



UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI
CONSTANTINE

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

N° d'ordre : 38/D₃C/2018

N° de série : 02/MB/2018

Thèse

Présentée pour l'obtention

Du Diplôme de Doctorat de 3^{ème} cycle

En Biotechnologies Microbiennes, Génomes et Environnement

Par

OUSSADI Mouna Imen

Thème :

**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.**

Soutenue le : 03/05/2018

Membres du jury :

Président :	Mr. BENHIZIA Y.	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Directeur de thèse :	Mr. KITOUNI M.	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Examineur :	Mr. BOUDEMAGH A.	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Examineur :	Mme. BENDJEMANA K.	Professeur	U. Abbès Laghrour- Khenchela

Année universitaire: 2017 - 2018

Dédicaces

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis persuadée que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti chercheur ».

Un grand merci à l'ensemble des personnes que j'ai croisé au cours de mon parcours universitaire, mes collègues et amis, pour les bons moments passés ensemble, ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

Un grand merci aussi à mes amis de stage Sabiha, Aicha, Barbara, Loic, Bernardo, Richard, et Antonin, avec qui on a eu des fous rires et de merveilleux moments passés ensemble, et un bagage remplis de souvenir.

Un immense merci aux membres de l'équipe de Toulouse qui m'ont accueillie à bras ouverts dès mon premier stage et qui ont fait en sorte que je me sente à l'aise. Je tiens à remercier également Wladimir, pour l'aide qu'il m'a apporté pour la réalisation d'une partie de ce travail.

Enfin je terminerai en adressant des remerciements plus personnels, à ma famille pour son soutien sans faille et de tous les instants. Merci à mes parents d'avoir toujours été là, d'avoir fait de moi ce que je suis. A ma sœur Ines, son mari Racim et mon petit neveu Mohamed Adem. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de Thèse Monsieur le Pr. **KITOUNI MAHMOUD** pour m'avoir fait confiance et de m'avoir encadrée tout au long de ces années de thèse. Ainsi que pour tous ses précieux conseils, et ses encouragements, pour ses qualités humaines, sa patience, sa dévotion, et sa grande générosité, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je souhaiterai aussi remercier, le responsable de l'équipe Microbiologie appliquée du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Monsieur le Pr. **BOULAHROUF A.**, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Une bonne partie de ce travail de thèse a été réalisé au sein d'un laboratoire, dont je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le MC. **SAMUEL**, pour m'avoir accueilli chaleureusement à plusieurs reprises au sein de son équipe lors de mes stages, et pour toute l'aide qu'il m'a apporté. Sans oublier le responsable de l'équipe le Pr. **Lionel**, pour sa gentillesse inouïe.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Pr. **BOUDEMAGH A.**, et Madame la Pr. **BENDJEMANA K.** d'avoir accepté de juger mon travail ainsi qu'à Monsieur le Pr. **BENHIZIA Y.** d'avoir accepté de le présider.

RESUMES

**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.**

Résumé

Une nouvelle souche de *Streptomyces* sp. (20r) a été choisie parmi quatorze actinomycètes en raison de son activité amylasique et de ses bonnes caractéristiques de croissance et de sporulation. Elle est issue d'un biotope semi-aride du nord-est Algérien, les marais salants d'Ain Mlila. Le gène codant pour cette amylase a été isolé et cloné. Les résultats de l'annotation structurale des séquences ont permis d'identifier les bornes nucléotidiques de six ORFs sur la séquence génomique de la souche *Streptomyces* sp. (20r) séquencée par la technologie Illumina HiSeq 2000, suivie d'une annotation fonctionnelle qui a son tour permet de prédire la fonction des ORFs en tant que GH et plus précisément en ayant une activité amylasique appartenant à la famille GH13. L'alignement des séquences nous a permis de mettre en évidence la triade catalytique de l'enzyme, formée d'un acide glutamique (Glu) et de deux acides aspartiques (Asp) spécifique pour la famille des GH13 ce qui prouve que ces protéines appartiennent bien à cette dernière. L'analyse de séquences a permis de mettre en évidence la présence de domaine modulaire, ce qui nous a permis de retenir deux gènes codant pour des amylases pour la suite des travaux, sur les six gènes orthologues putatives positifs: Les Nodes 67 et 65 possédant un CBM 20 et un CBM 2 en C-terminal et deux CBM 25 en N-terminal, respectivement. Ces deux gènes de 537 aa et 960 aa respectivement ont été clonés dans le vecteur pET28a (+), puis exprimés chez *Escherichia coli*. Par ailleurs, grâce à la méthodologie des plans d'expériences de Plackett et Burmann nous avons pu identifier quatre facteurs qui ont un effet significatif sur la production enzymatique. Ces derniers ont fait l'objet d'une optimisation par le plan d'expérience de Box-Wilson basé sur les composites centrés (CCD) combiné à la méthodologie de surface de réponse (RSM). Cette étude a permis de définir un milieu de production optimisé composé de 16,03% de déchets d'orange, 6,60% de NaCl, 9,45% d'inoculum et un pH 8,95. Nous avons ainsi obtenu des niveaux de production enzymatique optimale de l'ordre de 12,19 U/mL, ce qui a été en bon accord avec la valeur prédite par le modèle quadratique (11,55 U/mL). L' α -amylase purifiée présentait une activité sur une large gamme de pH (2,2-10,6), elle démontre un pH et une température d'activité optimaux de 8,8 et 85°C, respectivement.

