation pour d'une part les stabiliser et d'autre part les réutiliser à une échelle industrielle. Dans ce sens nous nous sommes intéressés à étudier l'immobilisation de cette enzyme sur un film de type (PVDF-co-HFP-NiO) et procéder à son évaluation : rendement, l'efficacité de la réutilisation de l'amylase immobilisée et enfin la détermination de quelques propriétés biochimiques de l'enzyme liée. Ainsi, suite aux différentes investigations, il en résulte que:

2.2.1. Rendement d'immobilisation

L'ors de l'immobilisation, le rendement d'activité et d'immobilisation doivent être élevé. Ainsi, un faible rendement d'immobilisation indique que le processus d'immobilisation est sans succès. L'activité de l'amylase dans les différentes fractions durant le processus de l'immobilisation ainsi que le rendement d'immobilisation sont représentées dans le **tableau 15**.

Tableau 15 : Activités de l' α -amylase dans les différentes fractions durant le processus de l'immobilisation.

Etape	Enzyme immobilisée	Enzyme libre	Enzyme dans l'eau de lavage	Rendement %
Activité amylasique (UI/ml)	310,43	473,26	128,47	90

L'examen du tableau montre que l'amylase est immobilisée sur le film membranaire PVDF-co-HFP-NiO avec un rendement d'immobilisation de 90%, ce qui montre que presque la totalité de l'enzyme est fixée par le support. Ce résultat indique donc que le choix du support en l'occurrence le PVDF-co-HFP-NiO ainsi que les conditions expérimentales d'immobilisation sont justifiés. Il est à remarquer aussi que l'ors de l'immobilisation, il y a une légère baisse de l'activité de l'activité et qui passe de 473.26 à 310.43 UI/ml, soit une perte de 35 %. Ce phénomène est connu chez les enzymes immobilisées.

2.2.2. Efficacité de la réutilisation de l'α-amylase immobilisée

En plus du calcul du rendement, nous avons également tenté de mesurer l'efficacité de la réutilisation de l'α-amylase immobilisée. Cet élément est un facteur de choix très important dans l'utilisation de l'enzyme immobilisée. Ainsi, la réutilisation de l'α-amylase immobilisée est étudiée jusqu'à 08 cycles (**Figure 28**) et cela pour une meilleure fiabilité des résultats. L'analyse de la courbe **figure 28** montre que l'α-amylase immobilisée conserve plus de 85% après six cycles. Au cours du 7^{ième} et 8^{ième} cycle on remarque qu'il y a une légère diminution de l'activité résiduelle pour des valeurs qui sont 74 et 56,64% respectivement.

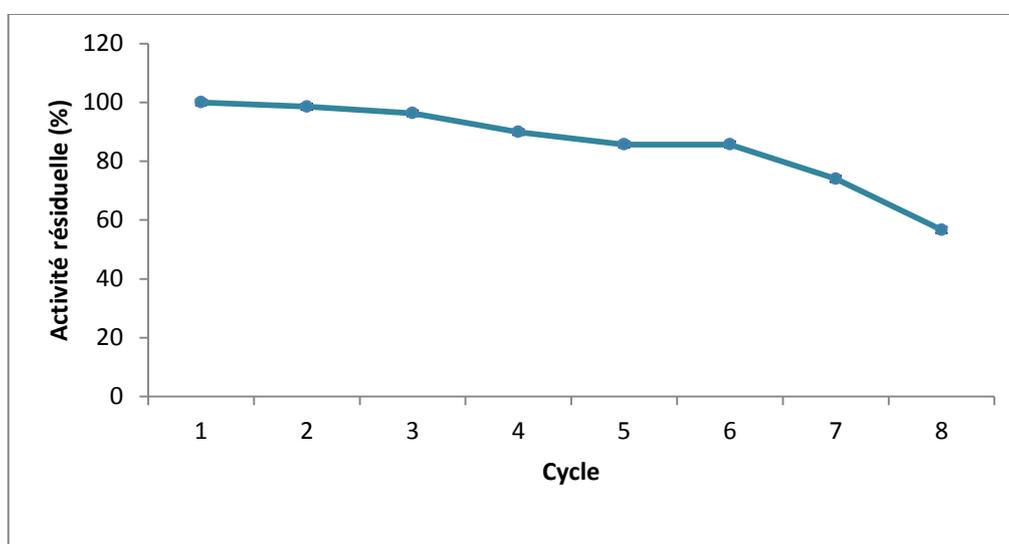


Figure 28 : Réutilisation de l'α-amylase immobilisée.

Ce résultat original est très intéressant car on note que le support (PVDF-co-HFP-NiO) utilisé pour l'immobilisation de l'α-amylase n'a jamais été testé à notre connaissance. Les différents travaux de recherches consultés mentionnent que l'α-amylase de la *B. Geobacillus* est TF14 immobilisée sur la résine Dowex et la chitine maintient son activité initiale après 15 cycles (**Keskin et Ertunga, 2017**). De même qu'on signale que l'α-amylase de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 immobilisée sur ce support est opérationnellement plus stable que d'autres amylases et c'est le cas de l'α-amylase de la *Streptomyces griseus* MTCC 3756 immobilisée sur l'alginate qui conserve seulement 40% de son activité initiale après 07 cycles (**Divya et al., 2014**). D'autres supports d'immobilisation (3-aminopropyl de silice) améliorent le rendement en activité de l'α-amylase de 75%, mais réduisent son recyclage, 5ème cycle (**Kumar et Khare, 2015**).

2.2.3. Propriétés biochimique de l'enzyme immobilisée et étude comparative à l'enzyme sous la forme libre

Après avoir immobilisé l'amylase extraite de la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 sur le support PVDF-co-HFP-NiO, nous nous sommes intéressés à quelques propriétés biochimiques de l'enzyme sous la forme liée (effet de la température et du pH sur l'activité et sur la stabilité) et également une étude comparative entre deux les formes libres et liées est abordée. Les résultats obtenus sont représentés sur les **figures 29, 30, 31** et **32**.

2.2.3.1. Effet de la température et du pH sur l'activité et sur la stabilité de l'amylase immobilisée

En ce qui concerne l'effet de la température sur l'activité de l'amylase immobilisée, les résultats obtenus sont représentés par la figure 29. L'examen de la courbe (**Figure 29**) montre que la température optimale de l'activité enzymatique s'est élevée et décalée à 75°C par rapport à la forme libre de l'enzyme, soit un gain de 5°C (**Figure 25**).

Pour ce qui est de la thermostabilité de l'amylase immobilisée à divers températures (70, 80 et 90°C), L'ensemble des courbes est représenté par la **figure 30**. L'analyse du graphe montre que, la stabilité thermique de l' α -amylase immobilisée à différentes températures (**Figure 30**) est supérieure à sa forme libre (**Figure 26**). Ainsi, aux températures 70, 80 les de demi-vie sont supérieure à 180 min et à 90 °C la demi vie est supérieur à 100 min.

Ces résultats indiquent que le film membranaire PVDF-co-HFP-NiO a un effet protecteur sur l'activité α -amylasique à des températures plus élevées. Le développement de nombreuses liaisons covalentes entre le support et l'enzyme réduit la flexibilité conformationnelle, les vibrations thermiques et la mobilité de l'enzyme, tout en empêchant également l'agrégation et le déploiement de la protéine enzymatique ce qui protège la protéine de la dénaturation thermique (**Gashtasbi et al., 2014; Antony et al., 2016**). En effet, dans les applications industrielle de l' α -amylase, il est important que l'enzyme immobilisée ait une bonne stabilité thermique (**Veesar et al., 2015**). Ce résultat semble concorder avec les travaux de (**Al-Najada et al., 2019**).

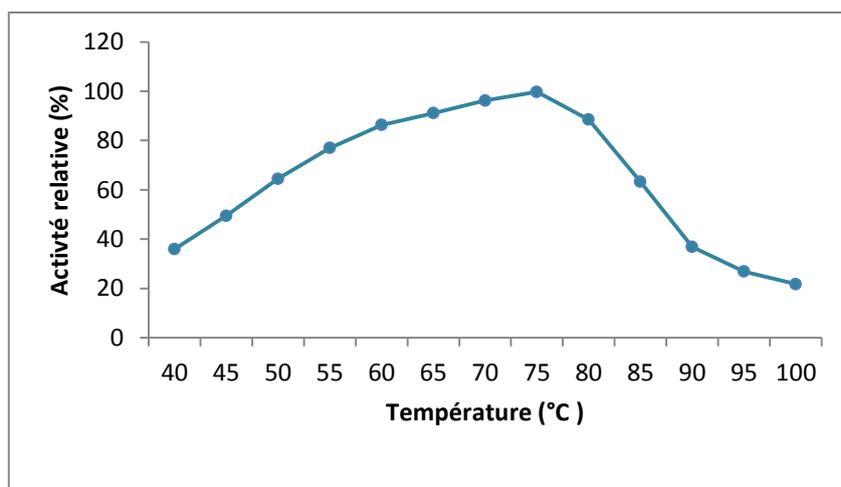


Figure 29 : Effet de la température sur l'activité de l'α-amylase immobilisée.

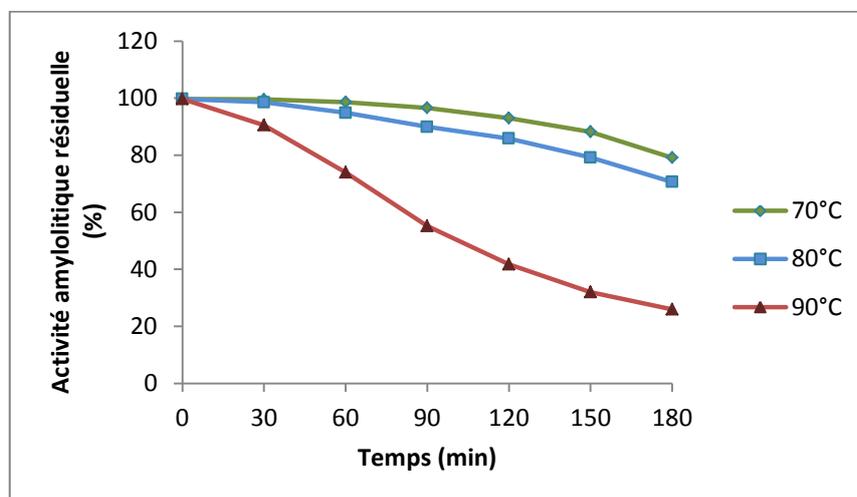


Figure 30 : Effet de la température sur la stabilité de l'α-amylase immobilisée.

Concernant l'étude de l'effet du pH sur l'activité de l'amylase immobilisée (**Figure 31**) on remarque que le pH optimal de l'α-amylase immobilisée est le même que l'α-amylase libre (pH=8) (**Figure 23**). Ce résultat peut s'expliquer par l'absence d'ions H⁺ sur le support utilisé en l'occurrence le film PVDF-Co-HFP-NiO créant ainsi le microenvironnement. En effet, il est connu que lorsque le support est un acide ou une base, cela influence le pH optimum de l'enzyme immobilisée.

Pour ce qui est de la stabilité de la la forme immobilisée représentée par la **figure 32**. On remarque l'amylase immobilisée est stable sur une gamme de pH de 6 à 12 par à l'enzyme libre (**Figure 24**) ce qui est considérable. L'amylase immobilisé conserve plus de 79% de son activité maximale alors que l'enzyme libre conserve juste 71% de son activité, cette augmentation de la stabilité peut être dûe à un changement de l'ionisation de la chaîne latérale

des acides aminés basiques et acides dans le microenvironnement autour du site actif (Talekar *et al.*, 2010 ; Talekar et Chavare, 2012). Ces résultats sont comparables avec ceux de Fang et ses collaborateurs qui ont trouvé que le pH optimal de l' α -amylase ne change pas après immobilisation sur les perles de chitosane-carbone alors que la stabilité s'est améliorée (Fang *et al.*, 2016).

On pourra dire que cette caractéristique de stabilité large de l'amylase vis-à-vis d'une gamme de pH pourrait faire l'objet d'application dans le domaine des bioindustries.

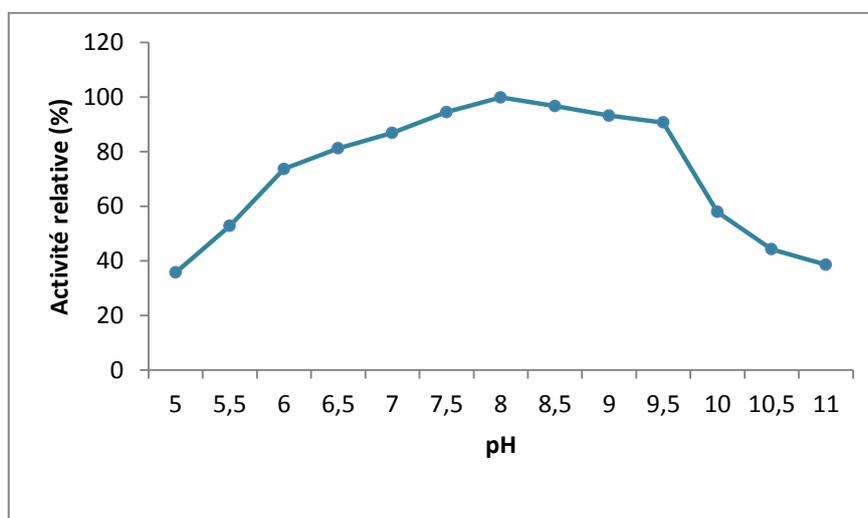


Figure 31 : Effet du pH sur l'activité de l' α -amylase immobilisée.

