

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA-BEJAIA

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Microbiologie

Filière : Science Biologiques

Spécialité : Biotechnologie Microbienne



Réf.....

Mémoire de fin de cycle en vue
de l'obtention du diplôme
MASTER
Thème

**Caractérisation partielle d'extraits enzymatiques
amylolytiques synthétisée par des halophiles
extrêmes**

Réalisé par : BERRAKI YANIS & BENMOUHOUB YACINE
Déposé le 19 Septembre 2021

Devant le Jury composé de :

Président:	Mr. BOUDJOUAN.	MCB
Promoteur:	Mr. NOURI.	MCB
Examineur:	Mme. BOUKTIT.	MAA

Année universitaire 2020/2021

REMERCIEMENTS :

Nos vifs remerciements sont d'abord adressés à **Monsieur Hamid NOURI** notre encadreur et **Mlle BOUDJELAL Aya** qui se sont toujours montrés à l'écoute, leurs conseils précieux et leur rigueur scientifique ont été déterminants pour la réalisation de ce travail.

Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance aux membres du jury :

Monsieur BOUDJOUAN de nous avoir honorés de présider le jury de la soutenance.

Mme BOUKTIT d'avoir bien accepté d'examiner le contenu du présent travail.

Nos remerciements vont à tout le personnel du laboratoire de microbiologie appliquée

Ainsi qu'à nos collègues pour le climat et l'ambiance dont on avait besoin.

Table des matières

Liste des tableaux :	1
Liste des figures :	2
Liste des Abréviations	3
I. Introduction :	4
Chapitre 1 : synthèse bibliographique
I. Diversité du monde extrêmophile	5
A. Les conditions de vie dans les environnements extrêmes :	5
1. Température :	5
2. pH :	6
3. Salinité :	6
B. Microorganismes extrêmophiles :	6
1. Thermophiles :	6
2. Acidophiles et basophiles :	7
3. Halophiles :	7
II. L'enzyme halophile :	11
A. Activité enzymatique dans des conditions hypersalines :	11
B. Les amylases halophiles :	11
1. Mode d'action :	11
2. Caractéristiques :	12
Chapitre 2 : Matériels et méthodes :
I. Matériel biologique utilisé :	16
II. Production des amylases dans le milieu liquide :	16
A. Mise en culture des isolats :	16
B. Récupération de l'extrait enzymatique :	17
III. Dosage des activités enzymatiques selon la méthode de DNS	17
1. Principe :	17
2. Préparation de la solution de DNS :	17
3. Protocole expérimental :	17

IV.	Caractérisation biochimique d'extrait enzymatique :	19
1.	Effet du pH sur l'activité des amylases :	19
2.	Test de l'effet de la salinité :	20
3.	Test de l'effet de la température :	20
4.	Test de la stabilité thermique des enzymes :	20
5.	Test de l'activité enzymatique dans différents solvants organiques :	21
	Chapitre 3 : Résultats et discussions :
I.	Effet du pH sur l'activité enzymatique :	22
II.	Effet de la température sur l'activité enzymatique :	24
A.	Température :	24
B.	Stabilité thermique :	27
III.	Effet de la concentration du NaCl sur l'activité enzymatique :	30
IV.	Effet des solvants sur l'activité enzymatique :	32
	Conclusion :	35
	Références bibliographiques :	36

Liste des tableaux

Tableau I : les types de Halo-tolérance en fonction de la concentration en NaCl.	8
Tableau II : Caractéristiques de certaines amylases halophiles.	13
Tableau III : Composition des tampons utilisés lors du test du pH.....	19

Liste des figures

Figure 1 Courbe d'etalonnage de glucose.....	18
Figure 2: Effet du pH sur l'activité d'Amy1.....	23
Figure 3: Effet du pH sur l'activité d'Amy2.....	23
Figure 4: Effet du pH sur l'activité d'Amy3.....	24
Figure 5: Effet de la température sur l'activité d'amy1.....	25
Figure 6: Effet de la température sur l'activité d'amy2.....	26
Figure 7: Effet de la température sur l'activité d'Amy3.....	26
Figure 8: Stabilité thermique d'Amy1.....	28
Figure 9: Stabilité thermique d'Amy2.....	29
Figure 10: Stabilité thermique d'Amy3.....	29
Figure 11: Effet du NaCl sur l'activité de Amy1.....	31
Figure 12: Effet du NaCl sur l'activité de Amy2.....	31
Figure 13: Effet du NaCl sur l'activité d'Amy3.....	32
Figure 14:Activité enzymatique d'Amy1, Amy2 et Amy3 dans différents solvants organiques.....	34
Figure 15:Activité enzymatique de Amy1, Amy2 et Amy3 dans les détergents Tween 20 et Twe.....	34

Liste des abréviations

Amy1 : Extrait enzymatique amylolytique issu de l'isolat 1

Amy2 : Extrait enzymatique amylolytique issu de l'isolat 2

Amy3 : Extrait enzymatique amylolytique issu de l'isolat 3

DNS : Acide 3,5-dinitrosalicylique

Introduction

Les halophiles extrêmes sont des microorganismes prometteurs de par les conditions extrêmes dans lesquelles ils arrivent à croître ce qui leur donne un intérêt biotechnologique et industriel notamment la recherche de substances bioactives capables de maintenir leurs activités dans des conditions de salinité extrêmes. Les plus importantes de ces molécules bioactives sont les enzymes.

Les enzymes catalysent les réactions chimiques avec une grande spécificité. Ces réactions sont à la base du métabolisme de tous les organismes vivants et offrent à l'industrie de formidables possibilités de réaliser des conversions biocatalytiques élégantes efficaces et économiques (Robinson, 2015), Elles sont utilisées dans plusieurs industries et leur importance augmente d'année en année.

Par rapport à l'utilisation intensive des « extremozymes » des bactéries ou des archées thermophiles et acidophiles, très peu d'enzymes halophiles ont jusqu'à présent trouvé des applications dans l'industrie et la biotechnologie (Eichler, 2001). Pourtant certaines enzymes telles que l'amylase de *Haloarcula sp*, qui est active de manière optimale à 4,3 M en NaCl à 50°C, présente une stabilité dans plusieurs solvants tels que le benzène, le toluène et le chloroforme présentent un intérêt certain (Fukushima et al., 2005).

Plusieurs études récentes sont parues sur la conversion des polymères végétaux et animaux dans des conditions de forte salinité, y compris la production de biocarburants. Une souche de *Haloarcula* isolée d'une mine de sel turque a montré une activité cellulolytique considérable à haute salinité (DasSarma & DasSarma, 2015). La visée de notre travail dans cette étude est la caractérisation partielle d'amylases issues de 3 isolats halophiles extrêmes.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée du centre de recherche de l'université Abderrahmane Mira de Béjaïa.

Chapitre 1 : Bibliographie

I. Diversité du monde extrémophile

Le terme extrémophile a été établi en 1970 par RD MacElroy pour décrire les micro-organismes qui se développent dans des environnements extrêmes (Mariscal & Brunet, 2020), Les termes acidophiles, halophiles et thermophiles ont été utilisés dans la littérature depuis le début du 20ème siècle (Hendry, 2006).

La majeure partie de la surface de la terre (>80%) est constituée d'environnements extrêmes (Jorquera et al., 2019). Les conditions extrêmes comprennent les conditions extrêmes physiques (température, rayonnement ou pression) et les conditions extrêmes géochimiques (dessiccation, salinité, pH et potentiel redox) (Rothschild & Mancinelli, 2001)

A. Conditions de vie dans les environnements extrêmes

Un environnement est extrême lorsque l'une ou plusieurs des conditions physiques ou chimiques influent négativement et inhibent la vie dans ce milieu.

1. Température

La température crée une série de défis : de la dévastation structurelle provoquée par les cristaux de glace, à la dénaturation des biomolécules par l'augmentation de la température. La solubilité des gaz dans l'eau est aussi influencée par la température, ce qui crée des problèmes à haute température pour les organismes aquatiques qui ont besoin d'O₂ ou de CO₂ (Rothschild & Mancinelli, 2001).

Les environnements de froid extrêmes sont représentés par les eaux des fonds marins et des glaciers, les eaux de surface au niveau des lacs ou des étendues d'eau gelés..., etc.

Les environnements de chaleur extrêmes sont représentés par les sources thermales, les cheminées volcaniques des fonds marins..., etc.

2. pH

Le pH influe sur le développement et la croissance des microorganismes, des pH trop élevés ou trop bas dénaturent les protéines et les enzymes, cette dénaturation résulte de la perturbation des liaisons hydrogène ce qui modifie la structure tridimensionnelle, entraînant une altération de la forme de la protéine qui peut être réversible si les variations de pH ne sont pas trop importantes (Scoon, 2018).

3. Salinité

Les concentrations élevées en sel affectent la conformation structurelle des protéines. En général, les conditions salines favorisent la solubilité et déstabilisent la forme repliée mais aussi altèrent la pression osmotique exercée sur les microorganismes du milieu (Madern et al., 2000).

B. Microorganismes extrêmophiles

1. Thermophiles

Les extrêmophiles comportent les thermophiles qui selon la définition de Karl Stetter sont tous les microorganismes vivant à des températures supérieures à 45°C, avec les thermophiles extrêmes dont la température optimale de croissance est comprise entre 65 et 80°C et les hyperthermophiles dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C (Alain et al., 2012). Les organismes les plus hyperthermophiles sont des archées, avec *Pyrolobus fumarii*, un chimiolithoautotrophe nitrate réducteur, capable de se développer à des températures atteignant les 113°C (Madigan et Marr, 1997).

2. Acidophiles et basophiles

Les extrêmophiles comportent aussi des micro-organismes adaptés à la vie dans des milieux à faible pH pouvant être inférieurs ou aux alentours de 1 et aussi ils comportent des microorganismes vivant à des pH supérieurs à 10. (Gerday, 2009) L'organisme le plus acidophile connu est *Picrophilus_achemai*, isolé d'un solfatare (terrain volcanique qui dégage des fumerolles sulfureuses) Du Japon. Son pH optimum est de 0,7 et il peut se développer à pH 0.(Fütterer et al., 2004)

3. Halophiles

a) Environnement salins

Il existe deux types de milieux hypersalins, les environnements thalassohalins et athalassohalins :

Les environnements thalassohalins ont une composition ionique reflétant celle de l'eau de mer : le sodium et le chlorure sont les ions dominants, et le pH est proche de la neutralité voire légèrement alcalin (Oren, 2002), ces milieux sont d'origine océanique où l'évaporation progressive des eaux de mer transforme des étendues d'eau de mer fermée en milieu hypersalin (Daoud & Ben Ali, 2020). Exemples :

- Étangs d'évaporation et étangs de cristallisation qui sont des bassins d'évaporation naturelle ou artificiels avec de très grandes surfaces conçues pour évaporer efficacement l'eau sous l'effet de la lumière du soleil.
- Les mares de saumure qui sont des lacs de saumure situés sur le fond d'une plaine abyssale océanique. Ces mares sont des étendues d'eau dont la salinité est supérieure à celle de l'océan environnant.