Mots clés: *Streptomyces* sp., GH, α -amylase, déchets d'orange, optimisation, SmF, Plackett-Burman, CCD, RSM, purification, caractérisation, Séquençage Illumina HiSeq 2000, clonage, expression protéique.

**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.**

Abstract

A new strain of *Streptomyces* sp. (20r) was selected from fourteen actinomycetes because of its amylase activity and its good growth and sporulation characteristics. It comes from an semi-arid biotope of northeastern Algeria, the salt marshes of AinMlila. The gene coding for this amylase has been isolated and cloned. The results of the structural annotation of the sequences made it possible to identify the nucleotide boundaries of six ORFs on the genomic sequence of the strain *Streptomyces* sp. 20r sequenced by IlluminaHiSeq 2000 technology, followed by a functional annotation which in turn makes it possible to predict the function of ORFs as GH and more specifically by having an amylase activity belonging to the GH13 family. The alignment of the sequences allowed us to highlight the catalytic triad of the enzyme, consisting of a glutamic acid (Glu) and two aspartic acids (Asp) specific for the GH13 family which proves that these proteins belong to this last one. Sequence analysis revealed the presence of a modular domain, which allowed us to retain two genes coding for amylases for the rest of the study, on the six positive putative orthologous genes: Nodes 67 and 65 possessing CBM 20 and CBM 2 in C-terminal and two CBM25 in N-terminal, respectively. These two genes of 537aa and 960aa, respectively, were cloned into the pET28a (+) vector and then expressed in *Escherichia coli*. In addition, the production of α -amylase has been optimized by adopting the methodology of the plans of experiments of Plackett-Burman which allowed us to identify four factors that have a significant effect on enzyme production. These have been optimized by the Box-Wilson experiment plan based on centered composites (CCD) combined with the Response Surface Methodology (RSM). This study defined an optimized production environment consisting of 16,03% orange waste, 6,60% NaCl, 9,45% inoculum size and a pH of 8,95. We obtained optimal enzymatic production levels in the order of 12,19 U/mL, which was in good agreement with the value predicted by the quadratic model (11,55 U/mL). Purified α -Amylase exhibited activity over a wide pH range (2,2-10,6), exhibiting an optimum pH and activity temperature of 8,8 and 85° C, respectively.

Key words: *Streptomyces* sp., GH, α -amylase, orange waste, optimization, SmF, Plackett-Burman, CCD, RSM, purification, characterization, IlluminaHiSeq 2000 sequencing, cloning, protein expression.

**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.**

ملخص

تم اختيار سلالة جديدة من *Streptomyces* sp. (20r) من بين أربعة عشر أكتينومييسات بسبب نشاطها الأميلازي ومواصفاتها الجيدة للنمو وخصائص سبورولاسيون. حيث قمنا بعزل هذه السلالة من نمط حيوي شبه جاف في شمال شرق الجزائر (المستنقعات المالحة في عين مليلة). تم عزل و استنساخ الجين الذي يرمز لهذا الأميلاز. سمحت نتائج الشرح الهيكلي للمتسلسلات بتحديد المحطات النوكليويتيدية لسنة ORFs على التسلسل الجيني للسلالة *Streptomyces* sp. (20r) باستعمال التكنولوجيا IlluminaHiSeq 2000. تم بعد ذلك القيام بالشرح الوظيفي الذي سمح بالتنبؤ بوظيفة ORFs على أساس أنها GH و خصوصا بوجود نشاط أميلازي ينتمي إلى عائلة GH13. وسمح لنا محاذاة المتسلسلات بتسليط الضوء على الثلاثي المحفز لنشاط الإنزيم و الذي يتكون من حمض الجلوتاميك (Glu) واثنين من حمض الأسبارتيك (Asp) المخصص لعائلة GH13، مما يدل على أن هذه البروتينات تنتمي لهذه العائلة. في الأخير تمكنا من خلال تحليل المتسلسلات الحصول على مجال الوحدات، مما سمح لنا بالإحتفاظ باثنين من الجينات التي ترمز لإنزيم الألفا أميلاز و ذلك لمتابعة بقية العمل. من بين السنة جينات المفترضة الإيجابية: العقد 67 و 65 التي تمتلك CBM20 و CBM 2 في منطقة ال C-النهائي واثنين من CBM 25 في منطقة ال N-النهائي، على التوالي. تم استنساخ هذين الجينين من 537 حمض اميني و 960 حمض اميني ، على التوالي، في ناقلات pET28a(+) ثم التعبير عنه في سلالة *Escherichia coli*.

مكننا أول خطة تجريبية إحصائية (Placket et Burman) بتحديد أربعة عوامل لها تأثير ايجابي على إنتاج الإنزيم. هذه العوامل تم استعمالها في مخطط تجريبي ثاني (Box et Wilson) من اجل تحسين مردودية إنتاج الإنزيم بالاعتماد على المركبات المركزية (CCD) والاستجابات السطحية (RSM). مكنت الدراسة الإحصائية من ضبط الوسط الغذائي الأمثل لإنتاج الإنزيم و الذي يتكون من نفايات برتقالية 16.03% , كلوريد الصوديوم 6.60% , لقاح بكتيري 9.45% , و درجة حموضة 8.95. الاستعمال التجريبي لهذا الوسط أدى إلى الحصول على مستويات إنتاج إنزيمية مثلى تقدر ب 12.19 (U/mL) , و التي تتطابق مع القيمة التنبؤية للنموذج الإحصائي الرباعي 11.55 (U/mL). عرضت الألفا أميلاز النقية نشاط على نطاق واسع من درجة حموضة (2.2-10.6)، مما يدل على أن درجة الحموضة المثلى ودرجة الحرارة المثلى للنشاط هما 8.8 و 85 درجة مئوية، على التوالي.