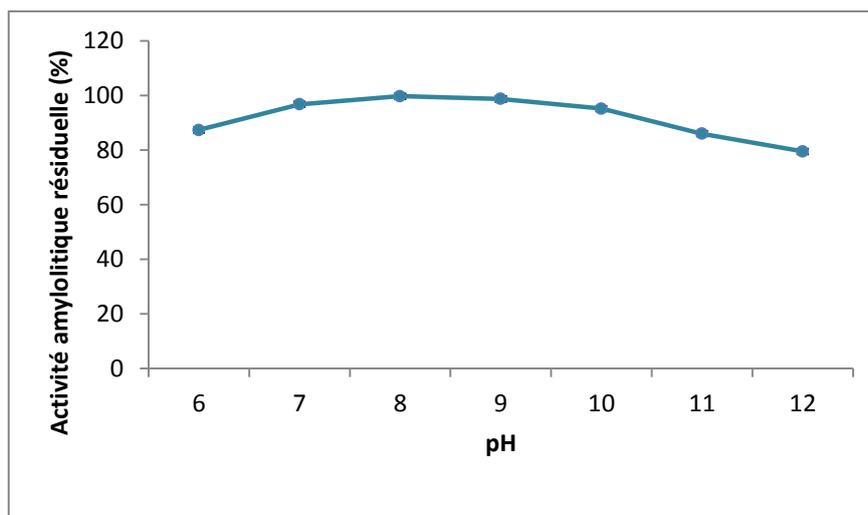


Figure 32: Effet du pH sur la stabilité de l' α -amylase immobilisée.

2.3. Essais d'application dans la détergence au laboratoire

2.3.1. Test de la compatibilité avec divers détergents à lessive commerciaux

Plusieurs facteurs sont pris en compte pour la sélection des α -amylases compatibles avec les détergents, à savoir l'activité, la stabilité, un potentiel d'élimination de taches élevé et la compatibilité avec divers composants du détergent (Acer et al., 2016; Naganthran et al., 2017; Arabaci et Arikani, 2018). L'efficacité de l' α -amylase produit par de l'*Actinomadura keratinilytica* Cpt29 en tant qu'additifs dans les formulations de détergents a donc été étudiée par l'analyse de l'effet de certains détergents du commerce sur la stabilité de cette amylase (Figure 33).

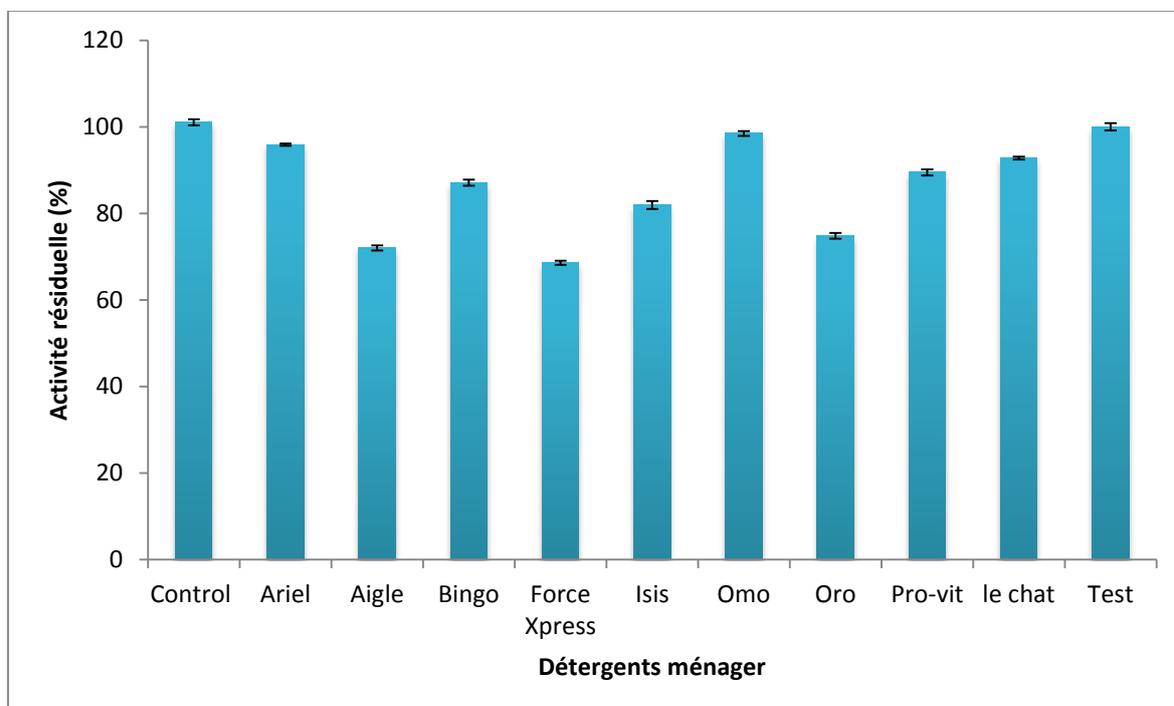


Figure 33 : Stabilité et compatibilité de l' α -amylase de l'*Actinomadura keratinilytica* Cpt29 en présence de détergents ménagers liquides et solides.

Les différents détergents utilisés dans cet essai sont au nombre de 9 et les résultats obtenus sont représentés par la **figure 33**. Les résultats indiquent que l' α -amylase utilisé présente une stabilité et une compatibilité significatives avec l'ensemble des détergents commerciaux testés. En effet, en présence du détergent Test[®] l'activité α -amylasique résiduelle enregistrée est de 100% et plus de 92% de cette activité est conservée avec Omo[®], Ariel[®] et Le Chat[®],

cependant, la stabilité a légèrement diminué en présence de Pro-Vit[®] (89,47%), Bingo[®] (87,1%) et ISIS[®] (81,91%), tandis que la plus faible stabilité a été enregistrée en présence de Force Xpress[®] (68,57%). Les résultats obtenus renforcent l'éventualité d'une application de α -amylase de la souche *A. keratinilytica* Cpt29 dans les formulations de détergents ménagers dans le but d'améliorer leurs performances.

Allala et al. (2019) a également signalé que l' α -amylase de la souche *Tepidimonas fonticaldi* HB23 présentait une compatibilité significative avec tous les détergents pour la lessive testés ou elle retenait 62-100% de son activité d'origine.

2.3.2. Analyse de la performance du lavage

La capacité d'élimination des taches de chocolat et de tomate sur les tissus en coton a été testée en utilisant le détergent liquide (Test[®]) et l'amylase de l'*Actinomadura* Cpt29.

L'ensemble des résultats obtenus sont visualisés à l'œil nu et représentés sur la **figure 34**. Celle-ci montre que l'élimination des taches n'était pas totale en utilisant le détergent commercial (Test[®]) seul. Cependant, une parfaite élimination des taches a été obtenue en utilisant la combinaison de l'amylase produite par la souche *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 avec le détergent commercial.

De nombreux travaux ont rapporté l'utilité des amylases alcalines pour l'amélioration de l'élimination des taches à base d'amidons sur les tissus (**Wang et al., 2018; Allala et al., 2019**).

Les résultats obtenus lors des analyses de performance et de compatibilité de l' α -amylase avec les détergents ménagères ont confirmé que cette enzyme possède un potentiel biotechnologique important en tant que bio-additif dans les formulations des détergents.

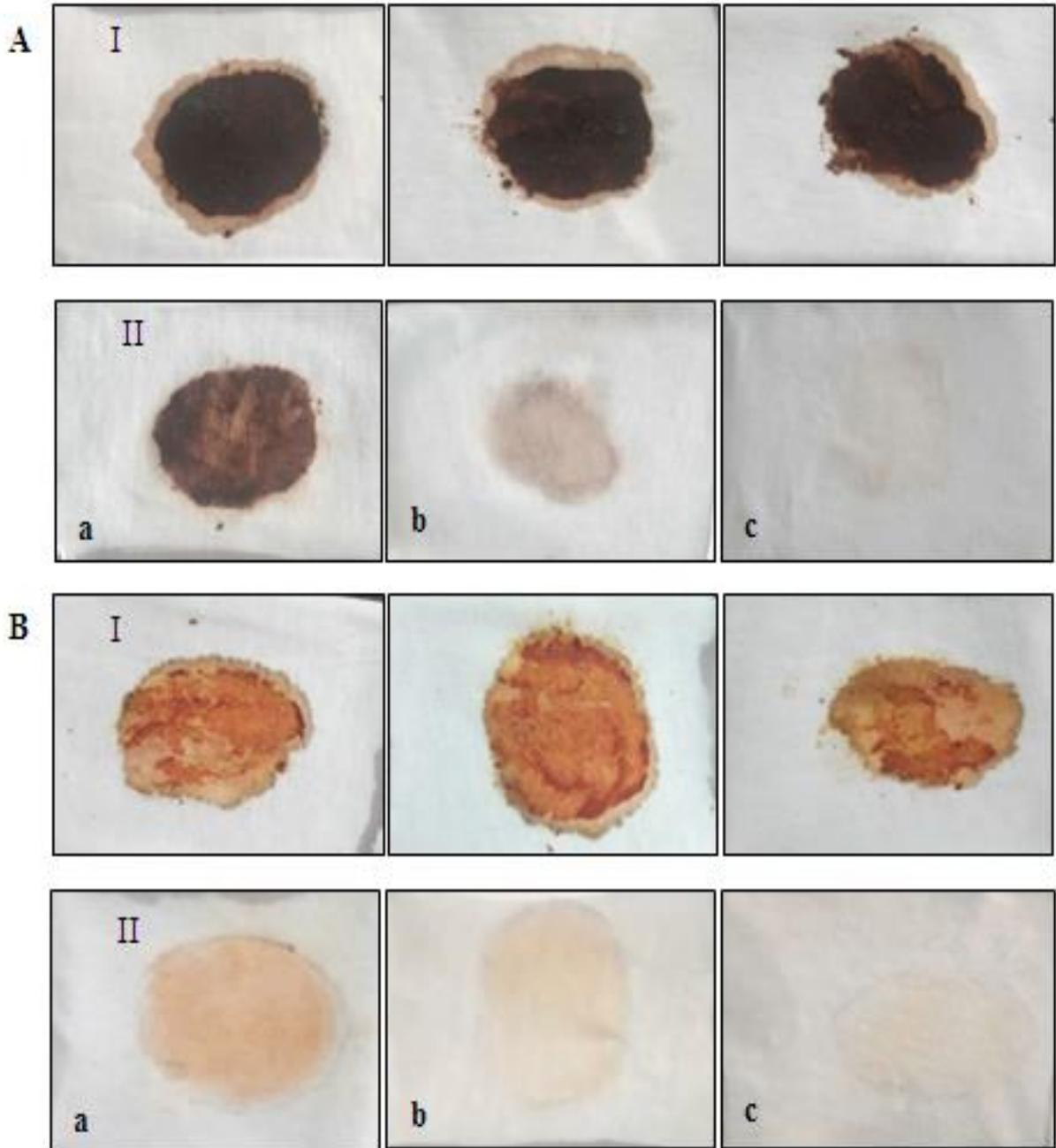
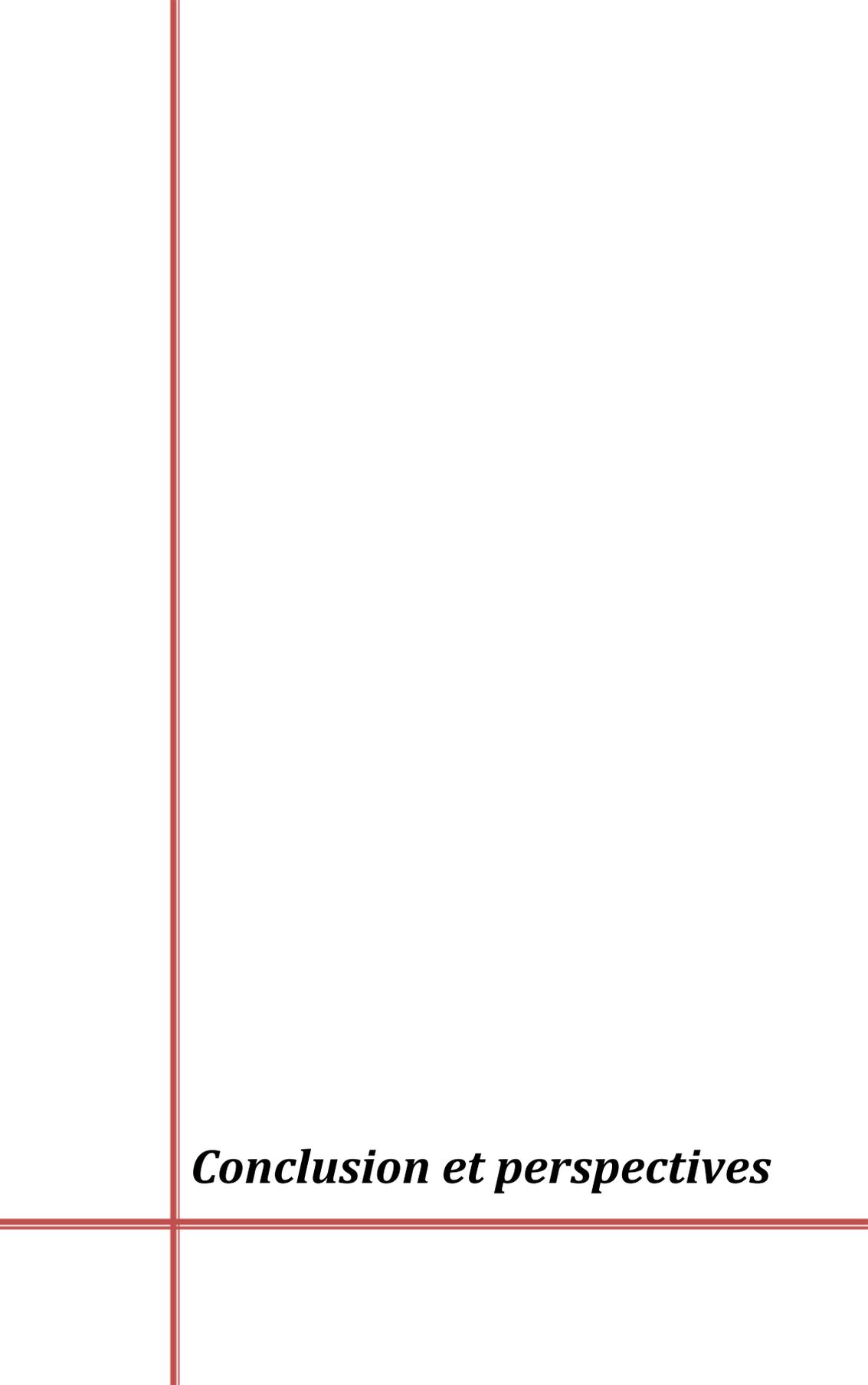


Figure 34 : Analyse du pouvoir détachant de l'extrait brut de l' α -amylase de *Actinomadura keratinilytica* Cpt29. Morceaux de tissu tachés avec du chocolat (A) et de la sauce tomate (B) , (I) : Témoins, morceaux de tissu tachés non traités, (II) : morceaux de tissu tachés lavés avec: (a) de l'eau de robinet, (b) du détergent Test (10%), (c) l' α -amylase + détergent Test (10%).



Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Divers enzymes amylolytiques sont produites par les microorganismes (bactéries, champignons et levures) ayant plusieurs applications: agro-alimentaire, pharmaceutique, détergences, biotechnologie blanche et autres secteurs industriels. Ces différentes sources d'enzymes sont les plus recherchées, dans le sens où par voie de biotechnologie ces enzymes peuvent être modifiées et les adapter aux contraintes industrielles (thermostabilité, pH alcalin et autres paramètres). Comparativement aux bactéries en particulier le genre *Bacillus*, les actinomycètes thermophiles en l'occurrence le genre *Actinomadura* sont peu étudiées et pourtant ils représentent une bonne source de production d'enzymes à l'échelle de la biotechnologie microbienne. Ainsi, à travers ces progrès biotechnologiques, nous, nous sommes intéressés à la production d'amylopullanasés chez une souche d'actinomycète thermophile autochtone isolée du compost de poulet de la région d'Annaba. Cette souche est l'*Actinomadura keratinilytica* Cpt29 qui est stockée dans la banque des gènes sous le numéro d'accèsion KC447297 et qui nous a permis de produire des amylopullulasés et de les caractériser. Ainsi, suite aux différents travaux de recherches réalisés, il en ressort que :

-Dans une première partie du travail de thèse, une culture sur milieu liquide sous agitation à base d'amidon a mis en évidence une production de deux activités enzymatiques, soit une α -amylase de l'ordre 50 U/ml et une pullulanase de l'ordre de 24 U/ml au bout de 72 heures de culture. Du point de vue métabolisme, ces deux activités enzymatiques agissent en synergie pour dégrader totalement l'amidon, ainsi, les pullulasés par action débranchante de la liaison (1-6), libère de l'amylose qui sera dégradé par une α -amylase (1-4). On note qu'au cours de ce travail, l'activité pullulanique est faible ce qui a posé un problème de récupération de cette activité pour mieux l'étudier.

Après avoir mis en évidence une activité amylopullulanase, les travaux de recherche ont procédé à l'optimisation de la production d'amylopullanasés sur milieu liquide en utilisant un modèle mathématique selon l'approche d'un facteur à la fois et la conception de Plackett-Burman. De plus, le niveau optimal de chaque facteur a été déterminé à l'aide du plan de Box-Behnken (BBD). Suite à ces différents travaux, l'analyse a montré que l'amidon de maïs à 29,9 g/l, le tryptone à 7,4 g/l, le KH_2PO_4 à 1 g/l, une température de 45°C, un pH de 6.8 et un temps de culture de 5 jours sont retenus pour la production de l'enzyme (conditions optimales). Les investigations montrent que la valeur prédite de la production est de l'ordre

Conclusion et perspectives

de 189,76 UI/ml, ce qui a été confirmé par des cultures en erlenmeyers où la production a atteint 192.27 UI/ml. Ce modèle mathématique a permis d'augmenter le niveau de production de l'ordre de 3,84 fois ce qui est relativement considérable.

La seconde partie de ce travail de thèse s'est accentuée sur l'extraction, la purification, la caractérisation biochimique, l'immobilisation et application de l'amylase dans la détergence. Ainsi, les différentes investigations ont montré que :

-En deux étapes de précipitation au sulfate d'ammonium et de chromatographie sur G75, l'amylase a pu être purifiée et contrôlée par le suivi de l'évolution de l'activité spécifique et l'électrophorèse en PAGE-SDS. Cette enzyme est purifiée sept fois et affiche une seule bande sur le diagramme électrophorétique. Par ailleurs, on note que l'activité de l'amylase n'a pas pu être localisée par le zymogramme ce qui limite l'efficacité de la technique. De même que l'activité pullulansique n'a pas pu être localisée ni dans le chromatogramme ni en électrophorèse. Cette absence de détection de cette activité pourrait être liée probablement au faible niveau d'activité de cette enzyme, d'où l'intérêt de procéder à la lyophilisation de cette enzyme pour la détecter.

En ce qui concerne la caractérisation biochimique de l'amylase, les résultats obtenus indiquent que :

-La masse molaire relative (M_r) est de l'ordre de 40,28 kDa et obtenu par électrophorèse en PAGE-SDS sous forme d'une seule bande majoritaire et homogène. Cette valeur est comparable à celles obtenues chez d'autres souches de *Streptomyces*.

-Le pH-optimum et la température optimale sont respectivement de 8 et 70°C, ces deux caractéristiques (pH alcalin et température élevée) confèrent à cette enzyme une meilleure utilisation dans la détergence.

-Du point de stabilité, l'enzyme est stable à une gamme de pH de 7 à 10 et de température allant à un intervalle 70 à 90°C. Cette stabilité est un critère de choix des enzymes pour leurs utilisations dans les bio-industries.

-L'étude a indiqué également que les ions métalliques: Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+} activent significativement l'amylase avec un ordre de grandeur de 137.52%, 126.84% et 117.84% respectivement, ce qui est considérable et appuie divers résultats mentionnés dans la bibliographie.

Conclusion et perspectives

-L'enzyme s'est montrée également résistante à de nombreux agents inhibiteurs, tensioactifs et solvant organique notamment ceux rencontrés dans la composition des détergents comme l'EDTA ce qui lui confère une meilleure aptitude à utilisation dans l'industrie de la lessive.

-La recherche du mode d'attaque de l'amylase sur l'amidon fait apparaître du maltose comme produit final et d'autres oligomères tri et tétraomères, avec absence du glucose, ce qui laisse penser que le mode d'attaque est en faveur d'une endo-amylase (attaque aléatoire sur le polymère). En ce qui concerne l'absence du glucose, cela est dû aux transférases qui fixent par réactions de transfert de l'unité de glucose sur le polymère hydrolysé restant.

-Dans ce travail de thèse, l'étude l'immobilisation de l'enzyme sur un film membranaire de type PVDF-co-HFP-NiO a amélioré sa thermostabilité par rapport à l'enzyme libre ce qui est au profit des bio-industries. La température optimale de l'activité enzymatique s'est décalée à 75°C après immobilisation, alors que le pH-optimum n'a pas changé. De même que le test de la réutilisation de l'amylase au cours des huit cycles s'est montré concluant dans la stabilité de l'immobilisation de cette enzyme. L'enzyme immobilisée conserve 56,64% de son activité initiale après 08 cycles. Une application dans ce sens pourrait être envisageable et exploitable.

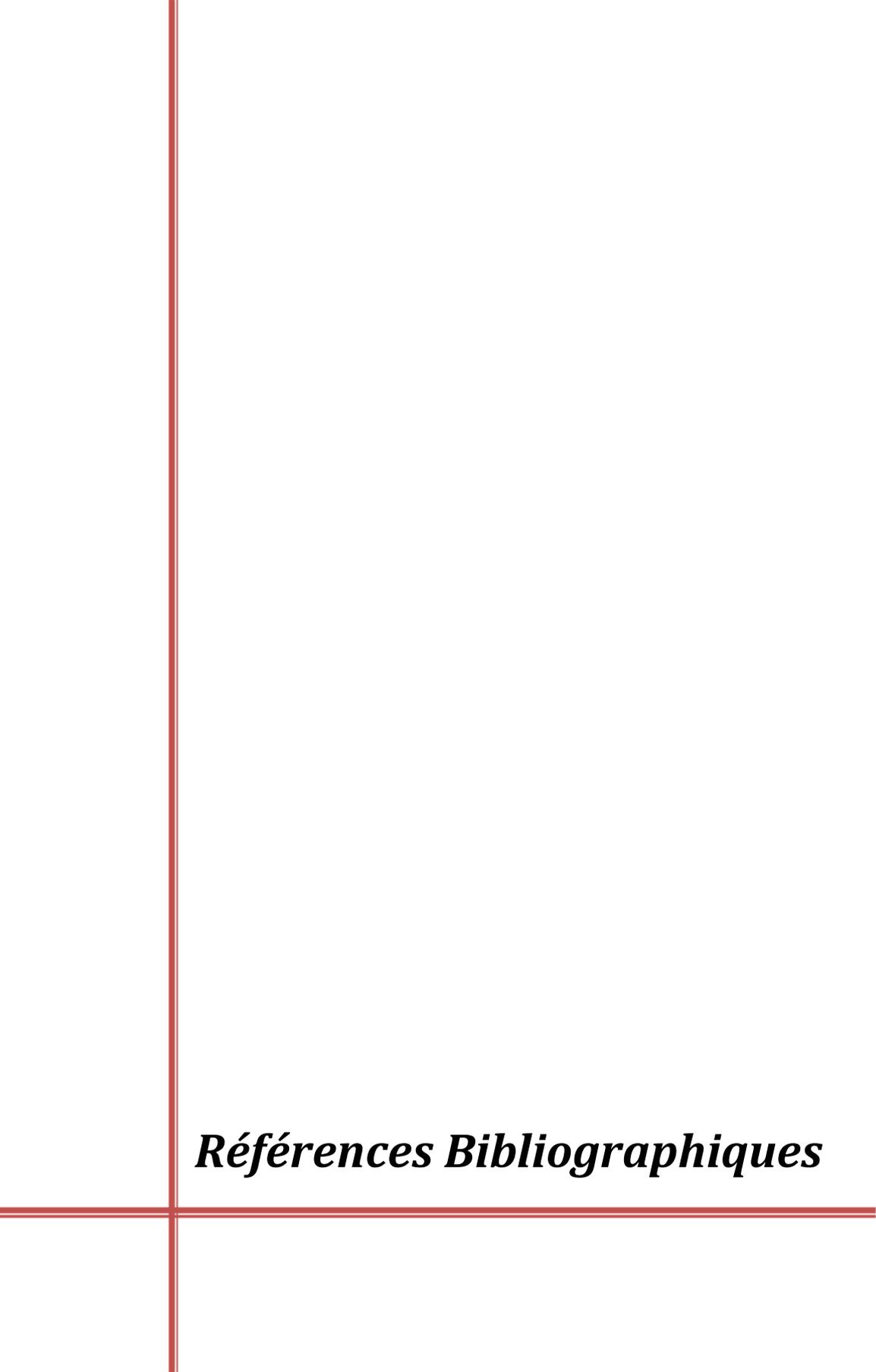
-Du point de vue application biotechnologique, l'amylase obtenue est compatible avec les 9 détergents commerciaux testés et montre une excellente efficacité de lavage des taches de chocolat et de souillures de tomates concentrée. On pourra dire que cette propriété biotechnologique est très prometteuse pour des applications industrielles en particulier l'industrie des détergents.

A la lumière de ces résultats, nous envisageons les perspectives suivantes :

- Il y a lieu de revoir la purification pour obtenir de bonnes quantités d'enzymes pures en particulier les pullulanases.
- L'analyse des produits d'hydrolyses doit être effectuée par des méthodes plus performantes (CPG-SM, HPLC-SM) pour mieux identifier le mode d'action.
- Tester l'immobilisation de l'enzyme sur les agro-déchets qui sont actuellement les plus utilisées pour des raisons économiques.
- Isolement du gène et son séquençage pour mieux comprendre la structure de cette amylase.

Conclusion et perspectives

- Procéder à une expression hétérologue de cette amylase dans *E .coli* afin d'augmenter à la fois le rendement de production et faciliter la purification de l'enzyme.
- Passer de l'échelle du laboratoire à une échelle industrielle pour la production d'enzymes.



Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- Abd-Elaziz, A. M., Karam, E. A., Ghanem, M. M., Moharam, M. E., & Kansoh, A. L. (2020). Production of a novel α -amylase by *Bacillus atrophaeus* NRC1 isolated from honey: Purification and characterization. *International journal of biological macromolecules*, 148, 292-301.
- Abdel-Fattah, Y. R., Soliman, N. A., El-Toukhy, N. M., El-Gendi, H., & Ahmed, R. S. (2013). Production, purification, and characterization of thermostable α -amylase produced by *Bacillus licheniformis* isolate AI20. *Journal of Chemistry*, 2013.
- Abd-Elhalem, B. T., El-Sawy, M., Gamal, R. F., & Abou-Taleb, K. A. (2015). Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 193-202.
- Abdel-Mageed, H. M., Radwan, R. A., AbuelEzz, N. Z., Nasser, H. A., El Shamy, A. A., Abdelnaby, R. M., & El Gohary, N. A. (2019). Bioconjugation as a smart immobilization approach for α -amylase enzyme using stimuli-responsive Eudragit-L100 polymer: a robust biocatalyst for applications in pharmaceutical industry. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 2361-2368.
- Abdulaal, W. H. (2018). Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. *BMC biochemistry*, 19(1), 1-6.
- Abdul-Hadi, S. Y., & Al-Bayyar, A. H. (2019). Extraction, purification and characterization of extracellular pullulanase by *klebsiella pneumoniae* isolated from soil. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 16(1), 41-46.
- Abou-Elela, G. M., El-Sersy, N. A., & Wefky, S. H. (2009). Statistical optimization of cold adapted α -amylase production by free and immobilized cells of *Nocardopsis aegyptia*. *J. Appl. Sci. Res*, 5(3), 286-292.
- Acer, Ö., Matpan Bekler, F., Pirinçioğlu, H., Gül Güven, R., & Güven, K. (2016). Purification and characterization of thermostable and detergent-stable α -amylase from *Anoxybacillus sp.* AH1. *Food technology and biotechnology*, 54(1), 70-77.
- Acharyabhata, A., Kandula, S. K., & Terli, R. (2013). Taxonomy and polyphasic characterization of alkaline amylase producing marine actinomycete *Streptomyces rochei* BTSS 1001. *International journal of microbiology*, 2013.