Les environnements athalassohalins ont une composition ionique différente de celle de l'eau de mer (Oren, 2002), la salinité de ces milieux est due à l'érosion des roches continentales causées par les pluies et le passage des eaux souterraines libère des sels comme le H₂S dans l'eau, le pH de ces milieux varie selon les endroits.

Exemples : Les rivières salées se jettent généralement dans des lacs salés. On sait peu de choses sur les plages de salinité et les variations saisonnières, mais la présence d'au moins une espèce halophile a été observée.

Dans la wilaya de Bejaia, on trouve plusieurs salines naturelles comme les Salines d'Imellahen et salines de Belayel commune d'Ighil Ali.



Image1 : saline de Belayel d'Ighil Ali



Image2 : Saline d'Iadnanène

b) Classification des halophiles :

Le tableau N°1 a été établie selon la classification de Kushner et Kamekura qui définissent différentes catégories de microorganismes halophiles en fonction de la concentration optimale en sel à laquelle ils présentent une croissance optimale.(Aharon Oren, 2013a)

Tableau 1 : les types de Halo-tolérance en fonction de la concentration en NaCl.

Halo-tolérance	Concentration en NaCl	Exemple
Non-halophile	0.2 M	La plupart des bactéries d'eau douce
Halophile faible	0.2–0.5 M	Les micro-organismes marins
Halophile modéré	0.5–2.5 M	<i>Salinivibrio costicola</i>
Halophile extrême limite	1.5–4.0 M	<i>Halorhodospira halophila</i>
Halophile extrême	2.5–5.2 M	<i>Halobacterium salinarium</i>

c) Répartition phylogénétique des halophiles :

Selon la base de données fournies par HaloDom (<http://halodom.bio.auth.gr>) (consulté le 08/09/2021) qui répertorie plus de 1200 espèces de microorganismes halophiles, on peut constater que sur tous les organismes halophiles répertoriés à ce jour 21,6% font partie du domaine *Archea*, 52,3% font partie du domaine *Bacteria* et 26,1% de *Eucaryota*.

Chez les archées, les halophiles sont répartis en 5 ordres, l'ordre *Haloferacales* comportant 39,5% de toutes les archées halophiles, l'ordre des *Halobacteriales* comprenant 34,5%, l'ordre des *Natrialbales* comprenant 22,5%, l'ordre des *Methanosarcinales* comprenant 3% et l'ordre des *Methanomicrobiales* comprenant moins de 1% d'entre eux.

Chez les bactéries, on retrouve des organismes halophiles répartis sur 5 phylums avec 42,4% chez les *Proteobacteria*, 39,4% chez les *Firmicutes*, 11,7% chez les *Actinobacteria*, 4% chez les *Bacteroidetes* et 2,5% chez les *Cyanobacteria*.

Chez les champignons, on retrouve des espèces halophiles dans les 4 phylums *Glomeromycota* comprenant 5,7%, *Bigyra* comprenant 1,2%, *Ascomycota* comprenant 83,6% et *Basidiomycota* comprenant 9,5 %.

d) Stratégies d'adaptation :

Pour pouvoir survivre dans des milieux salins, les microorganismes halophiles ont adopté différentes stratégies qui varient selon les espèces, ces stratégies ont pour objectif de réguler et supprimer la différence d'osmolarité entre le milieu intracellulaire et extracellulaire afin d'éviter la génération d'une pression osmotique sur la membrane plasmique conduisant à la lyse cellulaire du microorganisme.

- La stratégie "Salt in" utilisée par l'ordre des *Halobacteriales* (*Archaea* aérobies) et par l'ordre des *Haloanaerobiales* (bactéries anaérobies) où l'équilibre osmotique est obtenu par l'accumulation de concentrations élevées en sels inorganiques dans le milieu assurant ainsi un équilibre osmotique en égalisant la différence en solutés entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire hypersalin. Les ions Na⁺ sont

exclus autant que possible des cellules dans les trois domaines de la vie, la stratégie "Salt in" est basée sur Salt Cl plutôt que sur le NaCl comme principal sel intracellulaire. (Gueriau & Vannier, 2014)

- La stratégie "Low Salt in" est adoptée par la plupart des bactéries halophiles et halotolérantes à l'exception des Haloanaerobiales (Daoud & Ben Ali, 2020) , les archées halophiles méthanogènes garantissent l'équilibre osmotique entre le cytoplasme et le milieu extérieur en accumulant et/ou en biosynthétisant des solutés organiques (Kempf & Bremer, 1998). Il a été démontré que de nombreux composés organiques appartenant à différentes classes servent de solutés compatibles dans différents groupes de micro-organismes, notamment les polyols, les sucres, les acides aminés, les bêtaïnes, les éctoïnes, les diaminoacides N-acétylés et les carboxamides N-dérivés de la glutamine. (Gunde-Cimerman et al., 2018).

La régulation de la concentration en ions est possible grâce à l'action du système de transport d'ions composé de pompes ioniques.

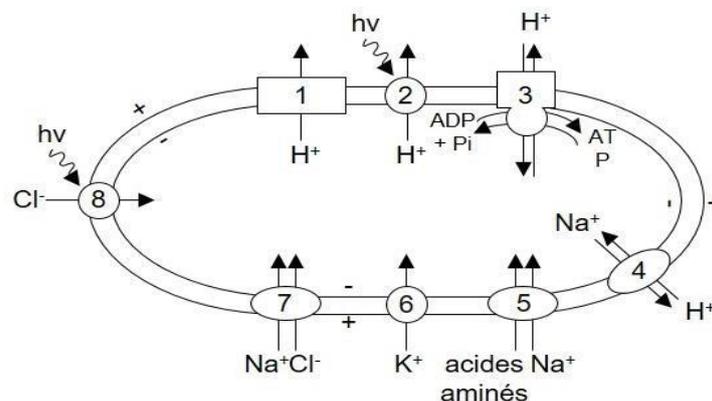


Schéma 1: différents systèmes de transport d'ions chez les archées halophiles aérobies.

Les numéros 1 et 6 désignent des transporteurs, 2 et 8 des transporteurs qui utilisent l'énergie lumineuse ($h\nu$ = Photon), 3 représente une ATP synthase, 4, 7 et 8 des transporteurs couplés. ATP: adenosine triphosphate, ADP: adenosine diphosphate, Pi : phosphate (Aharon Oren, 2013b).

II. Enzyme halophile

A. Activité enzymatique dans des conditions hypersalines

Les molécules d'eau se liant à la surface et en s'incorporant à l'intérieur des molécules de protéines, l'eau a tendance à former des cages ordonnées autour des groupes hydrophobes à la surface des protéines mais les ions salins sont connus pour perturber la structure locale de l'eau diminuant le nombre de liaisons hydrogène intermoléculaires. Des concentrations élevées en sel affectent de manière critique la solubilité, la liaison, la stabilité et la cristallisation des protéines.(Karan et al., 2012)

Les enzymes doivent s'adapter pour entrer en compétition avec les sels pour l'hydratation afin d'éviter l'agrégation des protéines en réduisant le nombre de résidus hydrophobes à la surface des protéines.(Amoozegar et al.,2003.)

Dans des conditions extrêmement limitées en eau, les liaisons hydrogène entre les chaînes latérales chargées négativement et les molécules d'eau deviennent essentielles pour maintenir une enveloppe d'hydratation stable (DasSarma & DasSarma, 2015).

B. Amylases halophiles

1. Mode d'action :

Les amylases sont des hydrolases d'amidon avec plusieurs séquences en acides aminés qui sont hautement conservées entre les membres de la famille .(Liu, 2014)

Selon le mécanisme de dégradation de l'amidon, les molécules sont divisées en trois catégories α -amylase, β -amylases et amyloglucosidases (Dakhmouche-Djekrif, 2016).

Les α -Amylase réduit la viscosité de l'amidon en lysant les liaisons au hasard, produisant ainsi des chaînes de glucose de taille variable. Les β -Amylases rompent les liaisons glucose-glucose en retirant deux unités de glucose à la fois, produisant ainsi du maltose. Les amyloglucosidases sont les enzymes qui rompent les liaisons successives à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne, produisant ainsi du glucose. (Sindhu et al., 2017)

1. Caractéristiques :

Le tableau II ci-après regroupe des informations sur les caractères d'une trentaine d'amylases d'halophiles extrêmes.

Sur la totalité des amylases halophiles répertoriées dans le tableau, 60% ont un pH d'activité optimal supérieur à 7.

35 amylases ont un pH d'activité optimal allant de 6 à 7 et seulement 3,5% avec un pH inférieur à 6. On suppose que les amylases halophiles extrêmes présentent le plus souvent un caractère alcalinophile.

Quant aux températures optimales d'activité, elles varient d'un minimum de 35°C jusqu'à un maximum de 80°C.

On remarque également que la masse moléculaire varie fortement selon l'enzyme étudiée allant de 31 kDa jusqu'à 110 kDa.

Tableau II : Caractéristiques de certaines amylases halophiles.