الكلمات المفتاحية :

Streptomyces sp., ألفا أميلاز, نفايات البرتقال, تحسين , SmF , Placket et Burman, CCD , RSM , تنقية , تمييز, Illumina HiSeq 2000 , استنساخ, تعبير بروتيني.

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

Å: ångström

aa: acides aminés

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ANOVA: analysis of variance

ARN 16Sr: acide ribonucléique 16S ribosomique

ARNase: ribonucléase

ARNt: ARN de transfert

BglIII: endonuclease isolée de *Bacillus globigii*

CCD: central composite design

Da: Dalton

DNSA: acide 3,5-dinitrosalicylique

dNTP: désoxyribonucléotides

DO: densité optique

E.coli: *Escherichia coli*

EDTA: acide éthylène-diamine-tétraacétique

g: gramme

g.L-1: gramme/litre

G+C%: pourcentage de la guanine+cytosine

GN: gélose nutritive

HCl: chlorure d'hydrogène

ID : identité

IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

I₂/KI: diiode /iodure de potassium

Kb: Kilobase

KDa: Kilodalton

M: molaire

Mb: Mégabase

Milieu ISP2 : international Streptomyces project

Milieu LB: milieu Luria Bertani

Milieu SOC: super optimal catabolite repression

mL: millilitres

mm: millimètres

mmol: millimolaire

NAD: nicotinamide adénine dinucléotide

NaOH: hydroxyde de sodium

NdeI: endonuclease isolée de *Neisseria denitrificans*

NheI: endonuclease isolée de *Neisseria mucosa heidelbergensis*

nm: nanomètre

ORFs: open reading frames (Phase ouverte de lecture)

pb: paire de base

pH: potentiel hydrogène

Psi: pound per square inch (mesure de pression)

P/V: poids/volume

rpm: tour par minute

RSM: response surface methodology

SDS: dodécylsulfate de sodium

SDS-page: dodécyl sulfate de sodium polyacrylamide gel electrophoresis

SmF: Fermentation submergée

SpeI: endonuclease isolée de *Sphaerotilus natans*

Tampon TBE: Tampon Tris, Borate, EDTA

Tampon TE: Tampon Tris-EDTA

TIM: la triose-phosphate isomérase, une enzyme de la glycolyse

U: unité

Liste des abréviations

UFC : unité formant colonie

U.V: ultra-violet

v/v: volume/volume

°C: degré Celsius

μ: micron

μg: microgramme

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structures tridimensionnelles de CBM25 de l'amylose de <i>Bacillus halodurans</i> (pdb2c3v)	6
Figure 2: Représentation schématique d'un polysaccharide et des sites de coupures pour les enzymes à activité endoglycosidase ou exoglycosidase des GHs	7
Figure 3: Topologie du site actif des GHs	8
Figure 4: Sites de coupure des A: endo-enzymes et B: exo-enzymes	9
Figure 5: Structure de l'amylose	10
Figure 6: Structure de l'amylopectine	10
Figure 7: Structure du module GH13 de l' α -amylose de <i>Bacillus halmapalus</i>	13
Figure 8: Représentation schématique du repliement $(\beta/\alpha)_8$ (TIM barrel) trouvé chez GH13 et GH14	14
Figure 9: Régions conservées de quelques enzymes de la Famille GH 13.....	15
Figure 10: Structures tertiaires de l' α -amylose de <i>Thermotoga maritima</i> 2B5D (GH57).....	16
Figure 11: Les cinq régions conservées dans la famille GH57	17
Figure 12: Les cinq régions conservées de la famille GH119	17
Figure 13: Illustration du repliement $(\beta/\alpha)_7$ trouvé chez GH57 et GH119	18
Figure 14: beta-amylose de <i>bacillus cereus var. mycoides</i> en complexe avec le maltose.....	19
Figure 15: Classification du phylum des <i>Actinobactéria</i> basée sur des données de séquençage de l'ADNr 16S.	23
Figure 16: Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide	27
Figure 17: Structure du Génome circulaire de <i>S. coelicolor</i>	33
Figure 18: pET28a(+) vecteur d'expression.....	45
Figure 19(A): Dégradation de l'amidon par la souche actinomycétale 20r (a): Technique des spots (b): Technique des stries.....	66
Figure 19 (B): Dégradation de l'amidon par la souche actinomycétale 19 (a): Technique des spots (b): Technique des stries.....	67
Figure 20: (A) Aspect macroscopique de la souche 20r. (B) Zone de lyse entourant la souche 20r de couleur rouge-brune sur milieu à base d'amidon.	67
Figure 21: Schématisation du principe de la technologie de séquençage Illumina	68
Figure 22: Gel d'agarose après amplification par PCR des séquences codant l' α -amylases. (A): Node 65 ORF-3; (B): Node 67 ORF-28.....	74
Figure 23: (A) Cartographie de restriction théorique des plasmides recombinants attendus de la 65/67. (B) Cartographie de restriction du vecteur pET28a(+).....	76
Figure 24: (A) profil de digestion de l'ADN plasmidique de l'insert 65 avec la BglIII. (B) profil de digestion de l'ADN plasmidique de l'insert 67 avec la BglIII.....	78