- Acourene, S., Amourache, L., Djafri, K., & Bekal, S. (2014). Date wastes as substrate for the production of α -amylase and invertase. *Iranian Journal of Biotechnology* 12(3), 41-49.
- Addou, A. N. (2009). Les actinobactéries thermo-halophiles. Thèse de doctorat, Université d'Alger.
- Afrisham, S., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., & Karami, Z. (2016). Characterization of a thermostable, CaCl₂-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid state fermentation by utilizing agricultural wastes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 132, 98-106.
- Ait Kaki El-Hadef El-Okki, A., Gagaoua, M., Bennamoun, L., Djekrif, S., Hafid, K., El-Okki M.E.H., & Meraihi, Z. (2017). Statistical optimization of thermostable α -amylase production by a newly isolated *Rhizopus oryzae* strain FSIS4 using decommissioned dates. *Waste and Biomass Valorization*, 8(6), 2017-2027.
- Akassou, M. (2018). Production d'une activité amylolytique thermostable par *Thermus thermophilus* HB8 suivie du clonage et de l'expression d'une pullulanase de type 1 de *T. thermophilus* HB8 chez la levure méthyliotrophe *Pichia pastoris*. Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke.
- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., Arasu, M. V., Duraipandiyan, V., & Ponmurugan, K. (2020). Isolation and purification of starch hydrolysing amylase from *Streptomyces sp.* Al-Dhabi-46 obtained from the Jazan region of Saudi Arabia with industrial applications. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 1226-1232.
- Alexander, M. (1978). Introduction to soil microbiology. *Soil Science*, 125(5), 331.
- Alikhajeh, J., Khajeh, K., Ranjbar, B., Naderi-Manesh, H., Lin, Y. H., Liu, E., & Chen, C. J. (2010). Structure of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase at high resolution: implications for thermal stability. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(2), 121-129.
- Allala, F., Bouacem, K., Boucherba, N., Azzouz, Z., Mechri, S., Sahnoun, M., & Bouanane-Darenfed, A. (2019). Purification, biochemical, and molecular characterization of a novel extracellular thermostable and alkaline α -amylase from *Tepidimonas fonticaldi* strain HB23. *International journal of biological macromolecules*, 132, 558-574.
- Almulaiky, Y. Q., Aqlan, F. M., Aldahri, M., Baeshen, M., Khan, T. J., Khan, K. A., & Alayafi, A. A. (2018). α -Amylase immobilization on amidoximated acrylic microfibres activated by cyanuric chloride. *Royal Society open science*, 5(11), 172164.

- Al-Najada, A. R., Almulaiky, Y. Q., Aldhahri, M., El-Shishtawy, R. M., Mohamed, S. A., Baeshen, M., & Al-Harbi, S. A. (2019). Immobilisation of α -amylase on activated amidrazone acrylic fabric: a new approach for the enhancement of enzyme stability and reusability. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.
- Amigo, J. M., Delolmo Alvarez, A., Engelsen, M. M., Lundkvist, H., & Engelsen. (2016). Staling of white wheat bread crumb and effect of maltogenic alpha amylases. Part 1: spatial distribution and kinetic modeling of hardness and resilience. *Food Chem*, 208, 318-325.
- Angelia, C., Sanjaya, A., Aida, A., Tanudjaja, E., Victor, H., Cahyani, A. D., & Pinontoan, R. (2019). Characterization of Alpha-Amylase from *Aspergillus niger* Aggregate F Isolated from a Fermented Cassava Gatot Grown in Potato Peel Waste Medium. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 47(3), 364-371.
- Antony, N., Balachandran, S., & Mohanan, P. V. (2016). Immobilization of diastase α -amylase on nano zinc oxide. *Food chemistry*, 211, 624-630.
- Antranikian, G. (1992). Microbial degradation of starch. *Microbial degradation of natural products*, 27-56.
- Arabacı, N., & Arkan, B. (2018). Isolation and characterization of a cold-active, alkaline, detergent stable α -amylase from a novel bacterium *Bacillus subtilis* N8. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(5), 419-426.
- Ashwini, K., & Kumar, S. (2016). Partial-purification of alpha-Amylase from marine *Streptomyces gancidicus*-ASD_KT852565. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 9(6), 731-734.
- Ashwini, K., & Shanmugam, S. (2019). Enhanced alpha-amylase production using *Streptomyces gancidicus* ASD by process optimization. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 48(06), 845-852.
- Azizi, M. H., Rajabzadeh, N., & Riahi, E. (2003). Effect of mono-diglyceride and lecithin on dough rheological characteristics and quality of flat bread. *LWT-Food Science and Technology*, 36(2), 189-193.
- Badji, B., Mostefaoui, A., Sabaou, N., Mathieu, F., & Lebrihi, A. (2011). Identification of a new strain of *Actinomyces* isolated from Saharan soil and partial characterization of its antifungal compounds. *African Journal of Biotechnology*, 10(63), 13878-13886.

- Bahri, S. M., & Ward, J. M. (1990). Cloning and expression of an α -amylase gene from *Streptomyces thermoviolaceus* CUB74 in *Escherichia coli* JM107 and *S. lividans* TK24. *Microbiology*, 136(5), 811-818.
- Bandal, J. N., Tile, V. A., Sayyed, R. Z., Jadhav, H. P., Azelee, N. I., Danish, S., & Datta, R. (2021). Statistical Based Bioprocess Design for Improved Production of Amylase from Halophilic *Bacillus sp.* H7 Isolated from Marine Water. *Molecules*, 26(10), 2833.
- Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., & Waley, S. G. (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution: using amino acid sequence data. *Nature*, 255(5510), 609-614.
- Bano, S., Qader, S. A. U., Aman, A., Syed, M. N., & Azhar, A. (2011). Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Aaps Pharmscitech*, 12(1), 255-261.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Beckers, H. J., & Van der Hoeven, J. S. (1982). Growth rates of *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus mutans* during early colonization of tooth surfaces in gnotobiotic rats. *Infection and Immunity*, 35(2), 583-587.
- Bertheau, Y., Kotoujansky, A., & Coleno, A. (1985). Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hydrolyses, 359.
- Bertoldo, C., & Antranikian, G. (2002). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current opinion in chemical biology*, 6(2), 151-160.
- Bertoldo, C., Armbrrecht, M., Becker, F., Schäfer, T., Antranikian, G., & Liebl, W. (2004). Cloning, sequencing, and characterization of a heat-and alkali-stable type I pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3407-3416.
- Bharti, P. K., Khan, M. I., & Singh, H. (2010). Taguchi's off line method and Multivariate loss function approach for quality management and optimization of process parameters-A review. In *AIP Conference Proceedings*. American Institute of Physics, 1298(1), 486-491.

Références bibliographiques

- Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z., Dodson, G. G., Jensen, V. J., & Woldike, H. F. (1990). Calcium binding in α -amylases: an x-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*, 29(26), 6244-6249.
- Bonnet, E., Flecher, X., Paratte, S., Argenson, J. N., Raoult, D., & Fournier, P. E. (2011). *Actinomyces meyeri* osteitis following wound contamination with hay in a woman in France: a case report. *Journal of medical case reports*, 5(1), 1-4.
- Bouchagra, S. (2010). Immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* sur la résine Amberjet 4200Cl Optimisation de l'énantioselectivité par la méthode des surfaces de réponse. Magister, Université d'Annaba.
- Boursier, B. (2005). Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires. Ed. Techniques L'ingénieur Additifs Adjuv Aliment, 33, 27.
- Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1951). *J. Royal Statistical Soc. Series B*, 13, 1-9.
- Box, G. E., & Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4), 455-475.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brahmachari, G. (2016). *Biotechnology of microbial enzymes: production, biocatalysis and Industrial applications*. Academic Press, 632.
- Brayer, G. D., Luo, Y., & Withers, S. G. (1995). The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Science*, 4(9), 1730-1742.
- Brown, S. H., & Kelly, R. M. (1993). Characterization of amylolytic enzymes, having both α -1, 4 and α -1, 6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Applied and environmental microbiology*, 59(8), 2614-2621.
- Bukhari, S. I., Al-Agamy, M. H., Kelany, M. S., Al Hazani, M. R., & Hamed, M. M. (2021). Production optimization using Plackett-Burman and Box-Behnken designs with partial characterization of amylase from marine actinomycetes.
- BULEON A. (2001). Caractéristiques structurales des amidons. Formation Adria des 21 et 22 mars 2001 à Nantes (France).

Références bibliographiques

- Buleon, A., Colonna, P., & Leloup, V. (1990). Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. *Industries alimentaires et agricoles*, 107(6), 515-532.
- Chakraborty, S., Khopade, A., Kokare, C., Mahadik, K., & Chopade, B. (2009). Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4), 17-23.
- Chatterton Jr, R. T., Vogelsong, K. M., Lu, Y. C., Ellman, A. B., & Hudgens, G. A. (1996). Salivary α -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clinical physiology*, 16(4), 433-448.
- Chaudhary, H. S., Soni, B., Shrivastava, A. R., & Shrivastava, S. (2013). Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(8), S83-S94.
- Cheema, M.T.; Fatima, A.; Sajid, I. (2016). Molecular Identification, Bioactivity Screening and Metabolic Fingerprinting of the Actinomycetes of Chenab River Sediments. *Br. Microbiology Research Journal Microbiol*, 17, 1-13.
- Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Keshwani, D., & Chen, C. (2007). Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 142(3), 276-290.
- Chetouani, A. (2018). Élaboration et bio évaluation de nouvelles classes d'hydrogels à base de pectine avant et après son oxydation par le periodate et/ou par le chlore actif et étude de leurs effets sur les comportements physico-chimiques et biologiques de la gélatine et du chitosane. Thèse de doctorat, Université de Sérif.
- Clément, B., (2000). Conception robuste : Les concepts et la méthodologie de Taguchi dans le design de produits. École Polytechnique de Montréal et Génistat Conseils Inc. 28.
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., & Tang, M. C. (2009). Form and functionality of starch. *Food hydrocolloids*, 23(6), 1527-1534.
- Coronado, M. J., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A., & Nieto, J. J. (2000). Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS microbiology letters*, 183(1), 67-71.
- Corrêa, T. L. R., Moutinho, S. K. D. S., Martins, M. L. L., & Martins, M. A. (2011). Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged

- culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: compatibility of enzymes with commercial detergents. *Food Science and Technology*, 31, 843-848.
- Cotârleț, M. (2013). Medium optimization for the production of cold-active beta amylase by psychrotrophic *Streptomyces* MIUG 4 alga using response surface methodology. *Microbiology*, 82(2), 147-154.
- Cross, T. (1981). Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *Journal of applied Bacteriology*, 50(3), 397-423.
- Dakhmouche Djekrif, S., Bennamoun, L., Labbani, F. Z. K., Ait Kaki, A., Nouadri, T., Pauss, A., & Gillmann, L. (2021). An Alkalothermophilic Amylopullulanase from the Yeast *Clavispora lusitaniae* ABS7: Purification, Characterization and Potential Application in Laundry Detergent. *Catalysts*, 11(12), 1438.
- Dakhmouche-Djekrif, S. (2016). Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. Thèse de doctorat, Université de Technologie de Compiègne.
- Dar, G. H., Kamili, A. N., Nazir, R., Bandh, S. A., Jan, T. R., & Chishti, M. Z. (2015). Enhanced production of α -amylase by *Penicillium chrysogenum* in liquid culture by modifying the process parameters. *Microbial pathogenesis*, 88, 10-15.
- Deb, P., Talukdar, S. A., Mohsina, K., Sarker, P. K., & Sayem, S. A. (2013). Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *SpringerPlus*, 2(1), 1-12.
- Debnath, T., Kujur, R. R. A., Mitra, R., & Das, S. K. (2019). Diversity of microbes in hot springs and their sustainable use. In *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*. Springer, Singapore, 159-186.
- Devin, A. (2010). Etablissement de l'implication des α -et β -amylases et des α -glucanes phosphorylases au cours de la dégradation de l'amidon dans la feuille d'*Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat, Université Lille.
- DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulou, A. J., & Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6437-6474.
- Divya, B., Shiburaj, S., & Pradeep N.S. (2014). Production, Purification and Characterisation of thermostable α -amylase from *Streptomyces griseus* TBG19NRA1” presented paper in the 26th Kerala Science Congress held at KVASU, Pookode, Wayanad from 28-31.

- Domań-Pytka, M., & Bardowski, J. (2004). Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Critical reviews in microbiology*, 30(2), 107-121.
- Doyon, Y., Home, W., Daull, P., & Le BEL, D. (2002). Effect of C-domain N-glycosylation and deletion on rat pancreatic α -amylase secretion and activity. *Biochemical Journal*, 362(2), 259-264.
- Drejer, E. B., Hakvåg, S., Irla, M., & Brautaset, T. (2018). Genetic tools and techniques for recombinant expression in thermophilic bacillaceae. *Microorganisms*, 6(2), 42.
- Drummond, G. S., Smith, E. E., Whelan, W. J., & Tai, H. (1969). Mechanism of action of pullulanase. *FEBS letters*, 5(1), 85-88.
- Duan, X., Shen, Z., Zhang, X., Wang, Y., & Huang, Y. (2019). Production of recombinant beta-amylase of *Bacillus aryabhatai*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(1), 88-94.
- Ebrahimipour, G., Sadeghi, H., & Zarinviarsagh, M. (2017). Statistical methodologies for the optimization of lipase and biosurfactant by *Ochrobactrum intermedium* strain MZV101 in an identical medium for detergent applications. *Molecules*, 22(9), 1460.
- Egas, M. C., da Costa, M. S., Cowan, D. A., & Pires, E. M. (1998). Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, 2(1), 23-32.
- El-Aty, A. A. A., & Mostafa, F. A. (2015). Production and characterization of fungal α -amylase from marine *Alternaria alternata* utilizing lignocellulosic wastes and its application. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(3), 813-825.
- El-Ghaffar, M. A., & Hashem, M. S. (2009). Immobilization of α -amylase onto chitosan and its amino acid condensation adducts. *Journal of applied polymer science*, 112(2), 805-814.
- Eliasson, A. C. (1983). Differential scanning calorimetry studies on wheat starch-gluten mixtures: I. Effect of gluten on the gelatinization of wheat starch. *Journal of Cereal Science*, 1(3), 199-205.
- Elibol, M. (2004). Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) with response surface methodology. *Process Biochemistry*, 39(9), 1057-1062.
- Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P., & Srinivasulu, B. (2002). Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus species*. *Process Biochemistry*, 38(4), 615-620.