NOM DE LA SOUCHE /AMYLASE	Poids moléculaire kDa	Température Optimale °C	pH optimal	[NaCl] Optimale	NaCl Tolérance	Référence
<i>(MCCC 1A01486)</i>	66 kDa	35 °C	7	1.5 M	0M-4M	(Qin et al., 2014)
<i>Sp. TVSP 101</i>	72 kDa	65°C	9	3,5M	0-3,5M	(Prakash et al., 2009)
<i>Sp. TVSP 101</i>	62 kDa	65°C	9	3,5M	0-3,5M	(Prakash et al., 2009)
<i>Wsp1</i>	78 kDa	35°C	6	1 M	1M	(Verma et al., 2020)

<i>Nesterenkonia</i> sp. strain F	110 kDa	45 °C	7–7.5	0.25 M	0–4 M	(Shafiei et al., 2012)
<i>Bacillus</i> <i>lichineformis</i> AH214	N/d	40°C	7.5	1.5 M	0- 1.5 M	(Aida & Hanan, 2016)
<i>Nesterenkonia</i> sp. strain F	100-106 kDa	45 °C	7.5	0.5 M	0–4 M	(Shafiei et al., 2012)
<i>Aspergillus gracilis</i>	35 kDa	60°C	5	5 M	0-5 M	(Ali et al., 2014)
<i>Haloferax</i> <i>mediterranea</i>	58 kDa	50– 60 °C.	7 –8	3 M	2– 4 M	(Pérez-Pomares et al., 2003)
<i>Aspergillus</i> <i>penicillioides</i>	42 kDa	80°C	9	5 M	0-5 M	(Ali et al., 2015)
<i>Haloarcula</i> sp. strain D61	N/d	35-40 °C	6.0	3-5 M	3-5 M	(Siroosi et al., 2021)
<i>Halomonas</i> <i>meridiana</i>	N/D	37°C	7	2M	0-5 M	(Coronado, Vargas, Hofemeister, et al., 2000)
<i>Lactobacillus</i> <i>Plantarum</i> TS1	10 kDa	50°C	10	2M	1-4M	(Riaz et al., n.d.)
<i>Halophile</i> <i>Halomonas</i> <i>meridiana</i>	49 kDa	37°C	7	2M	2M-5M	(Coronado, Vargas, Mellado, et al, 2000)
<i>Exiguobacterium</i> sp. DAU5	57 kDa	40 °C	8.5	2M	1-2M	(Chang et al., 2013)

<i>/amy13</i>						
<i>Streptomyces sp. D1</i>	66kDa	45 °C	9	2M	-	(Chakraborty et al., 2009)
<i>Halobacillus sp. Strain MA-2</i>	-	50 °C	7.5–8.5	2M	1M-2M	(Amoozegar et al., 2003)
<i>halophilic archaeon Haloarcula hispanica</i>	43.3 kDa	50 °C	6.5	4 M	4M-5M	(Hutcheon et al., 2005)
<i>Halophilic Archaeon Haloarcula japonica</i>	83 kDa	45°C	6.5	1 M	0.5M-5M	(Onodera et al., 2013)
<i>Halophilic Archaeon, Haloferax sp. HA10/</i>	66 kDa	37 °C	7	3 M	0.5-5M	(Bajpai et al., 2015)
<i>Bacillus sp. Strain TSCVKK</i>	-	55 °C	7.5	2M	1,3-2M	(Kanthi Kiran & Chandra, 2008)
<i>Halobacillus sp. LY9</i>		60°C	8	2M	1M-3,5M	(Li & Yu, 2011)
<i>Engyodontium album</i>	50 kDa	60°C	9	5,2M		(Ali et al., 2014)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	50°C	6.5	2 M		(Pan et al., 2020)
<i>Thalassobacillus sp. LY18</i>	31 kDa	70°C	9	2M	0– 3,5M	(Li & Yu, 2012b)
<i>Salimicrobiumhalop</i>	81 kDa	70 °C	10	2M		(Li & Yu,

<i>hilum strain LY20</i>						2012a)
<i>Marinobacter sp.</i> <i>EMB8/amy26</i>	72 kDa	45 °C	7.0	0.2M	0.1–3.5M	(Kumar & Khare, 2012)
<i>haloarchaeon</i> <i>Haloterrigenaturkm</i> <i>enica</i> <i>Marco</i>	66 kDa	55 °C	8.5	2 M	2-3 M	(Santorelli et al., 2016)

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Le travail expérimental a été réalisé dans le laboratoire de recherches de « Microbiologie Appliqué » de l'université Abderrahmane Mira de BEJAIA

I. Matériel biologique utilisé

Trois isolats considérés comme des microorganismes halophiles extrêmes fournis par le laboratoire de Microbiologie Appliqué ont été choisis pour leur activité amylolytique en milieu hyper salin

La production d'amylases par les trois isolats est déjà testée par un screening qualitatif sur milieu Brown solide à base d'amidon.

II. Synthèse des amylases dans le milieu liquide

A. Mise en culture des isolats

Les isolats ont été mis en pré-culture dans des tubes de 5mL de milieu Brown modifié pendant 3 jours à 37°C avec agitation à 150 RPM, avant d'être mise en culture dans les mêmes conditions dans des flacons contenant 50mL de milieu Brown modifié.

Composition du milieu Brown modifié

NaCl : 250g/L

KCl : 2g/L

MgSO₄ : 20g

Citrate tri-sodique : 1g

Extrait de levure : 1g

Eau distillée : 1 L

Amidon : 10g

Avec pH=7

Le renouvellement des milieux de culture est effectué tous les 3 jours pour maintenir les cultures en phase exponentielle.

B. Récupération de l'extrait enzymatique

L'obtention des extraits enzymatique s'effectue en centrifugeant chacune des 3 cultures à 10000 rpm pendant 5min. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut.

III. Dosage des activités enzymatiques selon la méthode de DNS

1. Principe

L'hydrolyse de l'amidon (non réducteur) par des amylases libère le glucose et d'autres saccharide réducteurs qui réduisent en milieu alcalin et à 100°C ; l'acide 3,5-dinitrosalicylique (Jaune) en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (rouge-orange) absorbant la lumière à 540 nm.

2. Préparation de la solution de DNS

2 g de DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) et 40 mL de NaOH 2 M ont été dissous dans 160 ml d'eau distillée. Ensuite, une quantité de 60 g de tartrate double de sodium-potassium a été progressivement ajoutés à ce mélange sous agitation.

3. Protocole expérimental

Le protocole utilisé est celui de Benfeld (1955) avec des modifications apportées aux volumes des réactifs ainsi qu'aux temps des réactions.

3 essais ont été réalisées pour chaque enzyme dans des tubes de 5ml, chacun de ces tubes contient 25µL d'extrait enzymatique et 375µL du tampon dans le quel nous avons solubilisé

1% d'amidon (substrat enzymatique) et 25% de NaCl. Le milieu réactionnel est incubé à 37 °C pendant 30 min avec agitation à 150 RPM, on ajoute ensuite 400µL de solution DNS dans chaque tube, le mélange est homogénéisé et chauffé au bain-marie à 100°C pendant 15 min suivi d'un refroidissement dans un bain glacé pour arrêter l'action du DNS. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 540 nm après ajout de 800µl d'eau distillée. Le blanc enzyme est préparé de la même façon sauf que l'ajout du DNS est effectué avant l'addition de substrat pour éviter la réaction enzymatique (l'activité enzymatique est calculée en unité international par ml (UI/ml)).

4. Courbe d'étalonnage de glucose

- Préparer une solution de glucose à 1%.
- Préparer une série de dilutions dans l'eau distillée.
- Dans des tubes à essai on mélange : 0.4 ml de chaque solution de glucose, et 0.4 ml d'acide dinitrosalicylique (DNS).
- Chauffage de milieu réactionnel dans un bain-marie à 100°C /15min.
- Refroidissement.
- Ajouter 0.8 ml de l'eau distillée.
- Mesure de la DO par spectrophotomètre à 540nm

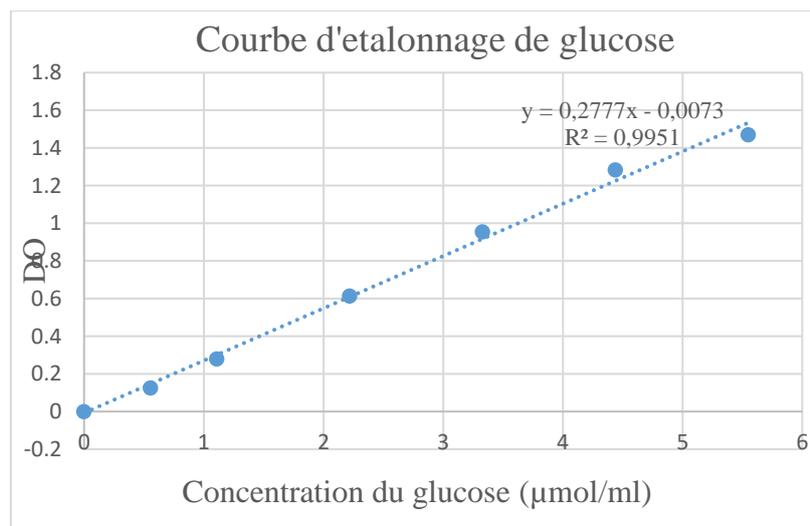


Figure 1 Courbe d'étalonnage de glucose

L'activité enzymatique est déterminée par le rapport suivant :

$$\frac{[Glucose](mol/L)}{\frac{V_E}{V_T} \times Temps(min)} = UI/mL$$

V_E = volume d'enzyme dans la réaction

V_T = volume réactionnel totale

I. Caractérisation biochimique d'extrait enzymatique

1. Effet du pH sur l'activité des amylases

Afin de tester l'effet du pH sur l'activité des enzymes étudiée ; l'activité amylolytique est mesurée (par la méthode de DNS) dans les conditions standards (37°C et 30min) ; on utilisant l'amidon (à 1%) solubilisé dans les différentes solutions tampons : citrate de sodium pH 3, acétate de sodium (4 et 5), phosphate de sodium pH (6 et 7), Tris-HCl (pH 8.0 et 9.0) ; Glycine-NaOH (pH 10, 11 et 12) (à 0.1M et à 25% de NaCl)

Tableau III: Composition des tampons utilisés lors du test du pH.

Nom du tampon	pH	Composition
Tampon Citrate de Sodium	pH 3	Citrate de sodium 0.2759g
		Acide citrique 1.7408g
		NaCl 25 g
		Eau distillée 100 ml
Tampon Acétate de Sodium	pH 4	Acétate de sodium 0.1861g
		NaCl 25 g
	pH 5	Acétate de sodium 0.5524 g
NaCl 25 g		
Tampon Phosphate pH	pH6	Na ₂ HPO ₄ 0.367g
		NaH ₂ PO ₄ 1.191g
	pH 7	NaCl 25 g
		Eau distillée 100 ml
	pH 7	Na ₂ HPO ₄ 15.487g
		NaH ₂ PO ₄ 5.827g
		NaCl 25 g
		Eau distillée 100ml

Tampon Glycine NaOH	pH 10	Glycine	0.75g
		NaOH	0.25g
		NaCl	25 g
		Eau distillée	100ml
	pH 11	Glycine	0.75g
		NaOH	0.4g
		NaCl	25 g
		Eau distillée	100ml
	pH 12	Glycine	0.75g
		NaOH	0.55g
		NaCl	25 g
		Eau distillée	100ml

Les résultats sont exprimés par l'activité relative :

$$\text{Activité relative} = 100 \times \frac{\text{Activité de l'échantillons}}{\text{Activité optimal de l'échantillon}}$$

2. Test de l'effet de la salinité :

L'effet de NaCl sur l'activité enzymatique est testé selon la méthode de DNS par préparation de plusieurs solutions de tampon phosphate (pH 7) contenant 1% d'amidon et différentes concentrations de NaCl (1.56 ; 5; 10; 15; 20; 25 et 30%). Les résultats sont exprimés par l'activité relative.

3. Test de l'effet de la température :

L'activité amylolytique est testée comme d'habitude par la méthode de DNS sauf que le milieu réactionnel est incubé aux différentes températures (10°C, 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C) pendant 30 min en utilisant le pH optimum de chaque enzyme. Les résultats sont exprimés par l'activité relative.