Figure 25: Gels SDS-PAGE présentant les résultats des tests d'expression, fraction insoluble (culot, C), fraction soluble (surnageant, S). (A) La flèche montre la migration de l' α -amylase 65 à 100 KDa. (B) La flèche montre la migration de l' α -amylase 67 à 60KDa.....	81
Figure 26: Gels SDS-PAGE présentant les résultats des tests d'expression, fraction insoluble (culot, C), fraction soluble (surnageant, S). (A) La flèche montre la migration de l' α -amylase 65 à 100 KDa (B) La flèche montre la migration de l' α -amylase 67 à 60KDa.....	82
Figure 27: Gels SDS-Page présentant la purification des α -amylases 67/65 après expression dans la souche BL21 et Rosetta.....	84
Figure 28: Représentation du graphique de Pareto des effets des différents facteurs sur la production de l' α -amylase par <i>Streptomyces</i> sp. (20r).....	104
Figure 29: (A) Le graphique de probabilité normal des résidus. (B) Le graphique de parité de la distribution des valeurs expérimentales par rapport aux valeurs prédites de l'activité de l' α -amylase.	103
Figure 30: Tracé des surfaces de réponse de l'activité amylolytique de la souche <i>Streptomyces</i> sp. (20r).....	105
Figure 31: (A) Cinétique de croissance et de production de l' α -amylase par <i>Streptomyces</i> sp. (20r). (B) Cinétique de production protéique et amylasique par <i>Streptomyces</i> sp. (20r). (C) Cinétique de consommation de sucres totaux et de production de l' α -amylase par <i>Streptomyces</i> sp. (20r).	109
Figure 32: Profil chromatographique de l' α -amylase de la souche <i>Streptomyces</i> sp. (20r) purifiée sur colonne gel filtration G-75	111
Figure 33: Effet de la température sur l'activité de l' α -amylase	113
Figure 34: Effet du pH sur l'activité de l' α -amylase	114

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les superfamilles de repliements des CBMs.....	6
Tableau 2: <i>Streptomyces</i> spp. en tant que producteurs d' α -amylases et leurs applications industrielles	30
Tableau 3: les séquences des amorces d'amplification des gènes d' α -amylases	39
Tableau 4: Optimisation des conditions de PCR des α -amylases	41
Tableau 5: Les sites de reconnaissance des enzymes de restriction utilisées.....	45
Tableau 6: Digestion du vecteur et des inserts par les enzymes de restrictions	46
Tableau 7: Ligation du vecteur avec les inserts Node 65/67.....	46
Tableau 8: Souches compétentes d' <i>E. coli</i> utilisée pour l'amplification	47
Tableau 9: Digestion de l'ADN plasmidique	48
Tableau 10: Composition du milieu auto inductible	50
Tableau 11: Composition d'un gel SDS page à 10%.....	52
Tableau 12: La matrice de Plackett-Burman pour l'étude de 23 variables avec 24 expériences.	55
Tableau 13: Générateurs des matrices de Plackett et Burman	58
Tableau 14: Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Plackett-Burman pour 19 facteurs.....	57
Tableau 15: Matrice du plan composite centré de Box et Wilson à quatre facteurs.	60
Tableau 16: Les niveaux codés et réels des variables indépendantes utilisés dans le plan composite centré.....	61
Tableau 17: Criblage d'actinomycètes produisant l' α -amylase, par des zones d'hydrolyse sur milieu à base d'amidon	66
Tableau 18: Composition physico-chimique du déchet d'orange	85
Tableau 19: Résultats du plan Plackett-Burman de la production d' α -amylase, de biomasse, et de protéines	87
Tableau 20: Résultats de l'analyse statistique du plan Plackett-Burman pour la production de l' α -amylase par la souche <i>Streptomyces</i> sp. (20r).....	89
Tableau 21: Matrice du plan composite centré de Box et Wilson à quatre facteurs, avec l'activité amylolytique de la souche <i>Streptomyces</i> sp. (20r) comme réponse.	96
Tableau 22: Effets estimés des variables et coefficient de régression de la production de l' α -amylase par la souche <i>Streptomyces</i> . Sp (20r)	101
Tableau 23: Analyse de la variance pour l'activité amylolytique du plan composite centré.	101
Tableau 24: Effets estimés des variables et coefficient de régression de la production de l' α -amylase du modèle réduit.....	102
Tableau 25: Analyse de la variance pour l'activité amylolytique du plan composite centré du modèle réduit.....	102
Tableau 26: Coordonnées codées des optima des facteurs étudiés et leurs valeurs réelles.....	107
Tableau 27: Purification de l' α -amylase produite par <i>Streptomyces</i> sp. (20r).....	112

TABLE DES MATIERES**Résumé****Abstract****الملخص****LISTE DES ABREVIATIONS****LISTE DES TABLEAUX****LISTE DES FIGURES****INTRODUCTION** 1**PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