- Elleuche, S., & Antranikian, G. (2013). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophiles. *Microbes Environmental and Industrial Biotechnology*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 509-533.
- Elmansy, E. A., Asker, M. S., El-Kady, E. M., Hassanein, S. M., & Fawkia, M. (2018). Production and optimization of α -amylase from thermo-halophilic bacteria isolated from different local marine environments. *Bulletin of the National Research Centre*, 42(1), 1-9.
- Ensign, J. C., Normand, P., Burden, J. P., & Yallop, C. A. (1993). Physiology of some *actinomycete* genera. *Research in microbiology*, 144(8), 657-660.
- Fang, S., Chang, J., Lee, Y. S., Hwang, E. J., Heo, J. B., & Choi, Y. L. (2016). Immobilization of α -amylase from *Exiguobacterium* sp. DAU5 on Chitosan and Chitosan-carbon Bead: Its Properties. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 59(1), 75-81.
- Fang, W., Xue, S., Deng, P., Zhang, X., Wang, X., Xiao, Y., & Fang, Z. (2019). AmyZ1: a novel α -amylase from marine bacterium *Pontibacillus* sp. ZY with high activity toward raw starches. *Biotechnology for biofuels*, 12(1), 1-15.
- Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: A review. *Archives of Microbiology*, 1-12.
- Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., & Dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597(2), 179-186.
- Franco, J. (2008). Planification d'expériences numériques en phase exploratoire pour la simulation des phénomènes complexes. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne).
- Fujimoto, Z., Kenji, T., Nobiko, D., Mitsuru, M., Takashi, M., & Hiroshi Mizumo. (1998). Crystal structure of a catalytic-site mutant α -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *Journal of Molecular Biology*, 277(2), 393-407.
- Gajdhane, S. B., Bhagwat, P. K., & Dandge, P. B. (2016). Response surface methodology-based optimization of production media and purification of α -galactosidase in solid-state fermentation by *Fusarium moniliforme* NCIM 1099. *3 Biotech*, 6(2), 1-14.
- Garske, A. L., Kapp, G., & McAuliffe, J. C. (2017). Industrial enzymes and biocatalysis. In *Handbook of industrial chemistry and biotechnology*. Springer, Cham, 1571-1638.

- Gashtasbi, F., Ahmadian, G., & Noghabi, K. A. (2014). New insights into the effectiveness of alpha-amylase enzyme presentation on the *Bacillus subtilis* spore surface by adsorption and covalent immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, 64, 17-23.
- Gasmi, M., & Kitouni, M. (2017). Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology. *Annals of Microbiology*, 67(2), 175-183.
- Girelli, A. M., Astolfi, M. L., & Scuto, F. R. (2020). Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere*, 244, 125368.
- Goodfellow, M (2012) Actinobacteria phyl. Nov. In: Whitman W. B., Goodfellow .M., Kämpfer. P., Busse H. J., Trujillo M. E., Ludwig. W., Suzuki. K. I, Parte A . Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Vol 5: 2nd edn .The actinobacteria part B. Springer, New York: 33-34.
- Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual review of microbiology*, 37(1), 189-216.
- Gopinath, S. C., Anbu, P., Arshad, M. M., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Chinni, S. V. (2017). Biotechnological processes in microbial amylase production. *BioMed research international*, 2017.
- Goupy, J., & Creighton, L. (2006). Introduction aux plans d'expériences–3e édition. *Technique et ingénierie, serie conception. L'usine nouvelle-Dunod*, 179-206.
- Grand View Research, I. (2016). Alpha-Amylase Baking Enzyme Market Analysis By Source [Fungi, Bacteria (Maltogenic, G4), Plant-Based], By Application (Breads, Cookies & Biscuits, Desserts) And Segment Forecasts To 2024. Grand View Research Inc, 91.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- Gürkök, S. (2019). Microbial enzymes in detergents: a review. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 10(9), 75-81.
- Habbeche, A., Haberra, S., Saoudi, B., Kerouaz, B., & Ladjama, A. (2013). Keratinase production from a thermophilic actinomycete strain Cpt29 newly isolated from poultry compost. *Minerva Biotechnologica*, 25(3), 151-9.
- Habbeche, A., Saoudi, B., Jaouadi, B., Haberra, S., Kerouaz, B., Boudelaa, M., & Ladjama, A. (2014). Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly

- thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *Journal of bioscience and bioengineering*, 117(4), 413-421.
- Haberra, S., Habbeche, A., Saoudi, S., Kerouaz, B., Slimani, S., Boudelaa, M., & Ladjama, A. (2013). Optimization of xylanase production by a newly thermophilic actinomycete strain Cpt29 isolated from poultry compost. *Eur. J. Sci. Res.*, 108, 227-239.
- Hasan, M. M., Marzan, L. W., Hosna, A., Hakim, A., & Azad, A. K. (2017). Optimization of some fermentation conditions for the production of extracellular amylases by using *Chryseobacterium* and *Bacillus* isolates from organic kitchen wastes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 59-68.
- Hendriksen, H. V., Pedersen, S., & Bisgard-Frantzen, H. (1999). A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. Patent Application. 35325.
- Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C., & Ariff, A. B. (2012a). Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme research*, 2012.
- Hii, Y. L., Zhu, H., Ng, N., Ng, L. C., & Rocklöv, J. (2012b). Forecast of dengue incidence using temperature and rainfall. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(11), e1908.
- Hillier, P., Wase, D. A. J., Emery, A. N., & Solomons, G. L. (1997). Instability of α -amylase production and morphological variation in continuous culture of *Bacillus amyloliquefaciens* is associated with plasmid loss. *Process Biochemistry*, 32(1), 51-59.
- Hmidet, N., Ali, N. E. H., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S. K., & Nasri, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1-3), 71-79.
- Hoinard, C., (2009). Les plans factoriels fractionnaires. *Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Tours*. 24.
- Hui, Y. H., & Khachatourians, G. G., (1995). *Food biotechnology: microorganisms*. John Wiley & Sons.
- Hwang, S. Y., Nakashima, K., Okai, N., Okazaki, F., Miyake, M., Harazono, K., & Kondo, A. (2013). Thermal stability and starch degradation profile of α -amylase from *Streptomyces avermitilis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(12), 2449-2453.
- Janeček, Š., Svensson, B., & MacGregor, E. A. (2014). α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and molecular life sciences*, 71(7), 1149-1170.

- Jasilionis, A., Petkauskaite, R., & Kuisiene, N. (2014). A novel type I thermostable pullulanase isolated from a thermophilic starch enrichment culture. *Microbiology*, 83(3), 227-234.
- Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Henrissat, B., Sierks, M. R., & Svensson, B. (1993). Starch-and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural features of the catalytic (β/α) 8-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *Journal of protein chemistry*, 12(6), 791-805.
- Kalia, S., Bhattacharya, A., Prajapati, S. K., & Malik, A. (2021). Utilization of starch effluent from a textile industry as a fungal growth supplement for enhanced α -amylase production for industrial application. *Chemosphere*, 279, 130554.
- Kaneko, T., Ohno, T., & Ohisa, N. (2005). Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amylase from a *Streptomyces* sp. isolated in a milling factory. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(6), 1073-1081.
- Kar, S., & Ray, R. C. (2008). Partial characterization and optimization of extracellular thermostable Ca^{2+} inhibited α -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317.
- Kar, S., Ray, R. C., & Mohapatra, U. B. (2012). Purification, characterization and application of thermostable amylopullulanase from *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 under submerged fermentation. *Annals of microbiology*, 62(3), 931-937.
- Kerouaz, B., Jaouadi, B., Brans, A., Saoudi, B., Habbeche, A., Haberra, S., & Ladjama, A. (2021). Purification and biochemical characterization of two novel extracellular keratinases with feather-degradation and hide-dehairing potential. *Process Biochemistry*, 106, 137-148.
- Keskin Gündoğdu, T., Deniz, I., Çalışkan, G., Şahin, E. S., & Azbar, N. (2016). Experimental design methods for bioengineering applications. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 368-388.
- Keskin, Ş., & Ertunga, N. S. (2017). Purification, immobilization and characterization of thermostable α -amylase from a thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. TF14. *Turkish Journal of Biochemistry*, 42(6), 633-642.
- Khuri, A. I., & Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128-149.
- Khusro, A., Barathikannan, K., Aarti, C., & Agastian, P. (2017). Optimization of thermo-alkali stable amylase production and biomass yield from *Bacillus* sp. under submerged cultivation. *Fermentation*, 3(1), 7.

Références bibliographiques

- Kim, S. B., Seong, C. N., Jeon, S. J., Bae, K. S., & Goodfellow, M. (2004). Taxonomic study of neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(1), 211-214.
- Kimouche, K., & Gheribi, Z. (2008). Etude de quelques plans d'expériences associées aux surfaces de réponse. Thèse de doctorat, Université Mentouri Constantine.
- Kizhakedathil, M. P. J., & Chandrasekaran, S. D. (2018). Media optimization for extracellular amylase production by *Pseudomonas balearica* vitps19 using response surface methodology. *Frontiers Biology*, 13(2), 123-9.
- Kumar, S., & Khare, S. K. (2015). Chloride activated halophilic α -amylase from *Marinobacter* sp. EMB8: Production optimization and nanoimmobilization for efficient starch hydrolysis. *Enzyme research*, 2015. 9.
- Kurt, E. (2020). Immobilization of Enzymes on Hierarchically-Structured Supports. Thèse de doctorat, Université Erlangen-Nürnberg Allemagne.
- Lacey J., (1997). Actinomycetes in composts. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 4: 113-121.
- Lacey, J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. In *Society for Applied Bacteriology symposium series*, 2, 231-251.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Landolt, E., & Kandeler R. (1987). The family of Lemnacea monographic study. In : *Phytochemistry, physiology, application and bibliography*. Switzerland, Stiftung Rubel, 2.
- Laouini, W. (2011). Propriétés fonctionnelles de l'amidon irradié. Carthage: Université du, 7.
- Larpent, G . M., Sanglier, J. J. (1992). *Biotechnologies. Principes et méthodes*. 574-581.
- Larpent, J. P., & Larpent-Gourgau, M. (1997). *Mémento Technique de Microbiologie* (3 édn). Lavoisier: Londres, New York, Paris.
- Lechevalier M.P., (1981). Ecological associations involving actinomycetes. In: *Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. suppl.*, 11, 159-166.
- Lee, S. D. (2012). *Actinomadura rupiterrae* sp. nov., isolated from cliff soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(4), 990-995.

- Lemo, A.O., Odutayo, E. O., Ametefe, G. D. & Farinu, A. (2019). A review of literature on isolation of bacteria α - amylase. *International Research Journal of Engineering and Technology*, 6(1), 333-1338.
- Liao, S. M., Liang, G. E., Zhu, J., Lu, B. O., Peng, L. X., Wang, Q. Y., & Huang, R. B. (2019). Influence of calcium ions on the thermal characteristics of α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus* sp. GXS-BL. *Protein and peptide letters*, 26(2), 148-157.
- Ling, H., Chuan, L., Rosfarizan, M., & Ariff, A. B. (2009). Characterization of pullulanase type II from *Bacillus cereus* H1. 5. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 5(4), 170-179.
- Lonsane, B. K., & Ramesh, M. V. (1990). Production of bacterial thermostable α -amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. *Advances in applied microbiology*, 35, 1-56.
- Luo, X., & Zhang, L. (2010). Immobilization of penicillin G acylase in epoxy-activated magnetic cellulose microspheres for improvement of biocatalytic stability and activities. *Biomacromolecules*, 11(11), 2896-2903.
- Maalej, H., Maalej, A., Affes, S., Hmidet, N., & Nasri, M. (2021). A Novel Digestive α -Amylase from Blue Crab (*Portunus segnis*) Viscera: Purification, Biochemical Characterization and Application for the Improvement of Antioxidant Potential of Oat Flour. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1070.
- Madika, A., Ameh, J. B., & Machido, D. A. (2017). Production of Alpha Amylase by *Bacillus subtilis* Using Maize Husk as Substrate. *Journal of Advances in Microbiology*, 1-9.
- Mahato, R. K., Fatema, I. T., & Rajagopalan, G. (2021). Thermostable, Solvent, Surfactant, Reducing Agent and Chelator Resistant α -Amylase from *Bacillus* Strain IBT108: A Suitable Candidate Enables One-Step Fermentation of Waste Potato for High Butanol and Hydrogen Production. *Waste and Biomass Valorization*, 12(1), 223-238.
- Manimaran, M., & Kannabiran, K. (2018). Alpha amylase activity of *Streptomyces* sp. VITMK1 isolated from marine soil sample of Pichavaram, Tamil Nadu, India. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(6), 2180-2182.
- Marc, J. E. C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of biotechnology*, 94(2), 137-155.