4. Test de la stabilité thermique des enzymes :

Les extraits enzymatiques sont soumis aux différentes températures (60°C, 90°C et 100°C) pendant 2h ; avec des prélèvements de 25µL chaque 15min pendant la 1ère heure suivie de deux prélèvements chaque 30min pendant la 2ème heure. L'activité enzymatique est mesurée

on procède au même protocole de dosage (la méthode de DNS) dans les conditions standards (pH 7, 37°C, 25% NaCl et 30 min) en utilisant les prélèvements enzymatiques obtenus. L'enzyme incubée à 4°C est utilisée comme un control

Les résultats sont exprimés par l'activité **résiduelle**:

$$\text{Activité résiduelle} = 100 \times \frac{\text{Activité des échantillons}}{\text{Activité du control}}$$

5. Test de l'activité enzymatique dans différents solvants organiques :

L'activité enzymatique en présence de solvant organique est testée selon la méthode de DNS 300 µL de chaque solvant sont ajoutés dans 700µL d'extraits enzymatique, on agite pour homogénéiser les mélanges pendant 2h ensuite on prélève 25 µL de ces derniers pour procéder au même protocole que les tests précédents en utilisant un tampon phosphate salé à 25% en NaCl avec 1% amidon, la réaction enzymatique se fait à 37°C sous agitation a 150 RPM. Les extraits enzymatiques incubés avec le tampon Phosphate salé à pH 7 sont utilisés comme contrôles. Les résultats sont exprimés par l'activité résiduelle. Les solvants utilisés : Ethanol, Acétone, Hexane, Tween 20, Tween 80, Propanol, Ether de pétrole.

*Chapitre 3 : Résultats et
discussions*

I. Effet du pH sur l'activité enzymatique

Les profils de pH de l'activité des différents extraits enzymatiques (Amy1, Amy2 et Amy3) sont indiqués respectivement sur les figures 2, 3 et 4. Le pH optimal pour l'activité enzymatique de Amy1 est de 4 avec une stabilité de l'activité jusqu'au pH 5 suivi d'une diminution de celle-ci au fur et à mesure que le pH augmente, l'enzyme perd totalement son activité à partir du pH 11.

L'activité de Amy2 augmente à partir du pH 3 pour atteindre son optimum a pH 6, elle diminue continuellement jusqu'à devenir nulle a pH 11.

Amy3 présente un optimum d'activité a pH 5, son activité devient nulle à partir du pH 10.

L'étude de l'influence du pH sur l'activité enzymatique a montré que les amylases étudiées sont stables aux tampons acides et perdent leurs activités à des valeurs de pH supérieures à 7.

Les résultats obtenus dans cette expérience diffèrent de la plupart des amylases halophiles rapportées (Tableau II) où la plupart de ses enzymes restent stables aux pH alcalins mais légèrement actifs aux pH acides, on retrouve les mêmes résultats chez les amylases des souches WSP1 (Verma et al. 2020), *Haloarcula sp.* Strain D61 (Strain, 2021) avec des pH optimaux de valeur 6 ainsi que l'amylase d'*Aspergillus gracilis* avec un pH optimal de 5.

En comparant nos résultats avec les données du tableau, ils révèlent que Amy1 reste la plus stable aux pH acides avec un pH optimal de 4.

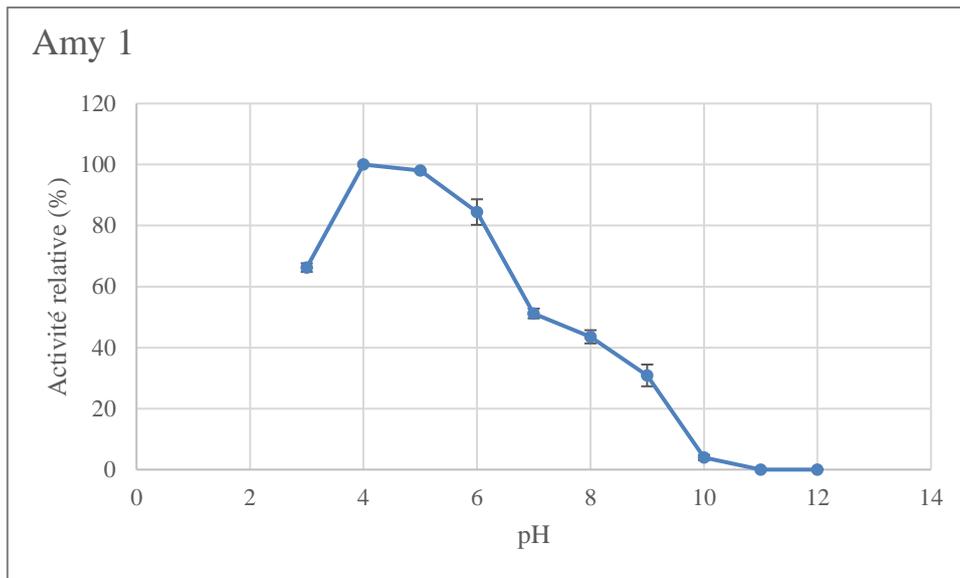


Figure 2: Effet du pH sur l'activité d'Amy1.

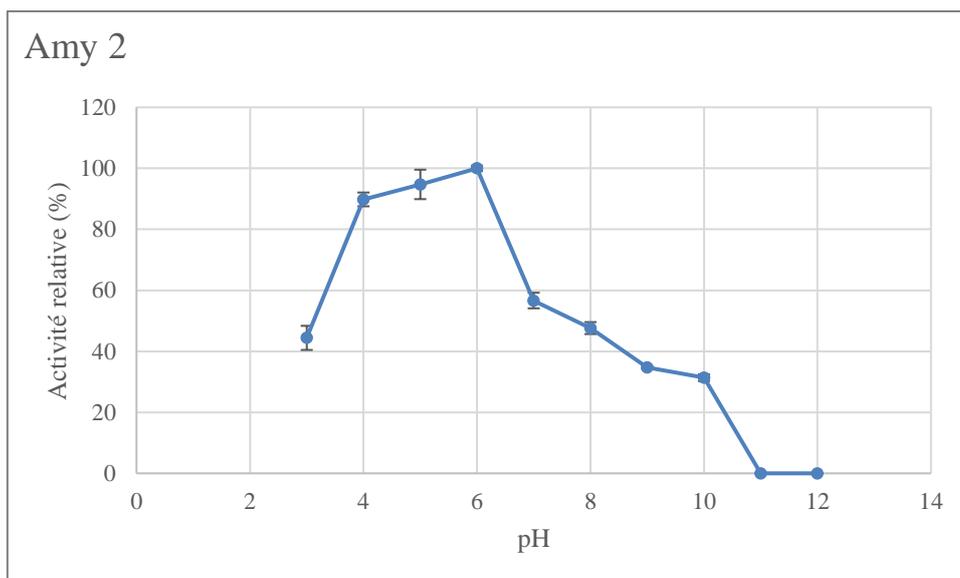


Figure 3: Effet du pH sur l'activité d'Amy2.

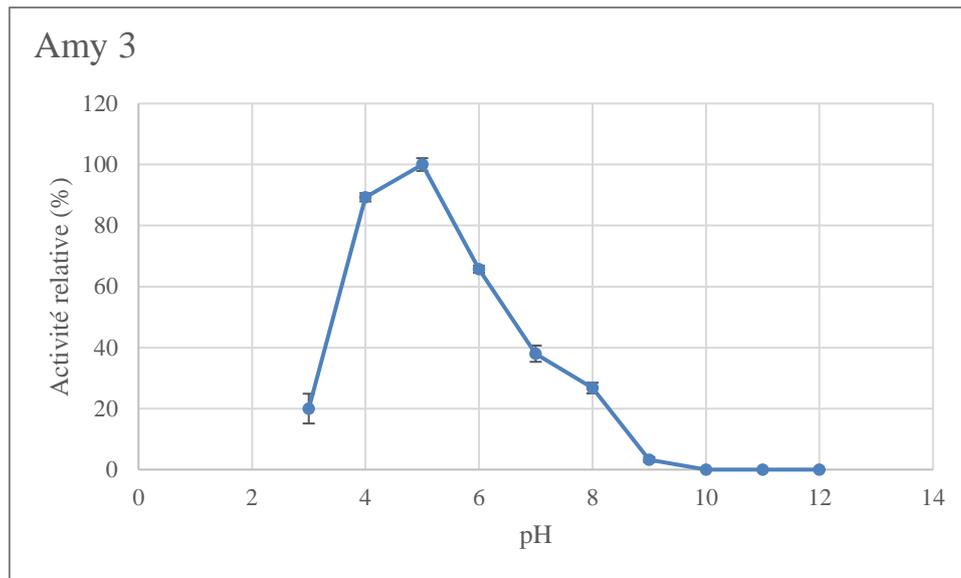


Figure 4: Effet du pH sur l'activité d'Amy3.

V. Effet de la température sur l'activité enzymatique

A. Température

La température optimale d'Amy1 est de 37°C (figure 5) avec une activité enzymatique supérieure à 50% entre 10°C et 45°C, l'activité diminue aux températures élevées jusqu'à atteindre 35% d'activité à 50°C avant d'être nulle à partir de 60°C.

Amy2 garde une activité supérieure à 50% entre 10°C et 50°C, la température optimale est de 45°C (figure 6), son activité chute rapidement aux températures élevées jusqu'à être nulle à partir de 60°C.

Concernant Amy3, sa température optimale est de 40°C (figure 7) avec une activité enzymatique supérieure à 50% entre 20°C et 45°C, l'activité diminue pour atteindre 40% d'activité à 50°C jusqu'à être nul à partir 60°C.

Tous les extrais enzymatiques ont gardé une activité enzymatique supérieure à 50% à 10°C.

Amy2 est l'extrait enzymatique le plus stable à haute température parmi les amylases étudiées, suivi d'Amy3 et d'Amy1, ces résultats sont assez similaires aux données rassemblés dans le tableau II où l'on trouve les mêmes valeurs de températures optimales pour plusieurs

amylases : amylases de *Halomonas meridiana* (Coronado et al. 2000), *Halophilic Archaeon*, *Haloferax sp.* HA10 (Bajpai, et al.2015), ces amylases halophiles présentent la même température optimale qu’Amy1.

La température optimale d’Amy3 est la même que les amylases halophiles produites par les souches suivantes : *Bacillus licheniformis* AH214, *Exiguobacterium sp.* DAU5 (Chang et al., 2013).

Les enzymes ayant une température optimale similaire à Amy2 sont les amylases produites par : *Nesterenkonia sp.* Strain F (Shafiei et al., 2012), *Streptomyces sp.* D1 (Chakraborty et al., 2009), *Halophilic Archaeon* et *Haloarcula japonica* (Onodera et al., 2013).