1. Les glycosides hydrolases	4
1.1. Définition et classification des Glycosides Hydrolases (GHs).....	4
1.2. Modes d'action des GHs	7
1.3. Topologies du site actif des GHs.....	7
1.4. Mécanismes d'action catalytique des GHs.....	8
1.5. Le site actif et les sous-sites de fixation du substrat.....	8
2. Les activités amylolytiques	9
2.1. Définition de l'activité amylolytique.....	9
2.2. L'Amidon substrat des amylases.....	9
2.2.1. <i>L'Amylose</i>	9
2.2.2. <i>L'Amylopectine</i>	10
2.3. Définition des amylases.....	10
2.3.1. <i>Les α-amylases</i>	11
2.3.2. <i>Les β-amylases</i>	11
2.4. Source des alpha-amylases.....	11
2.5. Les différentes familles des amylases	12
2.5.1. <i>Famille des GH13</i>	12
2.5.1.1. <i>Spécificité de substrat et de produit</i>	12
2.5.1.2. <i>Mécanisme d'action catalytique des enzymes de la famille GH13</i>	12
2.5.1.3. <i>Structure et organisation des domaines</i>	13
2.5.2. <i>Famille des GH57</i>	15
2.5.2.1. <i>Mécanisme d'action</i>	15
2.5.2.2. <i>Les différentes activités</i>	15

2.5.2.3. <i>Structure tridimensionnelle</i>	15
2.5.3. <i>Famille des GH119</i>	17
2.5.4. <i>Famille des GH14</i>	18
2.6. Applications industrielles des activités amylolytiques	19
2.6.1. <i>Liquéfaction de l'amidon et saccharification</i>	19
2.6.2. <i>Désencollage des textiles</i>	19
2.6.3. <i>Industrie de la boulangerie</i>	19
2.6.4. <i>La détergence</i>	20
2.6.5. <i>Domaine médical et pharmaceutique</i>	20
2.6.6. <i>Les biocarburants</i>	20
2.6.7. <i>Autres applications</i>	21
3. Les actinomycètes	21
3.1. Caractéristiques générales	21
3.2. Classification morphologique.....	21
3.3. Phylogénie des actinomycètes.....	22
3.4. Les types des actinomycètes.....	23
3.4.1. <i>Actinobactéries thermophiles</i>	23
3.4.2. <i>Actinobactéries acidophiles</i>	24
3.4.3. <i>Actinobactéries halophiles</i>	24
3.4.4. <i>Actinobactéries endophytes</i>	24
3.4.5. <i>Actinobactéries symbiotiques</i>	25
3.4.6. <i>Actinobactéries endosymbiotiques</i>	25
3.4.7. <i>Actinobactéries intestinales</i>	25
4. Les Streptomyces	26
4.1. Généralités.....	26
4.2. Cycle de développement.....	26
4.3. Habitats et niches écologiques.....	27
4.3.1. <i>Environnement terrestre</i>	27
4.3.2. <i>Environnement marin</i>	28
4.4. Applications industrielles	29
4.4.1. <i>Les Enzymes</i>	29
4.4.2. <i>Les Antimicrobiens</i>	31
4.4.3. <i>La Bioremédiation</i>	31
4.4.4. <i>Humification et biodégradation</i>	32
4.4.5. <i>Bioconversion de composés chimiques</i>	32
4.5. Le génome des Streptomyces	32

MATERIEL ET METHODES

1. Souches utilisées.....	34
2. Conservation des souches actinomycétales	34
3. Sélection de la meilleure souche productrice d’alpha-amylase	34
3.1. Préparation de l’inoculum	34
3.2. Recherche de l’activité amylasique	34
3.2.1. <i>Technique des puits</i>	35
3.2.2. <i>Technique des spots</i>	35
3.2.3. <i>Technique des stries</i>	35
4. Criblage de gènes d’alpha amylase	35
4.1. Extraction d’ADN génomique de la souche <i>Streptomyces</i> sp. (20r)	35
4.2. Séquençage du génome de <i>Streptomyces</i> sp. (20r).....	36
4.3. Traitement bioinformatique des séquences	37
4.4. Blast et alignements des séquences	37
4.5. Annotation structurale et fonctionnelle des séquences.....	38
4.6. Construction d’amorces pour l’amplification des gènes d’alpha-amylases	39
4.7. Optimisation des conditions de PCR.....	40
4.7.1. <i>Principe</i>	40
4.7.2. <i>Révélation des produits de PCR par électrophorèse sur gel d’agarose</i>	40
4.7.3. <i>Purification des produits PCR sur gel</i>	44
4.7.4. <i>Purification des produits PCR</i>	44
5. Clonage des ORFs codant les alpha-amylases	44
5.1. Construction de plasmides recombinants	44
5.2. Amplification des plasmides recombinés	46
5.3. Analyse plasmidique par criblage virtuel	47
5.4. Analyse plasmidique par digestion de restriction.....	47
a- <i>Extraction et Purification de l’ADN plasmidique</i>	48
b- <i>Digestion enzymatique et sélection des clones positifs</i>	48
6. Tests d’expression des proteines recombinantes en système procaryote	49
6.1. Transformation des souches d’expression et séquençage des plasmides recombinés	49
6.2. Conservation des plasmides	49
6.3. Tests d’expression des α -amylases sur milieu LB chez <i>E. coli</i> BL21(DE3)	49
6.4. Tests d’expression des α -amylases sur milieux LB et auto inductible chez <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	50
6.5. Tests d’expression des α -amylases sur milieu LB chez <i>E. coli</i> Rosetta 2 pLysS (DE3).....	51
6.6. Détermination des paramètres d’expression des α -amylases sur milieu LB	51