- Markets and Markets, RPL. (2016). Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food & Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region - Global Forecast to 2022. MarketsandMarkets Research Private Ltd, 1-160.
- Martin, M. F., Okpo, E. A., & Andy, I. E. (2019). Microbial amylases: A review. *World News of Natural Sciences*, 22.
- Marvdashti, L. M., Abdolshahi, A., Hedayati, S., Sharifi-Rad, M., Iriti, M., Salehi, B., & Sharifi-Rad, J. (2018). Pullulan gum production from low-quality fig syrup using *Aureobasidium pullulans*. *Cellular and Molecular Biology*, 64(8), 22-26.
- Matpan Bekler, F., Güven, K., & Gül Güven, R. (2020). Purification and characterization of novel α -amylase from *Anoxybacillus ayderensis* FMB1. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1-11.
- Mc Mahon, L. R., Majak, W., McAllister, T. A., Hall, J. W., Jones, G. A., Popp, J. D., & Cheng, K. J. (1999). Effect of sainfoin on in vitro digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. *Canadian Journal of Animal Science*, 79(2), 203-212.
- Mc Tigue, M. A., Kelly, C. T., Doyle, E. M., & Fogarty, W. M. (1995). The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(6), 570-573.
- Melvin, M. A. (1979). The effect of extractable lipid on the viscosity characteristics of corn and wheat starches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30(7), 731-738.
- Michelin, M., Silva T.M., Benassi V.M., Peixoto-Nogueira S.C., Moraes L.A., Leao J.M., Jorge J.A., Terenzi H.F. & Polizeli Mde L. (2010). Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydrate Research*, 345 (16), 2348-2353.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mizuno, M., Koide, A., Yamamura, A., Akeboshi, H., Yoshida, H., Kamitori, S., & Tonozuka, T. (2008). Crystal structure of *Aspergillus niger* isopullulanase, a member of glycoside hydrolase family 49. *Journal of molecular biology*, 376(1), 210-220.
- Mobini-Dehkordi, M., & Javan, F. A. (2012). Application of alpha-amylase in biotechnology. *Journal of Biology and Today's World*, 1(1), 39-50.
- Mohanani, N., & Satyanarayana, T. (2019). Amylases. 107-126.

- Moubasher, H., Wahsh, S. S., & El-Kassem, N. A. (2010). Purification of pullulanase from *Aureobasidium pullulans*. *Microbiology*, 79(6), 759-766.
- Mrkeberg, R., Carlsen, M., & Nielsen, J. (1995). Induction and repression of α -amylase production in batch and continuous cultures of *Aspergillus oryzae*. *Microbiology*, 141(10), 2449-2454.
- Msarah, M. J., Ibrahim, I., Hamid, A. A., & Aqma, W. S. (2020). Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus* spp. and its application in food waste biodegradation. *Heliyon*, 6(6), e04183.
- Mukhtar, S., Shahid, I., Mehnaz, S., & Malik, K. A. (2017). Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Microbiological research*, 205, 107-117.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., Vining, G. G., Borrer, C. M., & Kowalski, S. M. (2004). Response surface methodology: a retrospective and literature survey. *Journal of quality technology*, 36(1), 53-77.
- Naganthran, A., Masomian, M., Rahman, R. N. Z. R. A., Ali, M. S. M., & Nooh, H. M. (2017). Improving the efficiency of new automatic dishwashing detergent formulation by addition of thermostable lipase, protease and amylase. *Molecules*, 22(9), 1577.
- Najafi, M. F., & Kembhavi, A. (2005). One step purification and characterization of an extracellular α -amylase from marine *Vibrio* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 535-539.
- Niehaus, F., Peters, A., Groudieva, T., & Antranikian, G. (2000). Cloning, expression and biochemical characterisation of a unique thermostable pullulan-hydrolysing enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus aggregans*. *FEMS microbiology letters*, 190(2), 223-229.
- Nigam, P., & Singh, D. (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(9), 770-778.
- Nisha, M., & Satyanarayana, T. (2013a). Characterization of recombinant amylopullulanase (gt-apu) and truncated amylopullulanase (gt-apuT) of the extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* NP33 and their action in starch saccharification. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(14), 6279-6292.
- Nisha, M., & Satyanarayana, T. (2013b). Thermostable archaeal and bacterial pullulanases and amylopullulanases. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. Springer, Dordrecht, 535-587.

- Nithya, K., Muthukumar, C., Kadaikunnan, S., Alharbi, N. S., Khaled, J. M., & Dhanasekaran, D. (2017). Purification, characterization, and statistical optimization of a thermostable α -amylase from desert actinobacterium *Streptomyces fragilis* DA7-7. *3 Biotech*, 7(5), 1-13.
- Nonaka, T., Fujihashi, M., Kita, A., Hagihara, H., Ozaki, K., Ito, S., & Miki, K. (2003). Crystal structure of calcium-free α -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-K38 (AmyK38) and its sodium ion binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 24818-24824.
- Odibo, F. J. C., & Obi, S. K. C. (1988). Purification and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermoactinomyces thalophilus*. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 3(6), 343-350.
- Okafor, D. C., Ofoedu, C. E., Nwakaudu, A., & Daramola, M. O. (2019). Enzymes as additives in starch processing: A short overview. *Enzymes in Food Biotechnology*, 149-168.
- Oluwadamilare, L. A., Dzorbenya, A. G., & Adekunle, F. (2019). A review of literature on isolation of bacteria α -amylase. *international research journal of engineering & technology*, 6(1), 1333-1342.
- Oussadi, M, I. (2018). Sélection et Optimisation de la production d' α -amylases par *Streptomyces* sp.20r par la méthodologie des surfaces de réponse. Clonage et expression de deux gènes. Thèse de doctorat, Université de Constantine.
- Oussadi, M. I., Kitouni, M. (2015). Statistical optimization of cultural conditions of an halophilic alpha-amylase production by halophilic *Streptomyces* sp. grown on orange waste powder. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 685-693.
- Ozdemir, S., Fincan, S. A., Karakaya, A., Enez, B., 2018. A novel raw starch hydrolyzing thermostable α -amylase produced by newly isolated *Bacillus mojavensis* SO-10: purification, characterization and usage in starch industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 61.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Review-Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31, 135-152.
- Paul, J. S., Beliya, E., Tiwari, S., Patel, K., Gupta, N., & Jadhav, S. K. (2020). Production of biocatalyst α -amylase from agro-waste 'rice bran' by using *Bacillus tequilensis* TB5 and standardizing its production process. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101648.

- Paul, J. S., Gupta, N., Beliya, E., Tiwari, S., & Jadhav, S. K. (2021). Aspects and Recent Trends in Microbial α -Amylase: a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-50.
- Peixoto-Nogueira, S. C., Sandrim, V. C., Guimarães, L. H. S., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., & Polizeli, M. L. T. M. (2008). Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source. *Bioprocess and biosystems engineering*, 31(4), 329-334.
- Pigman, W. W., Wolfrom, M. L., & Peat, S. (1948). *Advances in carbohydrate chemistry*. Academic Press.
- Pinjari, A. B., & Kotari, V. (2018). Characterization of extracellular amylase from *Bacillus* sp. strain RU1. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 6, 29-34.
- Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305-325.
- Poornima, R., Sahu, M. K., Sivakumar, K., & Pushpavalli, V. (2008). Optimization of α -amylase production by *Actinomyces* strain AE-19 isolated from shrimp pond. *Trends in Applied Sciences Research*, 3(1), 45-52.
- Prajapati, V. S., Trivedi, U. B., & Patel, K. C. (2015). A statistical approach for the production of thermostable and alkophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 under solid-state fermentation. *3 Biotech*, 5(2), 211-220.
- Prakash, N., Gupta, S., Ansari, M., Khan, Z. A., & Suneetha, V. (2012). Production of economically important products by the use of pullulanase enzyme. *International Journal of Science Innovations and Discoveries*, 2(2), 266-273.
- Puhl, A. A., Selinger, L. B., McAllister, T. A., & Inglis, G. D. (2009). *Actinomyces keratinilytica* sp. nov., a keratin-degrading actinobacterium isolated from bovine manure compost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(4), 828-834.
- Puhl, A. A., Selinger, L. B., McAllister, T. A., & Inglis, G. D. (2009). *Actinomyces keratinilytica* sp. nov., a keratin-degrading actinobacterium isolated from bovine manure compost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(4), 828-834.
- Qian, M., Haser, R., & Payan, F. (1993). Structure and Molecular Model Refinement of Pig Pancreatic α -Amylase at 2.1 Å Resolution. *Journal of molecular biology*, 231(3), 785-799.

- Raman, N. M., Shah, P. H., Mohan, M., & Ramasamy, S. (2015). Improved production of melanin from *Aspergillus fumigatus* AFGRD105 by optimization of media factors. *AMB Express*, 5(1), 1-9.
- Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G. D., & Levine, M. J. (1996). Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 52(3), 435-446.
- Rashid, N., Shehzad, A., Ahmad, N., Hussain, Z., & Haider, M. S. (2018). Valorization of waste foods using pullulan hydrolase from *Thermococcus kodakarensis*. *Amylase*, 2(1), 39-43.
- Ratanakhanokchai, K., Kaneko, J., Kamio, Y., & Izaki, K. (1992). Purification and properties of a maltotetraose-and maltotriose-producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*. *Applied and environmental microbiology*, 58(8), 2490-2494.
- Rathore, D. S., & Singh, S. P. (2021). Kinetics of growth and co-production of amylase and protease in novel marine actinomycete, *Streptomyces lopnurensis* KaM5. *Folia Microbiologica*, 66(3), 303-316.
- Rathore, D. S., Malaviya, K., Dobariya, A., & Singh, S. P. (2020). Optimization of the production of an amylase from a marine actinomycetes *Nocardopsis dassonvillei* strain KaS11. In *Proceedings of the National Conference on Innovations in Biological Sciences (NCIBS)*.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Beevi Ummalyima, S., Abraham, A., Kuruvilla Mathew, A., Madhavan, A., & Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food technology and biotechnology*, 56(1), 16-30.
- Ray, R. C., Kar, S., Nayak, S., & Swain, M. R. (2008). Extracellular α -amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521. *Food Biotechnology*, 22(3), 234-246.
- Regiant, A. M., Frollini, E., Marson, G. A., & El Seoud, O. A. 1998. Second International Symposium on Natural Polymers and composites. 235-239.
- Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., & Gautieri, A. (2018). Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL bioengineering*, 2(1), 011501.
- Roy, J. K., & Mukherjee, A. K. (2013). Applications of a high maltose forming, thermo-stable α -amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. *Biochemical engineering journal*, 77, 220-230.
- Rüdiger, A., Jorgensen, P. L., & Antranikian, G. (1995). Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and

- expression of its gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental microbiology*, 61(2), 567-575.
- Sai-Ut, S., Benjakul, S., Sumpavapol, P., & Kishimura, H. (2014). Optimization of gelatinolytic enzyme production by *B. amyloliquefaciens* sp. H11 through Plackett–Burman design and response surface methodology. *International Aquatic Research*, 6(1), 1-10.
- Santos, É. R.D., Teles, Z. N. S., Campos, N. M., Souza, D. A. J. D., Bispo, A. S. D. R., & Nascimento, R. P. D. (2012). Production of α -amylase from *Streptomyces* sp. SLBA-08 strain using agro-industrial by-products. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55, 793-800.
- Saoudi, B., Habbeche, A., Kerouaz, B., Haberra, S., Romdhane, Z. B., Tichati, L., & Ladjama, A. (2015). Purification and characterization of a new thermoalkaliphilic pectate lyase from *Actinomadura keratinilytica* Cpt20. *Process Biochemistry*, 50(12), 2259-2266.
- Savcheko, A., Vieille, C., Kang, S., & Zeikus, J. C. (2002). *Pyrococcus* α -amylase is stabilized by calcium and zinc. Department of biochemistry and molecular biology. University east Lausing, 111-123.
- Saville, B. A., Khavkine, M., Seetharam, G., Marandi, B., & Zuo, Y. L. (2004). Characterization and performance of immobilized amylase and cellulase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 113(1), 251-259.
- Schomburg, D., & Salzmann, M. (1991). Enzyme handbook. In *Enzyme Handbook*. Springer, Berlin, Heidelberg. 1-1175.
- Semache, N., Benamia, F., Kerouaz, B., Belhaj, I., Bounour, S., Belghith, H., & Djeghaba, Z. (2021). Artificial Neural Networks and Response Surface Methodology approach for optimization of an eco-friendly and detergent-stable lipase production from *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29. *Acta Chimica Slovenica*, 68(3), 575-586.
- Sen, S. K., Dora, T. K., Bandyopadhyay, B., Mohapatra, P. K. D., & Raut, S. (2014). Thermostable alpha-amylase enzyme production from hot spring isolates *Alcaligenes faecalis* SSB17–statistical optimization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 218-226.
- Sharma, A., & Satyanarayana, T. (2013). Microbial acid-stable α -amylases: characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*, 48(2), 201-211.
- Sharma, D., Nagpal, R., Agrawal, S., Bhardwaj, N., & Mahajan, R. (2021). Eco-friendly Bleaching of Agrowaste Wheat Straw Using Crude Alkalo-Thermotolerant Cellulase-Free Xylano-Pectinolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-15.

Références bibliographiques

- Shirling, E. T., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16(3), 313-340.
- Shivlata, L., & Satyanarayana, T. (2017). Characteristics of raw starch-digesting α -amylase of *Streptomyces badius* DB-1 with transglycosylation activity and its applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 181(4), 1283-1303.
- Shukla, R. J., & Singh, S. P. (2015). Production optimization, purification and characterization of α -amylase from thermophilic *Bacillus licheniformis* TSI-14. *Starch-Stärke*, 67(7-8), 629-639.
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2017). α -Amylases. In *Current developments in biotechnology and bioengineering*. Elsevier, 3-24.
- Singh, P., & Kumar, S. (2019). Microbial enzyme in food biotechnology. In *Enzymes in food biotechnology*. Academic Press, 19-28.
- Singh, P., Gupta, P., Singh, R., & Sharma, R. (2012). Activity and stability of immobilized alpha-amylase produced by *Bacillus acidocaldarius*. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 3(12).
- Singh, R. S, Singh, T., & Pandey, A. (2019). Microbial Enzymes-An Overview. In: *Advances in Enzyme Technology*. Elsevier, 1-40.
- Singh, R., Kumar, V., & Kapoor, V. (2014). Partial purification and characterization of a heat stable α -amylase from a thermophilic actinobacteria, *Streptomyces sp.* MSC702. *Enzyme research*, 2014.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006). α -Amylases from microbial sources—an overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 173-184.
- Smaoui, S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse).
- Souza, P. M. D., & Magalhães, P. D. O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*, 41, 850-861.
- Subramani, R., & Sipkema, D. (2019). Marine rare actinomycetes: a promising source of structurally diverse and unique novel natural products. *Marine drugs*, 17(5), 249.