Les Amylases étudiées présentent une stabilité au froid, cependant elles sont assez instables aux températures élevées, cette propriété peut limiter leurs utilisations industrielles où les procédés nécessitent une telle température, elles restent adéquates pour des applications dans des processus à faibles températures ou des procédés nécessitant une inactivation complète de l’enzyme avec l’augmentation de la température.

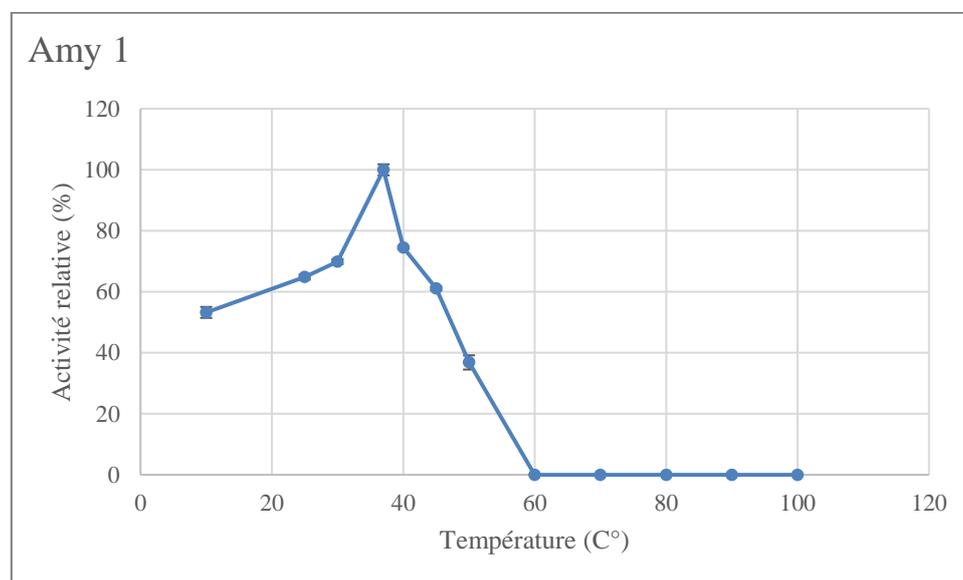


Figure 5: Effet de la température sur l'activité d'amy1.

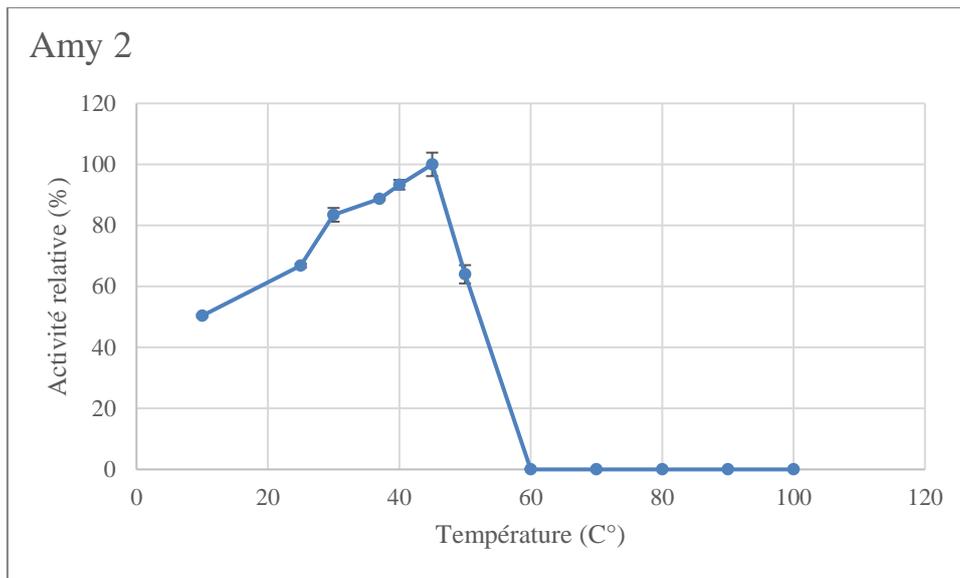


Figure 6: Effet de la température sur l'activité d'amy2.

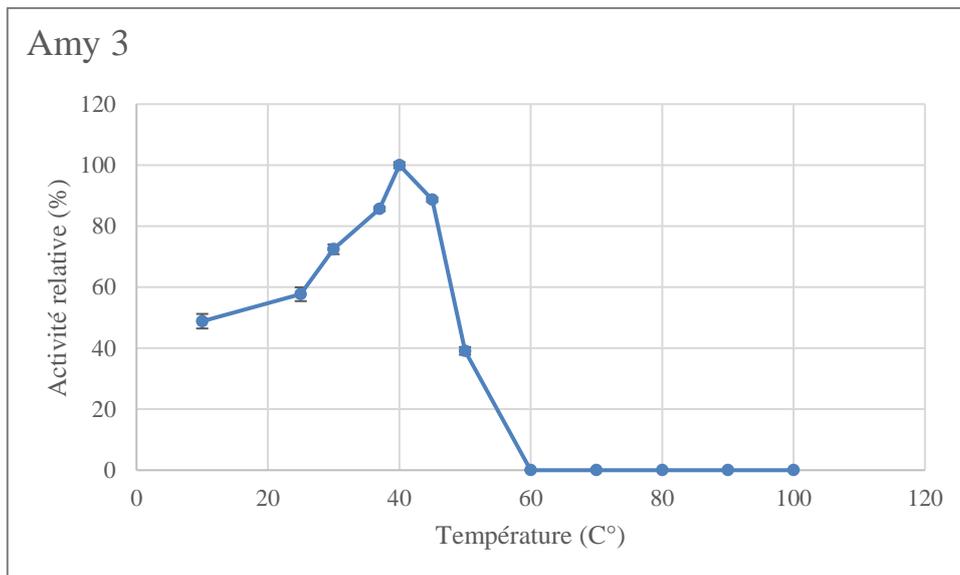


Figure 7: Effet de la température sur l'activité d'Amy3.

B. Stabilité thermique

Les figures 8, 9 et 10 montrent la stabilité thermique des extraits enzymatiques Amy1, Amy2 et Amy3 respectivement, représentés par l'activité résiduelle des enzymes en fonction du temps selon les différentes températures.

La stabilité thermique est testée par une pré-incubation des enzymes dans différentes températures 60°C, 90°C et 100°C pendant 2h, et on a mesuré l'activité amylolytique à des intervalles de temps de 0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min.

Pour Amy1 incubée à 60°C, les résultats montrent que l'enzyme a perdu environ 44% d'activité après 30min d'incubation, alors qu'après 45 ; 60 et 90 min l'enzyme a récupéré son activité avec un taux de perte de 28, 27 et 25% respectivement, cependant l'enzyme garde 50% de son activité après 2h d'incubation.

A 90°C, Amy1 a gardé plus de 50% de son activité pendant 90 minutes, mais après 120 minutes environ 64% de son activité résiduelle est perdue. À 100°C on remarque que durant la première heure d'incubation l'enzyme a perdu plus de 58% de son activité, plus de 52% de l'activité après 1h 30 min et après 2 heures l'enzyme perd 80% de son activité résiduelle.

Les résultats montrent que Amy2 a perdu 40% d'activité après 15min d'incubation à 60°C, elle récupère 12% de son activité après 45min puis elle subit une baisse d'activité graduelle jusqu'à 50% d'activité environ après 2h.

Amy2 a gardé plus de 50% de son activité pendant toute la durée d'incubation à 60°C.

À 90°C, l'activité d'Amy2 est à 70% après 15 minutes et atteint 40 % à la fin du test, Amy2 a gardé seulement 30% environ de son activité à 100°C après 15min, cette dernière se stabilise aux alentours de cette valeur jusqu'après 60min où elle baisse de 10%, l'activité remonte à 40% après 90min d'incubation et baisse de 5% pour atteindre les 35% après 2h.

Amy2 a gardé seulement 30% environ de son activité à 100°C après 15min, cette dernière se stabilise aux alentours de cette valeur jusqu'après 60 min où elle baisse de 10%, l'activité remonte à 40% après 90min d'incubation et baisse de 5% après 2h.

La figure 10 montre la stabilité thermique d'Amy3 à 60°C, 90°C et 100°C pendant 120 minutes également. Les résultats montrent qu'à 60°C, l'activité d'Amy3 baisse jusqu'à atteindre 40% après 15 minutes, puis remonte jusqu'à 65% d'activité après 90 minutes et reste au-dessus 50% jusqu'à la fin du test.

À 90°C, l'activité d'Amy3 se maintient entre 60% et 80% de 15 à 100 minutes pour ensuite diminuer jusqu'à moins de 40% après 2 h d'incubation.

À 100°C d'incubation, l'activité baisse continuellement pour atteindre les 35% après 120 minutes.

Amy1, Amy2 et Amy3 ont gardé plus de 50% d'activité enzymatique pendant 1h30 d'incubation à 90°C.

Curieusement, Amy3 présente une meilleure activité globale à 90°C qu'à 60°C.

Amy1 et Amy3 présentent une activité résiduelle aux alentours de 40% à 100°C pendant 1h30 d'incubation, Amy2 reste l'enzyme la moins stable à 100°C avec des valeurs d'activité inférieures à 40%.

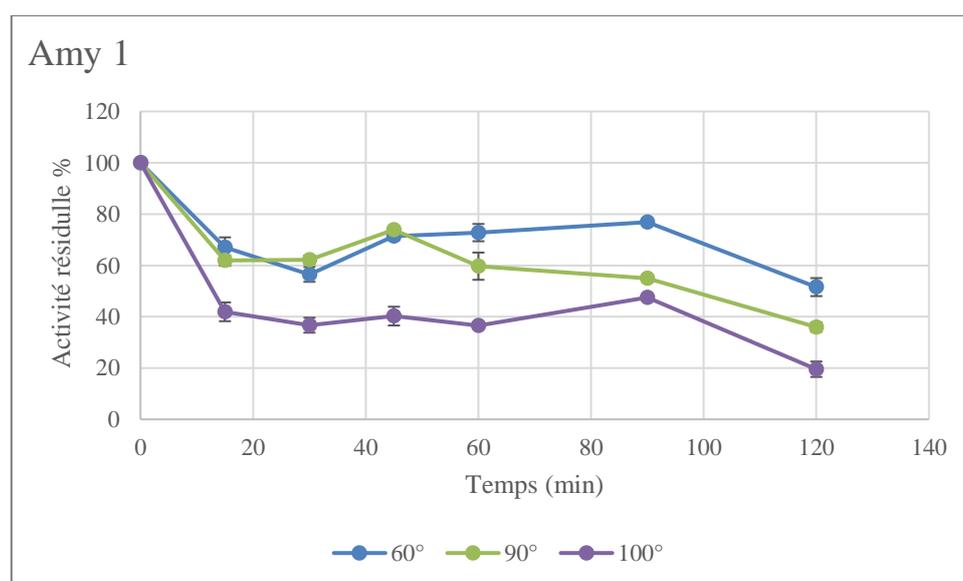


Figure 8: Stabilité thermique d'Amy1.