6.7. Extraction des protéines recombinantes	51
6.8. Analyse de l'expression des protéines recombinantes.....	52
7. Test de purification des protéines recombinantes par chromatographie d'affinité.....	53
8. Déchets d'orange substrat de fermentation	53
8.1. Milieu de base.....	53
8.2. Composition physico-chimique du déchet d'orange	54
8.2.1. Dosage des sucres totaux	54
8.2.2. Dosage des protéines.....	54
8.2.3. Mesure du pH	54
8.2.4. Détermination de la matière sèche	54
8.2.5. Dosage des cendres et des minéraux	54
8.2.6. Détermination de l'azote total.....	54
8.2.7 Détermination de la matière grasse	56
9. Optimisation de la production enzymatique.....	56
9.1. Conditions de fermentation	56
9.2. Les plans d'expériences.....	58
9.2.1. Plan d'expériences Plackett et Burman.....	58
9.2.2. Plan Composite Centré.....	60
9.2.3. Analyses statistiques et modélisation	62
9.2.4. Confirmation du modèle expérimental	62
10. Méthodes analytiques	62
10.1. Mesure de la biomasse	62
10.2. Dosage de l'activité amylasique.....	62
10.3. Dosage des protéines	63
11. Cinétique de production	63
12. purification de l'alpha-amylase de la souche <i>Streptomyces</i> sp. (20r).....	64
12.1. Préparation de l'extrait brut.....	64
12.2. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	64
12.3. Dialyse.....	64
12.4. Chromatographie sur gel filtration (Sephadex G-75)	65
13. Caractérisation partielle de l'alpha-amylase	65
13.1. Activité en fonction de la température	65
13.2. Activité en fonction du pH	65
RESULTATS ET DISCUSSION	
1. Sélection de la meilleure souche actinomycétale productrice d'alpha-amylase.....	66

2. Criblage des gènes d'alpha amylase.....	67
2.1. Séquençage génomique de <i>Streptomyces</i> sp. (20r).....	67
2.2. Traitement bioinformatique des séquences	69
2.3. Blast et alignements des séquences	69
2.4. Annotation structurale et fonctionnelle des séquences.....	70
2.5. Optimisation des conditions de PCR.....	73
3. Clonage des ORFs codant les alpha-amylases	74
3.1. Analyse plasmidique par criblage virtuel.....	76
3.2. Analyse plasmidique par digestion de restriction.....	77
4. Tests d'expression des protéines recombinantes en système procaryote	78
4.1. Tests d'expression des α -amylases sur milieu LB chez <i>E.coli</i> BL21(DE3).....	79
4.2. Tests d'expression des α -amylases sur milieux LB et auto inductible chez <i>E.coli</i> BL21(DE3).....	79
4.3. Tests d'expression des α -amylases sur milieu LB chez <i>E. coli</i> Rosetta 2 pLysS (DE3).....	80
4.4. Détermination des paramètres d'expression des α -amylases sur milieu LB	80
5. Purification des protéines recombinantes par chromatographie d'affinité (IMAC).....	83
6. Caractères physico-chimiques des déchets d'orange.....	84
7. Optimisation de la production des alpha-amylases	86
7.1. Facteurs influençant la production d' α -amylases par <i>Streptomyces</i> sp. (20r)	88
7.1.1. Production de l' α -amylase	91
7.1.2. Production des protéines	91
7.1.3. Production de la biomasse	91
7.2. Détermination des optima	97
7.3. Graphiques de Pareto.....	102
7.4. Graphique de parité	104
7.5. Tracé des surfaces de réponse (RSM)	106
7.6. Validation du modèle expérimental.....	107
8. Cinétique de production d'alpha-amylases par <i>Streptomyces</i> sp. (20r).....	107
9. Purification préliminaire de l'alpha-amylase.....	110
10. Caractérisation partielle de l'enzyme purifiée.....	112
10.1. Activité en fonction de la température	112
10.2. Activité en fonction du pH.....	113
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	120
ANNEXES	
ARTICLE	

INTRODUCTION

Le marché total des enzymes industrielles a été estimé à 4,2 milliards de dollars en 2014 et devrait atteindre 6 milliards de dollars en 2016 (Industrial Enzyme Market, 2015). Le marché de l'utilisation des enzymes industrielles est extrêmement répandu avec de nombreuses applications commerciales industrielles (Adrio et Demain, 2005). Les principales enzymes utilisées sur le marché sont les amylases, les lipases et les protéases, parmi d'autres (Eijsink *et al.*, 2008 ; Académie des technologies, 2010).

Les α -amylases sont parmi les enzymes les plus importantes dans la biotechnologie actuelle, ces enzymes gagnent en importance parce que leur spectre d'application s'est élargi dans de nombreux domaines tels que les médicaments et la chimie analytique. Outre leur utilisation dans la saccharification de l'amidon, ils trouvent également des applications dans les industries alimentaires, de la boulangerie, de la brasserie, des détergents, du textile et du papier (Agger *et al.*, 2001 ; Shafique et Shafique., 2009 ; Sahnoun *et al.*, 2015). Les amylases représentent l'un des trois plus grands groupes d'enzymes industriels et représentent environ 25 à 33% des ventes totales d'enzymes dans le monde (Sharma et Satyanarayana, 2013). Avec le développement de techniques efficaces, la production à grande échelle d' α -amylase devient une activité attrayante (Zangirolami *et al.*, 2002). La production maximale d'enzymes est l'un des objectifs les plus importants des procédés biotechnologiques en optimisant les conditions physico-chimiques de la culture.