Références bibliographiques

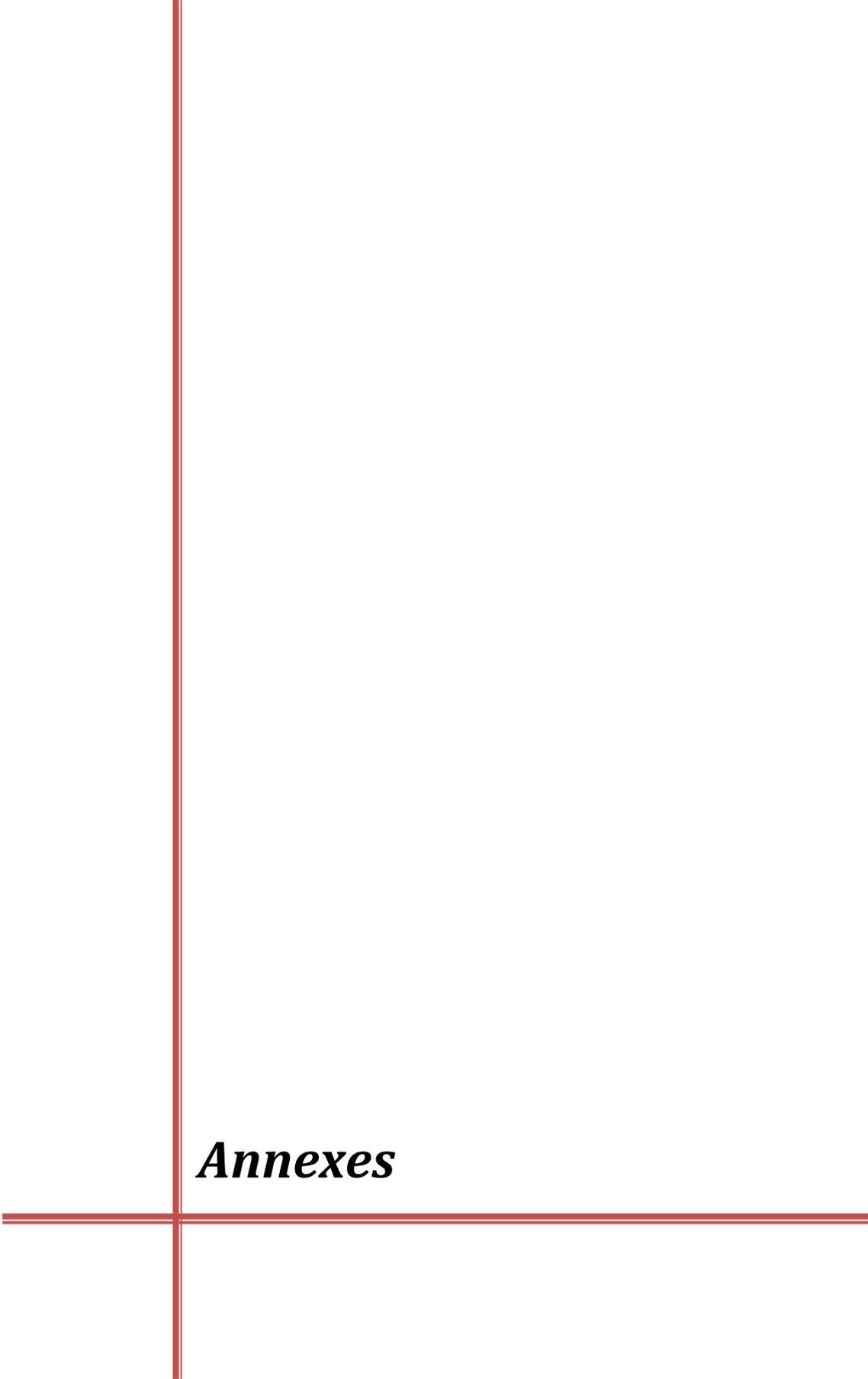
- Sudan, S. K., Kumar, N., Kaur, I., & Sahni, G. (2018). Production, purification and characterization of raw starch hydrolyzing thermostable acidic α -amylase from hot springs, India. *International journal of biological macromolecules*, 117, 831-839.
- Syed, D. G., Agasar, D., & Pandey, A. (2009). Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 189-194.
- Taibi, Z., Saoudi, B., Boudelaa, M., Trigui, H., Belghith, H., Gargouri, A., & Ladjama, A. (2012). Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(3), 663-679.
- Talamond, P., Desseaux, V., Moreau, Y., Santimone, M., & Marchis-Mouren, G. (2002). Isolation, characterization and inhibition by acarbose of the α -amylase from *Lactobacillus fermentum*: comparison with *Lb. manihotivorans* and *Lb. plantarum* amylases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 133(3), 351-360.
- Talekar, S., & Chavare, S. (2012). Optimization of immobilization of α -amylase in alginate gel and its comparative biochemical studies with free α -amylase. *Recent Research in Science and Technology*, 4(2).
- Talekar, S., Ghodake, V., Kate, A., Samant, N., Kumar, C., & Gadagkar, S. (2010). Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(10), 4760-4765.
- Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F. C., Al Nasr, K., & Zhou, S. (2019). Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular biotechnology*, 61(8), 579-601.
- Timilsina, P. M., Pandey, G. R., Shrestha, A., Ojha, M., & Karki, T. B. (2020). Purification and characterization of a noble thermostable algal starch liquefying alpha-amylase from *Aeribacillus pallidus* BTPS-2 isolated from geothermal spring of Nepal. *Biotechnology Reports*, 28, e00551.
- Tinsson, W. (2010). *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques*. Springer Science & Business Media, 67.
- Trabelsi, S., Ben Mabrouk, S., Kriaa, M., Ameri, R., Sahnoun, M., Mezghani, M., & Bejar, S. (2019). The optimized production, purification, characterization, and application in the bread making

- industry of three acid-stable alpha-amylases isoforms from a new isolated *Bacillus subtilis* strain US586. *Journal of food biochemistry*, 43(5), e12826.
- Ulya, M., Oesman, F., & Iqbalsyah, T. M. (2019). Low molecular weight alkaline thermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. nov. *Heliyon*, 5(7), e02171.
- Uzun, U., Demirci, E., & Akatin, M. Y. (2018). Purification and characterization of *Rhizoctonia solani* AG-4 strain ZB-34 α -amylase produced by solid-state fermentation using corn bran. *Turkish Journal of Biochemistry*, 43(3), 257-267.
- Varel, V. H., & Kreikemeier, K. K. (1994). Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract (Amaferm) on in situ fiber degradation, ruminal fermentation, and microbial protein synthesis in nonlactating cows fed alfalfa or bromegrass hay. *Journal of animal science*, 72(7), 1814-1822.
- Veesar, I. A., Solangi, I. B., & Memon, S. (2015). Immobilization of α -amylase onto a calix [4] arene derivative: Evaluation of its enzymatic activity. *Bioorganic chemistry*, 60, 58-63.
- Vivier, S. (2002). Stratégies d'optimisation par la méthode des Plans d'Expériences, et Application aux dispositifs électrotechniques modélisés par Eléments Finis. These de doctorat, Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille I.
- Walden, P. (1896). Ueber die gegenseitige Umwandlung optischer Antipoden. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 29(1), 133-138.
- Waleed, M., Faiza, A. A., & Nizar, I. (2015). Production optimization of pullulanase enzyme produced by *Bacillus cereus* isolated from Syrian sources. *International Food Research Journal*, 22(5).
- Wang, C. H., Lu, L. H., Huang, C., He, B. F., & Huang, R. B. (2020). Simultaneously improved thermostability and hydrolytic pattern of alpha-amylase by engineering central beta strands of TIM barrel. *Applied biochemistry and biotechnology*, 192(1), 57-70.
- Wang, S., Lin, C., Liu, Y., Shen, Z., Jeyaseelan, J., & Qin, W. (2016). Characterization of a starch-hydrolyzing α -amylase produced by *Aspergillus niger* WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 7(1), 1.
- Wang, X., Kan, G., Ren, X., Yu, G., Shi, C., Xie, Q., & Betenbaugh, M. (2018). Molecular cloning and characterization of a novel α -amylase from Antarctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. M175 and its primary application in detergent. *BioMed research international*, 3258383.

- Wei, W., Ma, J., Chen, S. Q., Cai, X. H., & Wei, D. Z. (2015). A novel cold-adapted type I pullulanase of *Paenibacillus polymyxa* Nws-pp2: in vivo functional expression and biochemical characterization of glucans hydrolyzates analysis. *BMC biotechnology*, 15(1), 1-13.
- Whistler, R. L., & Daniel, J. R. (1984). Molecular structure of starch. In RL Whistler, JN Bemiller, EF Paschall, eds, *Starch: Chemistry and Technology*, Ed 2. Academic Press, New York, 153-182.
- Whitman, W. B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Ludwig, W., & Suzuki K.I. (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology. The Actinobacteria, Part A. 5*, 2nd edition, Springer New York, Dordrecht Heidelberg London.
- Wu, S. H., & Chen, D. H. (2003). Synthesis and characterization of nickel nanoparticles by hydrazine reduction in ethylene glycol. *Journal of Colloid and Interface Science*, 259(2), 282-286.
- Wu, X., Wang, Y., Tong, B., Chen, X., & Chen, J. (2018). Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423. *International journal of biological macromolecules*, 109, 329-337.
- Xian, L., Wang, F., Luo, X., Feng, Y. L., & Feng, J. X. (2015). Purification and characterization of a highly efficient calcium-independent α -amylase from *Talaromyces pinophilus* 1-95. *PLoS one*, 10(3), e0121531.
- Xu, T. L., Jing, P., Zhu, Y. L., Su, L., Zhou, K. Y., Cheng, H. N., & Zhou, H. B. (2019). Yield enhancement of recombinant α -Amylases in *Bacillus amyloliquefaciens* by ARTP mutagenesis-screening and medium optimization. *Sains Malaysiana*, 48(5), 965-974.
- Yang, H., Liu, L., Shin, H. D., Chen, R. R., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2013). Structure-based engineering of histidine residues in the catalytic domain of α -amylase from *Bacillus subtilis* for improved protein stability and catalytic efficiency under acidic conditions. *Journal of biotechnology*, 164(1), 59-66.
- Yassin, A. F., Spröer, C., Siering, C., & Klenk, H. P. (2010). *Actinomadura sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pulmonary infection. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(1), 149-153.
- Yoo, Y. J., Feng, Y., Kim, Y. H., & Yagonia, C. F. J. (2017a). Enzymes for Food and Energy. In *Fundamentals of Enzyme Engineering*. Springer, Dordrecht, 163-179.
- Yoo, Y. J., Feng, Y., Kim, Y. H., & Yagonia, C. F. J. (2017b). Production of Enzymes. In: *Fundamentals of Enzyme Engineering*. Springer Netherlands, Dordrecht, 23-33.

Références bibliographiques

- You, M. K., & Park Y. K. (1996). A new method for the selective isolation of actinomycetes from soil. *Biotechnology Techniques*, 10 (7),541-546.
- Zafar, A., Aftab, M. N., ud Din, Z., Aftab, S., Iqbal, I., & ul Haq, I. (2016). Cloning, purification and characterization of a highly thermostable amylase gene of *Thermotoga petrophila* into *Escherichia coli*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178(4), 831-848.
- Zhi, X. Y., Li, W. J., & Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(3), 589-608.
- Zobel, H. F. (1984). Gelatinization of starch and mechanical properties of starch pastes. In *Starch: Chemistry and technology*. Academic Press, 285-309.
- Zou, J., Xu, M., Wen, L., & Yang, B. (2020). Structure and physicochemical properties of native starch and resistant starch in Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.). *Carbohydrate polymers*, 237, 116188.



Annexes

Annexe 1

Milieux de culture et différentes solutions

1. Milieux de culture

Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage 20 min à 120°C.

- **L'ISP 2 solide**

Ce milieu est préconisé par Shirling et Gottlieb de *l'International Streptomyces Project* ou *ISP Shirling et Gottlieb, (1966)*

- Extrait de levure.....4 g
- Extrait de malt.....10 g
- Glucose.....4 g
- Agar.....20 g
- H₂O distillée.....1000 g
- pH.....7.2

- **L'ISP2 liquide**

- Extrait de levure.....4 g
- Extrait de malt.....10 g
- Glucose.....4 g
- H₂O distillée.....1000 g
- pH.....7.2

- **Milieu de culture solide à base d'amidon**

- Amidon soluble.....10 g
- Extrait de l'extrait de levure.....5 g
- Agar.....20 g
- H₂O distillée.....1000 ml
- pH.....6.5

- **Milieu de production : Milieu YST liquide à base d'amidon pour la production des amylases**

➤ Amidon.....	10 g
➤ Extrait de levure.....	5 g
➤ Tryptone.....	5 g
➤ CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,5 g
➤ MgCl ₂ .6H ₂ O.....	0,5 g
➤ KH ₂ PO ₄	1 g
➤ H ₂ O distillée.....	1000 ml
➤ pH.....	6.5

2. Différente solution

Solutions tampons

- **Tampon acétate de Sodium 50 mM, pH (5.0-5.5)**

➤ Acétate de sodium.....	4,10 g
➤ Acide acétique glacial.....	2,85 g
➤ l'eau distillée.....	1000 ml

- **Tampon phosphate 20 M, pH 7 :**

➤ Solution (A) : dissoudre 35,61 g de Na ₂ HPO ₄ dans 1 l d'eau distillée
➤ Solution (B) : dissoudre 27,6 g de NaH ₂ PO ₄ dans 1 l d'eau distillée

Mélanger 77 ml de la solution (A) et 23 ml de la solution (B).

- **Tampon phosphate 50 mM, pH (6.0-7.5) :**

➤ Solution (A) : dissoudre 17,8 de Na ₂ HPO ₄ Dans 1 l d'eau distillée
➤ Solution (B) : dissoudre 15,6 g de NaH ₂ PO ₄ Dans 1 l d'eau distillée

Mélanger 39 ml de la solution (A) et 11 ml de la solution (B).