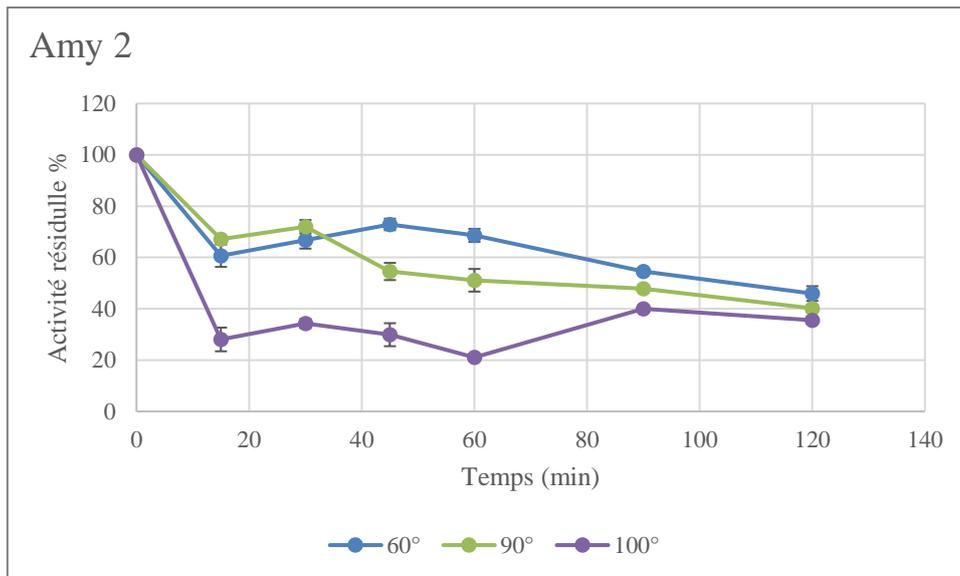


Figure 9: Stabilité thermique d'Amy2.

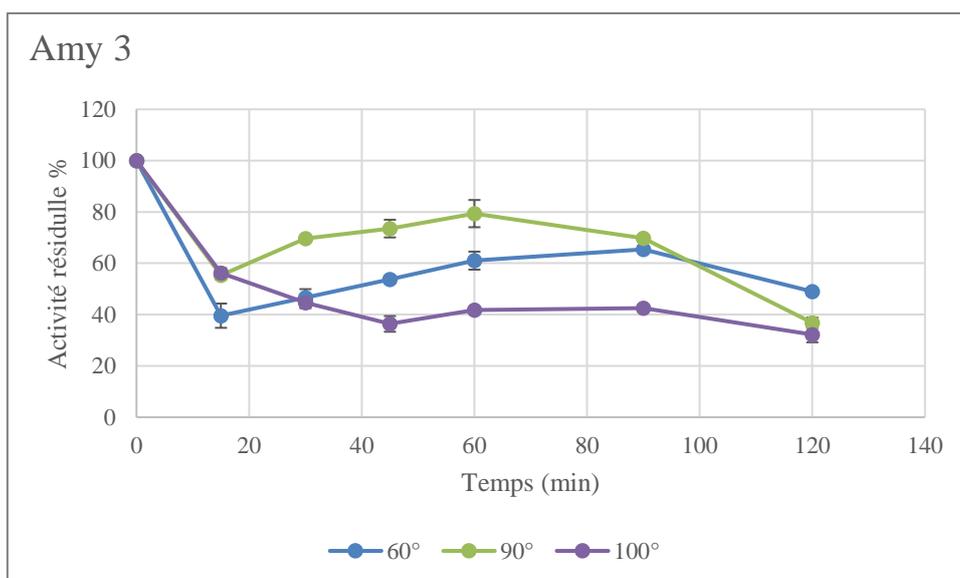


Figure 10: Stabilité thermique d'Amy3.

VI. Effet de la concentration du NaCl sur l'activité enzymatique

Les activités enzymatiques des extraits enzymatique Amy1, Amy2 et Amy3 en fonction des variations de la concentration en NaCl sont représenté dans les figures 11, 12 et 13 respectivement :

De la figure 11 on constate que la concentration optimale en NaCl est de 1,5% pour Amy1, son activité baisse de 5% seulement à 5% de concentration en NaCl, cependant elle chute rapidement pour atteindre 65% de son activité à 10% de concentration en NaCl. À partir de de cette concentration, l'activité d'Amy1 baisse continuellement jusqu'à atteindre plus de 50% d'activité à 30% de concentration en NaCl.

D'après la figure 12 L'activité d'Amy2 augmente progressivement jusqu'à atteindre son optimum à 20% et à 25% de concentration en NaCl pour ensuite baisser jusqu'à 60% environ à 30% de concentration en NaCl.

D'après la figure 13 L'activité d'Amy3 augmente graduellement pour atteindre son maximum à 10% de concentration en NaCl, elle baisse progressivement jusqu'à atteindre sa valeur la plus faible à 30% de concentration de NaCl soit une activité de 52%

Amy1 et Amy3 ont gardé plus de 50% de leurs activités pour toutes les différentes concentrations en NaCl, seule Amy2 a une activité de 30% environ à la concentration 1,56% de NaCl.

Amy1, Amy2 et Amy3 sont restées hautement stables sur une large gamme de concentrations en sel, cette caractéristique intéresserait l'industrie biotechnologique où les procédés demandent une haute concentration en sel ou dans le traitement des eaux salines.

Cette tolérance au NaCl est également constatée chez de nombreuses amylases halophiles regroupées dans le tableau II où l'on retrouve les amylases produites par les souches *MCCC IA01486* (Qin et al., 2014), *Nesterenkonia sp. Strain F* (Shafiei et al., 2012) avec un seuil de tolérance de 4M de NaCl, *Halomonas meridiana* (Coronado et al., 2000) et *Aspergillus penicillioides* (Ali et al., 2015) présentent une gamme de tolérance de 0 à 5M au NaCl.

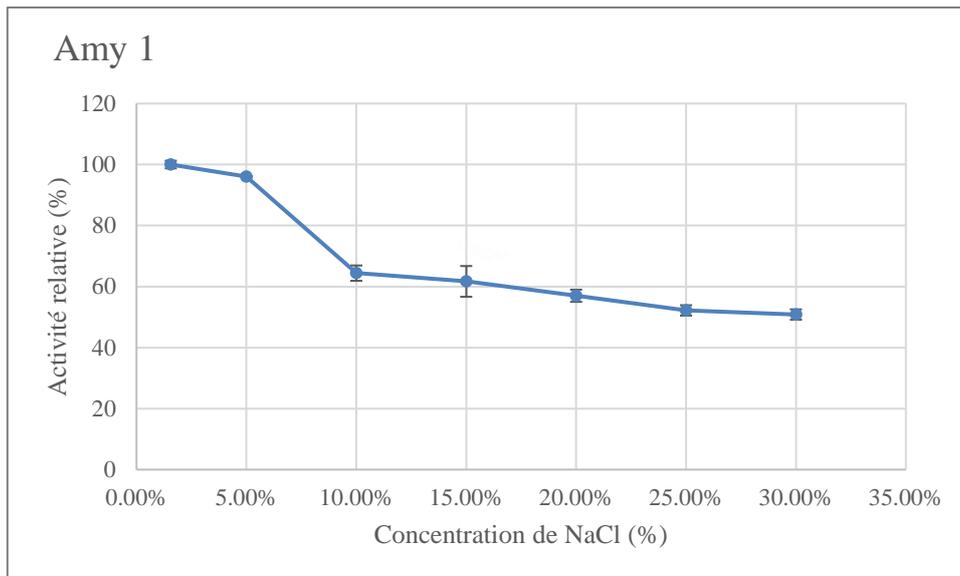


Figure 11: Effet du NaCl sur l'activité de Amy1.

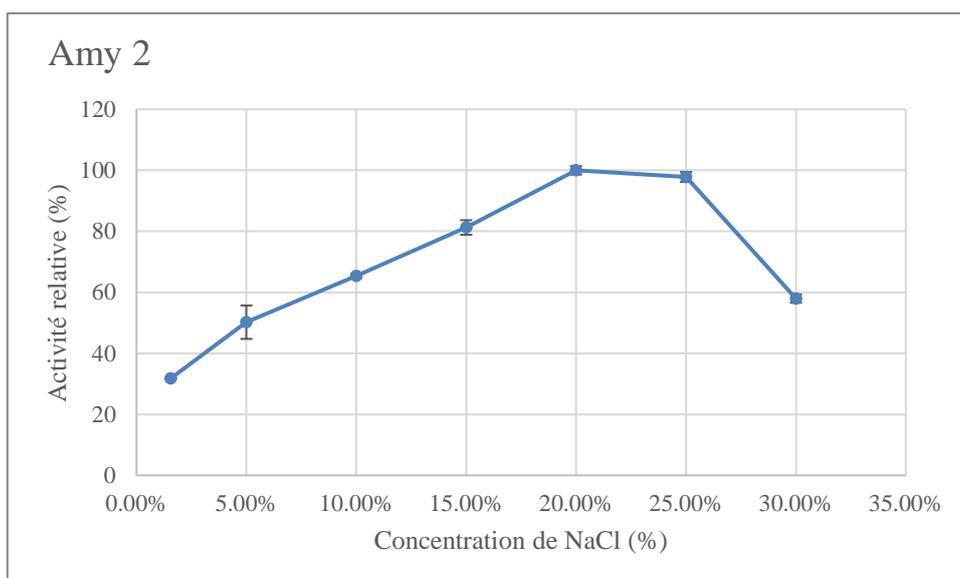


Figure 12: Effet du NaCl sur l'activité de Amy2.