Les α -amylases peuvent provenir de plusieurs sources, y compris des plantes, des animaux et des micro-organismes. Les α -amylases microbiennes ont un large spectre d'applications industrielles puisqu'elles sont plus stables que les α -amylases végétales et animales et qu'elles peuvent être obtenues à moindre coût (Grupta *et al.*, 2003), l'avantage majeur étant la capacité de production sur le plan économique, en plus ils sont faciles à manipuler pour obtenir des enzymes de caractéristiques désirées (Lonsane et Ramesh, 1990).

Les α -amylases microbiennes ont été trouvées dans plusieurs microorganismes comme les bactéries (Hagihara *et al.*, 2001, Haq *et al.*, 2003), les champignons (Ramachandran *et al.*, 2004) et les actinobactéries (Kundu *et al.*, 2006 ; Sivakumar *et al.*, 2007 ; Kar et Ray, 2008 ; Cotârlet, 2013 ; Oussadi et Kitouni, 2015).

Les actinobactéries, en particulier les *Streptomyces*, sont l'un des groupes les plus étudiés car ils constituent une source potentielle de substances biotechnologiquement intéressantes (Lealem et Gashe, 1994). Les espèces de *Streptomyces* sont les plus importants producteurs d'un certain nombre de métabolites secondaires, d'enzymes et d'antibiotiques (De Azeredo *et al.*, 2003 ; Ahmed *et al.*, 2008). Les α -amylases sont largement distribuées dans

les espèces de *Streptomyces*, exemple *S. thermoviolaceus* et *S. erumpens* (Kar *et al.*, 2008 ; Khemakhem *et al.*, 2009). L'hydrolyse de l'amidon, catalysée par l' α -amylase, est l'une des utilisations à grande échelle les plus importantes des actinomycètes en termes de processus enzymatiques (Konsula *et al.*, 2004).

Face à la pollution croissante de la planète, la biotechnologie est considérée comme une solution dans bon nombre de domaines tels que la prévention de la pollution, le traitement des déchets et les nouvelles technologies moins polluantes.

Le coût total de la production d'enzymes et du traitement en aval est l'un des principaux obstacles à l'application réussie de toute technologie dans l'industrie des enzymes (Tokuoka *et al.*, 2010). En effet la production d' α -amylase en utilisant des milieux synthétiques est très coûteuse et non économique. Ces milieux doivent donc être remplacés par des résidus agro-industriels plus économiques et disponibles pour réduire le coût (Balkan et Ertan, 2007). Pour ces raisons, certains déchets agricoles, industriels et environnementaux ont été étudiés pour leur capacité à induire la production d' α -amylase.

En Algérie, l'industrie de la transformation de l'orange rejette 390 milles tonnes de déchets par an et leur élimination devient de plus en plus un problème environnemental (FAOSTAT-FAO Statistical Database, 2005). Avec de tels chiffres, la notion de gestion des déchets agroalimentaires est fondamentale. Plusieurs moyens peuvent alors être employés pour le traitement de ces déchets (Rivas *et al.*, 2008 ; Martín *et al.*, 2013).

Ces résidus représentent l'un des meilleurs réservoirs de carbone fixe dans la nature et les substrats les plus économiques et les plus riches en énergie pour la fermentation afin de générer plusieurs produits à valeur ajoutée par le biais de transformations microbiennes ou de modification enzymatiques (Martín *et al.*, 2010 ; Balu *et al.*, 2012). Les déchets d'orange contiennent 16,9% de sucres solubles, 9,21% de cellulose, 10,5% d'hémi-cellulose et 42,5% de pectine comme composants les plus importants (Rivas *et al.*, 2008). certaines méthodes prometteuses rencontrées dans l'utilisation efficace des déchets d'orange ont été décrites dans la littérature (Hart *et al.*, 1991). Parmi ces méthodes, l'utilisation de ces déchets dans les industries enzymatique (Naomichi et Nagai, 1981 ; Fonseca et Said, 1994 ; Siles et Thompson, 2010). Cependant, peu de travaux ont utilisé des résidus agroalimentaires comme une alternative pour les milieux de base synthétiques produisant les α -amylases (Crueger et Crueger, 2000 ; Gangadharan *et al.*, 2008).

La recherche de nouvelles enzymes et l'optimisation de leurs productions ont suscité un grand intérêt en utilisant des méthodes statistiques pour obtenir des rendements plus

économiques pour des applications industrielles (Cotârlet, 2013). En effet, il a été démontré que les études et les analyses des conditions physico-chimiques de la culture ainsi que la composition du milieu de croissance et de production peuvent influencer les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de molécules bioactives.

Pour répondre aux demandes industrielles, on sait que la production de métabolites bioactifs chez les microorganismes dépend à la fois de l'état morphologique et métabolique de la culture. Il y a constamment une étroite relation entre le taux de croissance et le rendement maximal de ces métabolites (Abou-Elela *et al.*, 2009). L'optimisation des différents paramètres et manipulations des milieux est l'une des techniques les plus importantes utilisées pour la surproduction de biomolécules actives en grande quantité. Les plans expérimentaux sont d'excellentes techniques d'optimisation des conditions de culture pour obtenir une production optimale (El-Helow *et al.*, 2000 ; Rao et Satyanarayana, 2003 ; Boyaci, 2005 ; Gasmi et Kitouni, 2017). Ils ont été récemment utilisés pour la production d' α -amylase par les *Streptomyces* (Oussadi et Kitouni, 2015).