- **Tampon Tris-HCl 50 mM, pH (8.0-9.0)**

➤ Tris 0,05 M.....	50 ml
➤ HCl 0,05 M.....	0,2 ml

Annexes

- Eau distillée.....49,8 ml
 - **Tampon Glycine NaOH 50 mM, pH (9.0-12.0)**
- Glycine 0,05 M.....50 ml
- NaOH 0,05 M.....0,2 ml
- Eau distillée.....49,8 ml

Solution de Lugol

- Iodure de potassium.....2 g
- Iode métalloïde I₂.....1 g
- Eau distillée.....100 ml

Annexe 2

Méthodes d'analyse

1. Dosage des protéines

Le dosage a été effectué selon la méthode de Bradford (**Bradford M., 1976**).

➤ Préparation de réactif de Bradford

Dans une fiole jaugée de 1 litre, on dissout :

Bleu de Coomassie G250100 mg

Ethanol 95%50 ml

Agitation pendant 2 heures puis, on ajoute :

Acid ortho phosphorique100 ml

H₂O distillée q.s.p1000 ml

➤ Réalisation de la gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (SAB)

A partir d'une solution mère contenant 1 mg/ml SAB, une série de dilution décimale est préparé (**Tableau 15**)

Tableau 16 : Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (BSA).

Tubes	1	2	3	4	5	6
SAB (µl)	00	20	40	60	80	100
Eau distillée µl	100	80	60	40	20	00
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

➤ **Courbe d'étalonnage de Bradford**

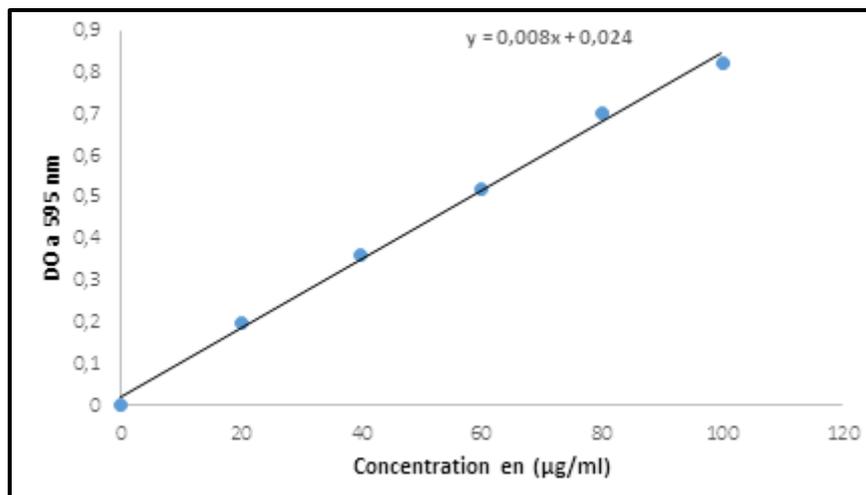


Figure 35: Courbe d'étalonnage de la BSA.

2. Dosage des sucres réducteurs

Le dosage a été effectué selon la méthode de Miller (1959).

➤ **Préparation de réactif de DNSA:**

DNS.....1g

NaOH.....30 ml (2M)

Sous chauffage et agitation, puis on ajoute :

Tartrate double Na, K.....30 g

Eau distillée.....100 ml

Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière.

➤ **Réalisation de la gamme d'étalonnage de maltose.**

A partir d'une solution mère contenant 2 mg/ml de maltose, une série de dilution est préparé (**Tableau 13**)

Tableau 17 : Gamme d'étalonnage du maltose.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution maltose (ml)	0	200	400	600	800	1000
Eau distillée µl	1000	800	600	400	200	0
Réactif DNS(ml)	2	2	2	2	2	2
(maltose) en mg	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2

➤ **Courbe d'étalonnage du maltose**

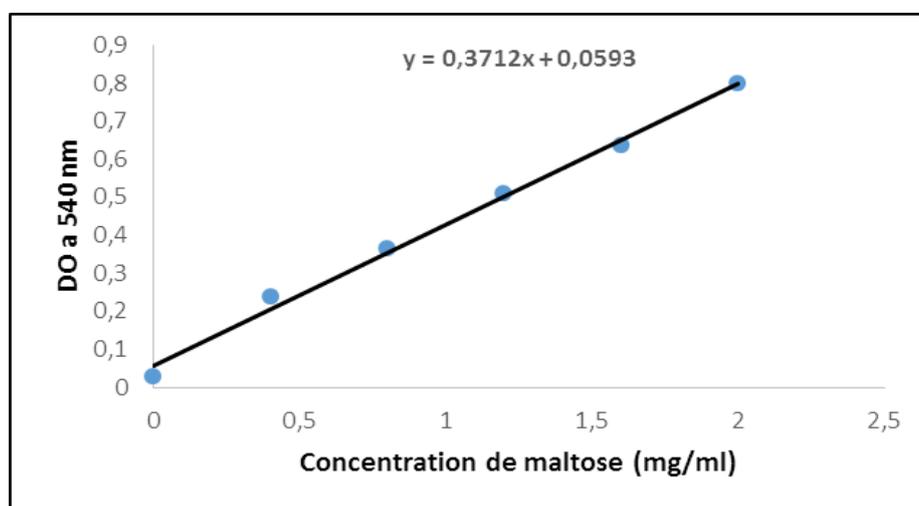


Figure 36: Courbe d'étalonnage de maltose.

3. Electrophorèse (SDS-PAGE)

Les protéines sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% (**Tableau 14**) en présence de SDS selon la méthode de Laemmli (**laemmli, 1970**). La préparation du gel de polyacrylamide en présence de SDS est obtenue par polymérisation d'acrylamide qui forme des chaînes et de bis-acrylamide qui pontent les chaînes d'acrylamide. La réaction de polymérisation est initiée par la formation de radicaux libres par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par le TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyl-1,2-diaminométhane-toxique).

➤ **Compositions de gel d'acrylamide et solutions pour électrophorèse**

❖ **Solution : Acrylamide – Bisacrylamide :**

- Acrylamide 30 g
- Bisacrylamide 0,8 g
- H₂O q.s.p 100 ml

Filtrer et stocker à 4°C à l'abri de la lumière.

❖ **Solution : tampon gel de séparation : Tris HCl 1,5M, pH = 8.8**

- Tris base..... 36,3 g
- HCl 1N 48 ml
- H₂O q.s.p 100 ml

Filtrer et stocker à 4°C.

❖ **Solution : tampon gel de concentration : Tris HCl 1,5 M, pH = 6.8**

- Tris base..... 6 g
- HCl 1N 48 ml
- H₂O q.s.p 100 ml

Filtrer et stocker à 4°C

❖ **Solution : tampon de migration : (Tris 0,25 M, Glycine 1,92 M, pH=8.3)**

- Tris base..... 15,1 g
- Glycine 72 g
- SDS 0,1%.....5 g
- H₂O q.s.p 1000 ml

Conservation à 4°C.

❖ **Solution de persulfate d'ammonium :**

Dissoudre 10g de persulfate d'ammonium dans 100 ml d'eau distillée. Cette solution doit se préparer juste au moment de l'emploi (extemporanément).

❖ **Solution : tampon de lyse (tampon d'échantillon) :**

- Tris base (0.5M) pH6.8..... 2,13 ml
- SDS1 g
- Glycerol 10 %..... 5 ml
- Bleu de bromophenol 20 mg
- β -mercaptoethanol 2,56 ml
- H₂O q.s.p..... 10 ml

❖ **Solution de coloration :**

- Acide acétique.....10 ml
- Ethanol absolue.....45 ml
- H₂O45 ml
- BBC (R250).....0.25 g

❖ **Solution de décoloration :**

- Acide acétique.....10 ml
- Ethanol absolue.....45 ml
- H₂O45 ml

➤ **Préparation et migration du gel pour l'électrophorèse SDS-PAGE**

Le gel de polyacrylamide est préparé selon la méthode décrite par **Laemmli**.

Tableau 18: Composition du gel de polyacrylamide 10%.

Composants	Gel de séparation (10%)	Composants	Gel de concentration (5%)
H ₂ O	4 ml	H ₂ O	3,4 ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	2,5 ml	1.5M Tris-HCl pH 6.8	830 µl
Acrylamide 30%	3,3 ml	Acrylamide 30%	630 µl
APS 10%	100 µl	APS 10%	50 µl
SDS 10%	100 µl	SDS 10%	50 µl
TEMED	4 µl	TEMED	4 µl
VOLUME TOTAL	10 ml	VOLUME TOTAL	5 ml

*APS: Persulfate d'ammonium SDS: Sodium Dodécyle Sulfate

- Couler le gel de séparation entre les deux plaques de verre immédiatement après l'ajout de l'APS et le TEMED.
- Démouler le peigne quand le gel est polymérisé et fixer l'ensemble à l'appareil.
- Déposer les échantillons de protéines après ajout de bleu dénaturant (1/10 du volume) et dénaturation pendant 5 min à 100°C.
- Il faut de plus s'assurer que toutes les protéines aient le même point de départ pour la migration, c'est pourquoi nous avons démarré la migration dans un gel de concentration.
- La migration est assurée dans le tampon Tris (25mM)-glycine (192mM) contenant 0.1% SDS à ampérage constant (70 mV) et arrêter exactement quand le "bleu de bromophenol" atteint le bas du gel.
- La révélation est effectuée par deux méthodes :
 - ✓ Imprégnation pendant une nuit dans une solution de coloration constituée de bleu de Coomassie 0,25% dans un mélange éthanol-eau-acide acétique glacial. La décoloration est réalisée dans un solvant composé de: éthanol-eau-acide acétique jusqu'à décoloration complète du gel, les bandes correspondants aux protéines restent colorées en bleu.

➤ Courbe de détermination de la masse molaire par électrophorèse

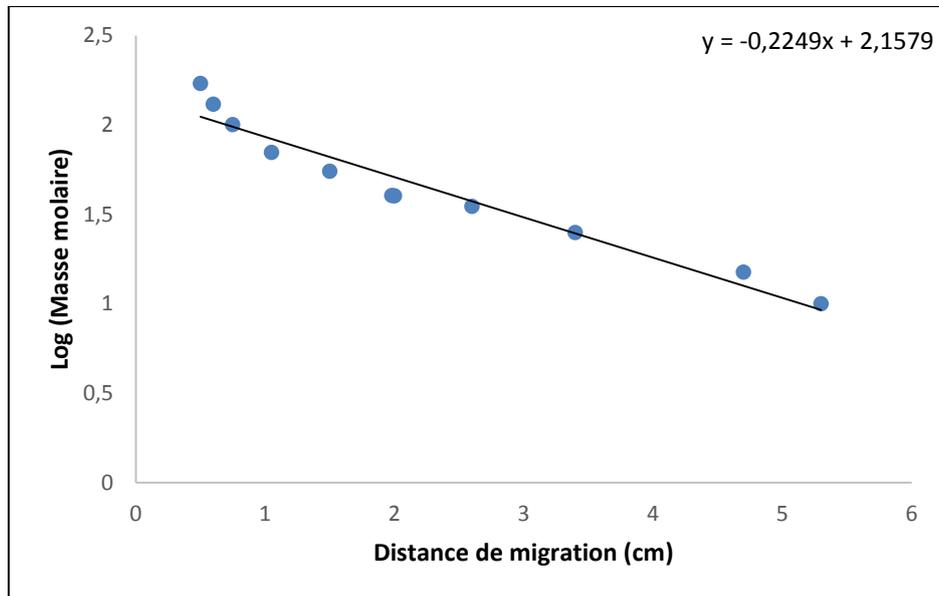


Figure 37: Courbe de la masse molaire en fonction de la distance de migration.

Annexe 3

Préparation du support d'immobilisation

1. Produits chimiques utilisés

Les réactifs suivant ont été utilisés dans la synthèse de nanoparticules d'oxyde de nickel : Chlorure de nickel hydroxyde d'hydrazinium, éthylène glycol, dichlorométhane (DMC), NaOH, Le polyfluorure de vinyldène-co-hexafluoropropylène (PVDF-co-HFP), 2-nitrophényl octyl éther (2-NPOE) et l'eau Ultra-Pure

2. Synthèse de nanoparticules NiO

La méthode de synthèse de Wu et Chen (**Wu et Chen, 2003**) a été employée dans la synthèse de nanoparticules NiO. Selon la méthode, environ 2,5 à 45 mM de de chlorure de nickel a été dissoute dans de l'éthylène glycol. Ensuite, (0,05-0,9 M) d'hydrazine et une solution de NaOH (1,0 M) ont été ajoutés dans la solution de chlorure de nickel en maintenant la température à 60°C. Le mélange résultant a été agité par un Agitateur PTFE à hélice à 3000 tr/min pendant une heure. La formation de nanoparticules de nickel par réduction chimique de l'hydrazine peut être observée à l'œil nu par la sortie de gaz de la solution et la formation de solide noir. La dernière étape consiste à centrifuger le mélange obtenue à 20 000 tr/min. La phase solide noire résultante (culot) représente les nanoparticules de nickel. Ces derniers ont été séchés dans une étuve à 200°C pour éliminer les résidus organiques.

3. Synthèse du film membranaire PVDF-co-HFP-NiO

Le polymère a été préparé par dissolution de PVDF-co-HFP, de plastifiant (2-NPOE) et de nanoparticule de NiO dans 20 ml d'acétone, respectivement. La solution a été vigoureusement agitée par un agitateur magnétique à température ambiante ($25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$) pendant une heure pour obtenir une solution homogène. Après avoir assuré la dissolution de tous les ingrédients dans la solution de polymère, le mélange a été soniqué par bain à ultrasons Elmasonic (Pfinztal-Söllingen, Allemagne) pendant 30 min à température ambiante. Ensuite, la colle polymère préparée a été versée dans une boîte de Pétri en verre et placée sur la table plate, dont la planéité a été contrôlée par une jauge d'eau, et a été laissée à l'évaporation de l'acétone

Annexes

pendant la nuit. Le film polymère de couleur noire restant a été trempé dans l'eau glacée pour le retirer rapidement et en douceur de la surface du verre.

Le film (PVDF-co-HFP-NiO) résultant a été lavé avec de l'eau déminéralisée (eau ultra-pure Milli-Q) à quelques reprises puis coupée en petites capsules (25 mg) et stocké dans un dessiccateur jusqu'à utilisation.