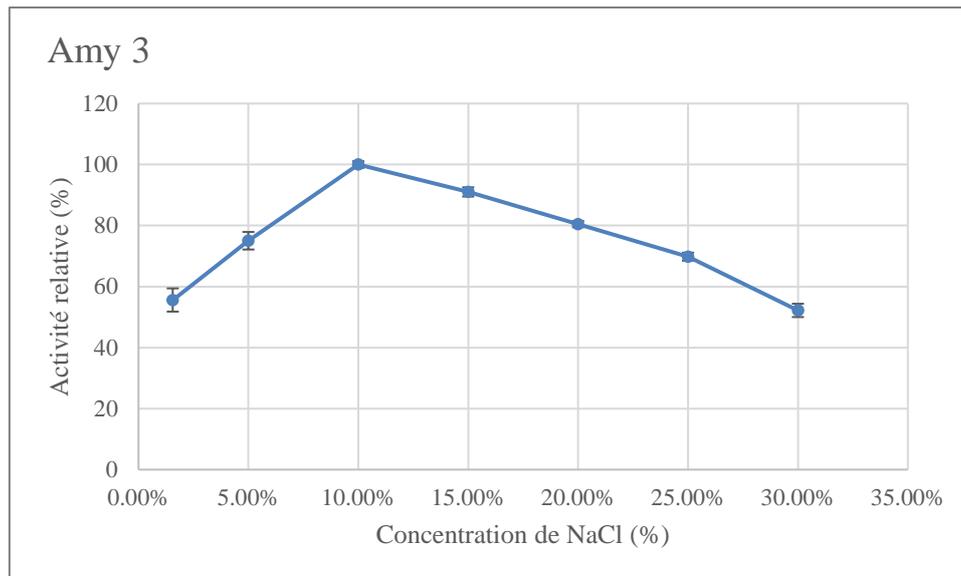


Figure 13: Effet du NaCl sur l'activité d'Amy3.

VII. Effet des solvants sur l'activité enzymatique

Amy2 et Amy3 présentent une activité élevée dans l'éthanol (85% et 100% environ respectivement) contrairement à Amy 1 qui a perdu 70% de son activité dans ce solvant

Pour le Propanol, Amy1 et Amy3 ont gardé une activité moyenne d'environ 57% tandis qu'Amy2 a perdu 80% de son activité.

Concernant l'Hexane, Amy1 et Amy2 ont une activité autour de la moyenne (51% et 48% respectivement), Amy3 a perdu seulement 30% d'activité dans ce solvant.

Amy2 et Amy1 ont perdu énormément d'activité (80% et 90% respectivement) dans le Tween 80, cependant Amy3 a perdu que 5% d'activité.

Dans le Tween 20, Amy1 a gardé 30% d'activité environ, Amy3 a gardé le double de l'activité d'Amy1 et Amy2 est restée à 100% d'activité.

Amy1 a une activité enzymatique de 60 % dans l'Acétone, Amy2 et Amy3 ont gardé une activité aux alentours de 80%.

Amy3 a l'activité la plus élevée dans l'éther de pétrole (92% environ) suivi d'Amy1 dont l'activité est de 71%, Amy2 présente une activité de 60% environ.

L'Acétone, L'hexane et l'éther de pétrole sont les seuls solvants où toutes les enzymes présentent une activité supérieure ou égale à 50%.

Amy1 a une activité décroissante en fonction de la polarité des solvants, elle présente des activités élevées dans les solvants les moins polaires où son pic d'activité est noté dans l'éther de pétrole (solvant le plus apolaire parmi les solvants utilisés) avec une activité de 72%.

Amy3 reste hautement stable en gardant plus de 50% d'activité dans chaque solvant.

Amy2 a gardé toute son activité catalytique dans le Tween 20 et 85% de son activité dans l'Ethanol et l'Acétone, elle présente une activité enzymatique supérieure à 50% dans la majorité des solvants organiques excepté l'Ethanol et le Tween 80.

La polarité des solvants n'est pas le seul paramètre à prendre en compte pour étudier l'activité catalytique des enzymes dans les solvants organiques, d'autres facteurs tels que les propriétés moléculaires des solvants et des enzymes influencent l'activité catalytique (Ebrahimpour et al., 2011).

Les propriétés d'Amy3 montrent une enzyme naturellement stable dans les solvants testés, ce qui en fait un biocatalyseur d'intérêt pour l'hydrolyse enzymatique de l'amidon employant les solvants organiques.

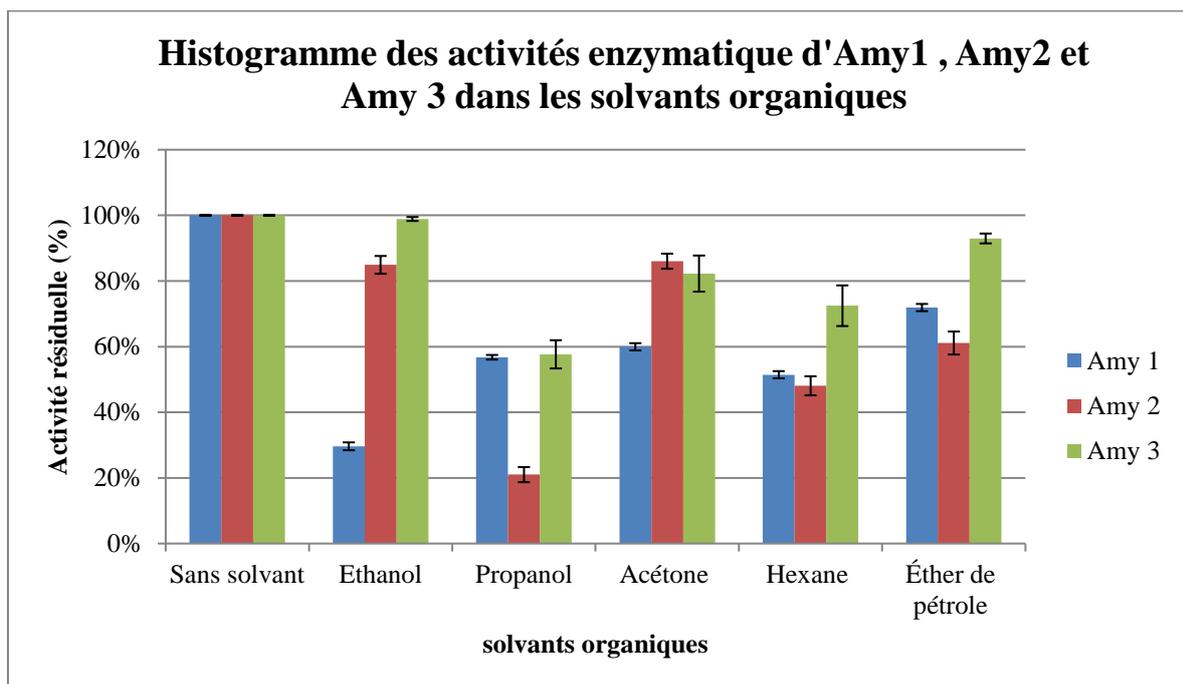


Figure 14:Activité enzymatique d'Amy1, Amy2 et Amy3 dans différents solvants organiques.

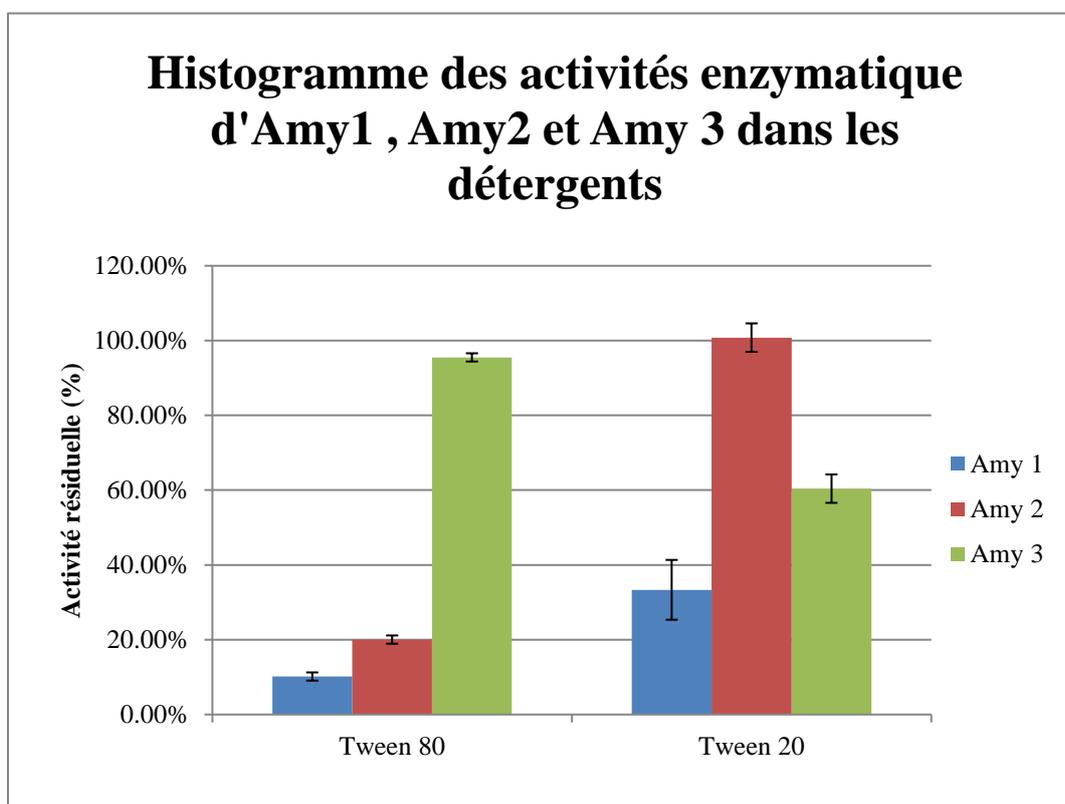


Figure 15:Activité enzymatique de Amy1, Amy2 et Amy3 dans les détergents Tween 20 et Tween 80.

Conclusion :

Conclusion :

Cette étude a permis la caractérisation de trois extraits enzymatique Amy1, Amy2 et Amy3 produits par trois isolats halophiles extrêmes, les extraits enzymatiques analysés possèdent des caractéristiques intéressantes d'un point de vue biotechnologique et industriel.

Compte tenu de leurs fortes activités sur une large gamme de concentration en NaCl, elles présentent également une stabilité élevée aux pH acides ainsi qu'aux faibles et fortes températures, la présence d'activités dans les différents solvants organiques utilisés et leurs résistances aux détergents reste non négligeable.

Amy3 qui présente une forte activité en présence de tous les solvants testés pourrait être utilisée dans les procédés de fabrication de biocarburant comme le bioéthanol et autres.

Nous avons pu durant ce travail faire la caractérisation partielle de 3 extraits enzymatique halophiles extrêmes mais pour pouvoir être exploités, ces derniers devront être purifiés en vue d'une utilisation industrielle et biotechnologique.

Références bibliographiques :

- Aida, M. F., & Hanan, M. A. N. (2016). Production, optimization and characterization of extracellular amylase from halophilic *Bacillus lichineformis* AH214. *African Journal of Biotechnology*, 15(17), 670–683. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.15073>
- Alain, K., Geslin, C., Godfroy, A., & Prieur, D. (2012). *Les thermophiles*. Fiche pédagogique d'IFERMER <https://wwz.ifremer.fr>
- Ali, I., Akbar, A., Anwar, M., Prasongsuk, S., Lotrakul, P., & Punnapayak, H. (2015). Purification and characterization of a polyextremophilic α -Amylase from an obligate halophilic *Aspergillus penicillioides* isolate and its potential for use with detergents. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/245649>
- Ali, I., Akbar, A., Anwar, M., Yanwisetpakdee, B., Prasongsuk, S., Lotrakul, P., & Punnapayak, H. (2014). Purification and characterization of extracellular, polyextremophilic α -amylase obtained from halophilic *Engyodontium album*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 12(4), 35–40. <https://doi.org/10.15171/ijb.1155>
- Ali, I., Akbar, A., Yanwisetpakdee, B., Prasongsuk, S., Lotrakul, P., & Punnapayak, H. (2014). Purification, characterization, and potential of saline waste water remediation of a polyextremophilic α -amylase from an obligate halophilic *Aspergillus gracilis*. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/106937>
- Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F., & Malik, K. A. (2003). Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of Microbiological Methods*, 52(3), 353–359. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00191-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00191-4)
- Bajpai, B., Chaudhary, M., & Saxena, J. (2015). Production and characterization of α -amylase from an extremely halophilic archaeon, *Haloferax* sp. HA10. *Food Technology and Biotechnology*, 53(1), 11–17. <https://doi.org/10.17113/ftb.53.01.15.3824>
- 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.

<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.10.011>

Chang, J., Lee, Y. S., Fang, S. J., Park, I. H., & Choi, Y. L. (2013). Recombinant expression and characterization of an organic-solvent-tolerant α -amylase from *exiguobacterium* sp. DAU5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(6), 1870–1883. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0101-x>

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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08935.x>

Coronado, M. J., Vargas, C., Mellado, E., Tegos, G., Drainas, C., Nieto, J. J., & Ventosa, A. (2000). The α -amylase gene *amyH* of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: Cloning and molecular characterization. *Microbiology*, 146(4), 861–868. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-4-861>

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. Université de Technologie Compiègne, France <http://www.theses.fr/2016COMP2258/document>.

Daoud, L., & Ben Ali, M. (2020). Halophilic microorganisms: Interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment. In *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818322-9.00005-8>

DasSarma, S., & DasSarma, P. (2015). *Halophiles and their enzymes: negativity put to good use*. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 120–126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.009>

Ebrahimpour, A., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M., & Salleh, A. B. (2011). High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM. *Bioresource Technology*,

102(13), 6972–6981. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.083>

Eichler, J. (2001). Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology Advances*, 19(4), 261–278. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00061-1)

Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A., & Usami, R. (2005). Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles*, 9(1), 85–89. <https://doi.org/10.1007/s00792-004-0423-2>

Fütterer, O., Angelov, A., Liesegang, H., Gottschalk, G., Schleper, C., Schepers, B., Dock, C., Antranikian, G., & Liebl, W. (2004). Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24), 9091–9096. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401356101>

Gerday, C. (2009). *EXTREMOPHILES: BASIC CONCEPTS*. In *EXTREMOPHILES: Vol. I* (p. 396). UNESCO-EOLSS. http://www.eolss.net/ebooklib/ViewEbookDetail_1.aspx?catid=3&fileid=E6-73

Gueriau, P., & Vannier, M. (2014). *Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme-ED 227 Spécialité : Paléontologie Présentée et soutenue publiquement par MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE*.

Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews* 42(3),353-375. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>

Hendry, P. (2006). Extremophiles: There's more to life. *Environmental Chemistry*, 3, 75–76. https://doi.org/10.1071/ENv3n2_ES

Hutcheon, G. W., Vasisht, N., & Bolhuis, A. (2005). Characterisation of a highly stable α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles*, 9(6), 487–495. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0471-2>

Jorquera, M. A., Graether, S. P., & Maruyama, F. (2019). Editorial: Bioprospecting and biotechnology of extremophiles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 23(AUG). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00204>

- Kiran, K., & Chandra, T. S. (2008). Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(5), 1023–1031. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1250-z>
- Karan, R., Capes, MD & DasSarma, S. (2011). Function and biotechnology of extremophilic enzymes. *Aquatic biosystemes*, 8(4), 1-15
- Kempf, B., & Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology*, 170(5), 319–330. <https://doi.org/10.1007/s002030050649>
- Kumar, S., & Khare, S. K. (2012). Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming α -amylase from moderately halophilic *Marinobacter* sp. EMB8. *Bioresource Technology*, 116, 247–251. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.109>
- Li, X., & Yu, H. Y. (2011). Extracellular production of beta-amylase by a halophilic isolate, *Halobacillus* sp. LY9. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(11), 1837–1843. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0972-1>
- Li, X., & Yu, H. Y. (2012a). Purification and characterization of novel organic-solvent-tolerant β -amylase and serine protease from a newly isolated *Salimicrobium halophilum* strain LY20. *FEMS Microbiology Letters*, 329(2), 204–211. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02522.x>
- Li, X., & Yu, H. Y. (2012b). Characterization of an organic solvent-tolerant α -amylase from a halophilic isolate, *Thalassobacillus* sp. LY18. *Folia Microbiologica*, 57(5), 447–453. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0160-3>
- Liu, D. (2014). *Aeromonas*. In *Molecular Medical Microbiology: Second Edition* (Vols. 2–3). academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00061-5>
- Madern, D., Ebel, C., & Zaccari, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4(2), 91–98. <https://doi.org/10.1007/s007920050142>
- Madigan, M. T., & MaMadigan, M. T., & Marrs, B. L. (1997). Extremophiles. *Scientific American*, 276(4), 82–87. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0497-82rrs>, B. L. (1997). Extremophiles. *Scientific American*, 276(4), 82–87.

<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0497-82>

- Mariscal, C., & Brunet, T. D. P. (2020). What are Extremophiles? A Philosophical Perspective. In K. C. Smith & C. Mariscal (Eds.), *Social and Conceptual Issues in Astrobiology*.157
- Onodera, M., Yatsunami, R., Tsukimura, W., Fukui, T., Nakasone, K., Takashina, T., & Nakamura, S. (2013). Gene analysis, expression, and characterization of an intracellular α -amylase from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77(2), 281–288. <https://doi.org/10.1271/bbb.120693>
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 56–63. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>
- Oren, Aharon. (2013). Life at High Salt Concentrations. In *The Prokaryotes: Prokaryotic Communities and Ecophysiology* (pp. 421–440). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0_57
- Pan, S., Yao, T., Du, L., & Wei, Y. (2020). Site-saturation mutagenesis at amino acid 329 of *Klebsiella pneumoniae* halophilic α -amylase affects enzymatic properties. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(2), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.09.002>
- Pérez-Pomares, F., Bautista, V., Ferrer, J., Pire, C., Marhuenda-Egea, F. C., & Bonete, M. J. (2003). α -Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*, 7(4), 299–306. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0327-6>
- Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M. S., Muralikrishna, G., & Sreeramulu, K. (2009). Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochemistry*, 44(2), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.10.013>
- Qin, Y., Huang, Z., & Liu, Z. (2014). A novel cold-active and salt-tolerant α -amylase from marine bacterium *Zunongwangia profunda*: Molecular cloning, heterologous expression and biochemical characterization. *Extremophiles*, 18(2), 271–281. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0614-9>

- Riaz, S., Jamil, M., Zeb, I., & Ahmed, R. (n.d.). *Characterization of Thermostable Amylase From Halophilic Lactobacillus Plantarum TSI*.
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>
- Santorelli, M., Maurelli, L., Pocsfalvi, G., Fiume, I., Squillaci, G., La Cara, F., del Monaco, G., & Morana, A. (2016). Isolation and characterisation of a novel alpha-amylase from the extreme haloarchaeon *Haloterrigena turkmenica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.001>
- Scoon, R. N. (2018). Lake Natron and the Oldoinyo Lengai Volcano. In *Geology of National Parks of Central/Southern Kenya and Northern Tanzania: Geotourism of the Gregory Rift Valley, Active Volcanism and Regional Plateaus* (pp. 193–206). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73785-0_17
- Shafiei, M., Ziaee, A. A., & Amoozegar, M. A. (2012). Purification and characterization of a halophilic α -amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *Extremophiles*, 16(4), 627–635. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0462-z>
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). α -Amylases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*, 3–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00001-4>
- Siroosi, M., Borujeni, F. B., Amoozegar, M. A., Babavalian, H., & Hassanshahian, M. (2021). Halophilic amylase production and purification from *haloarcula* sp. Strain d61. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(1), 7382–7392. <https://doi.org/10.33263/BRIAC111.73827392>
- Verma, D. K., Vasudeva, G., Sidhu, C., Pinnaka, A. K., Prasad, S. E., & Thakur, K. G. (2020). Biochemical and Taxonomic Characterization of Novel Haloarchaeal Strains and Purification of the Recombinant Halotolerant α -Amylase Discovered in the Isolate. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02082>

Résumé :

Ce travail a pour but la caractériser partielle d'extraits enzymatique amylolytique à intérêt biotechnologique capable de rester actives dans des concentrations élevées en sel et en présence de différents solvants organiques, les microorganismes sélectionnés pour la production sont trois isolats microbiens halophiles extrêmes fournis par le laboratoire de microbiologie de l'université Abderrahmane-Mira, trois extraits enzymatiques nommé Amy1, Amy2 et Amy3 ont été obtenus par centrifugation. L'effet du pH, de la température et de la salinité (concentration en NaCl) sur l'activité enzymatique ont été testés ainsi que l'activité de chaque extrait en présence de différents solvants. Il ressort de notre étude que Amy1 a une activité optimale à pH 4, 37°C et à 1,5% en NaCl, Amy2 a une activité optimale à pH 6, 45°C et à 20%-25% de NaCl, Amy3 a une activité optimale à pH 5, 40°C et à 10% en NaCl.

Parmi les extraits enzymatiques étudiés, Amy1 reste le plus stable dans les pH acides, Amy3 est le plus stable dans les différents solvants organiques utilisés lors de nos tests de caractérisation.

Abstract:

this work aims to partially characterize amylolytic enzymatic extracts of biotechnological interest able to maintain activity in high concentrations of salt and in the presence of different organic solvents, the microorganisms selected for production are three extreme halophilic microbial isolates provided by the laboratory of microbiology of the University Abderrahmane-Mira, three enzymatic extracts named Amy1, Amy2 and Amy3 have been obtained by centrifugation. The effect of pH, temperature and salinity (NaCl concentration) on the enzymatic activity was tested as well as the activity of each extract in the presence of different solvents. It appears from our study that Amy1 has an optimal activity at pH 4, 37°C and 1.5% NaCl, Amy2 has an optimal activity at pH 6, 45°C and 20%-25% NaCl, Amy3 has an optimal activity at pH 5, 40°C and 10% NaCl. Among the studied enzyme extracts, Amy1 remains the most stable in acidic pH, Amy3 is the most stable in the different organic solvents used during our characterization tests.