Les travaux de recherche de cette thèse se focalisent sur l'étude de la production d' α -amylase par une souche d'actinobactérie. Ils visent les objectifs suivants :

- ✓ La sélection parmi 14 souches d'actinobactéries, la meilleure souche productrice d' α -amylase.
- ✓ La mise en évidence des gènes responsables de l'activité amylolytique chez *Streptomyces* sp. (20r).
- ✓ Le clonage et l'expression des gènes codant pour des activités amylolytiques de la souche *Streptomyces* sp. (20r).
- ✓ L'optimisation d'un milieu de culture à base de déchet d'orange pour la production d' α -amylase par *Streptomyces* sp. (20r).
- ✓ La purification préliminaire et la caractérisation partielle de l' α -amylase produite.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les glycosides hydrolases

1.1. Définition et classification des Glycosides Hydrolases (GHs)

Les liaisons glycosidiques, en particulier entre deux glucoses, sont les liaisons covalentes les plus stables chimiquement de tous les biopolymères naturels. Les glycosides hydrolases clivent ces liaisons 10^{17} fois plus rapidement qu'une hydrolyse spontanée, ce qui en font les catalyseurs connus les plus efficaces (Wolfenden, 1999).

Les sucres et les glycoconjugués, retrouvés en quantité immense dans la nature, nécessitent une très grande variété de glycosides hydrolases (GH) et de glycosyltransférases (GT) en vue de leur hydrolyse ou de leur synthèse. Les Glycosides Hydrolases (EC 3.2.1.1) sont un groupe étendu d'enzymes. Ils sont impliqués dans l'hydrolyse des liaisons glycosidiques entre deux hydrates de carbone ou plus ou entre un hydrate de carbone et une fraction non glucidique. Dans la classification des enzymes établie par l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB), la nomenclature de l'enzyme est basée sur sa spécificité de substrat-produit et parfois sur son mécanisme moléculaire de catalyse. Cette classification qui est très utile pour rendre compte de la spécificité ne permet cependant pas de mettre en lumière les homologues de séquences et de structures ou les liens mécanistiques pouvant exister au niveau moléculaire entre les différentes classes. Pour pallier à ces défauts, une autre classification des (GH) a été proposée dans les années 1990 par Bernard Henrissat et ses collaborateurs. Une telle classification :

- reflète les caractéristiques structurelles de ces enzymes mieux que leur seule spécificité de substrat.
- aide à révéler les relations évolutives entre ces enzymes.
- fournit un outil pratique pour dériver des informations mécanistiques (Henrissat, 1991 ; Henrissat et Bairoch, 1993).
- illustre la difficulté de dériver des relations entre l'appartenance à la famille et la spécificité du substrat.

La base de données CAZy (Carbohydrate Active Enzymes) recense et décrit les modules catalytiques et fonctionnels des enzymes appelées CAZymes (Lombard *et al.*, 2014) dégradant, modifiant ou créant des liaisons glycosidiques. Elle fournit une liste mise à jour des familles de GHs, car le repliement des protéines est mieux préservé que leurs séquences de leurs domaines catalytiques, ce qui a conduit à la définition de 145 familles de GHs différentes. Selon cette classification, des enzymes avec une spécificité de substrat différente

sont parfois retrouvées dans une même famille, Ceci tendant à prouver une évolution divergente pour acquérir de nouvelles spécificités (Coutinho *et al.*, 2003; Giacomuzzi *et al.*, 2012). D'un autre côté, des enzymes hydrolysant le même substrat peuvent être retrouvées dans différentes familles de GH.

Certaines familles peuvent être regroupées en « clans » sur la base de leurs liens de parenté

- lorsque de nouvelles séquences sont associées à plusieurs familles,
- lorsque la sensibilité des méthodes de comparaison de séquences est augmentée,
- lorsque les déterminations structurales démontrent la ressemblance entre les membres de différentes familles (Henrissat et Bairoch, 1996).

On distingue ainsi 15 clans parmi les GHs, du clan GH-A au clan GH-O (« CAZy - Home », 2017). A titre d'exemple, les glycosides hydrolases des familles 13 (famille des α -amylases), 70 et 77 sont regroupés dans le clan GH-H.

Les glycosides hydrolases possèdent très souvent une organisation modulaire (Henrissat et Davies, 1995). Elle consiste en un module catalytique et un ou plusieurs modules non-catalytiques. Ces derniers sont regroupés sous le nom de « Carbohydrate Binding Modules » (CBM) (Bolam *et al.*, 1998), ce sont des modules généralement associés aux GHs qui dégradent des substrats difficilement accessibles. Ils permettent à l'enzyme de se fixer au substrat, d'augmenter la concentration de substrat autour de l'enzyme et ainsi d'accroître de deux à cinq fois leur activité (Guillén *et al.*, 2009 ; Cuskin *et al.*, 2012).

Un CBM est défini comme un domaine protéique contigu à un domaine catalytique, et qui possède un pli discret ayant une activité de liaison aux sucres. Ils n'ont pas de position particulière sur la séquence des GHs. Ils peuvent se localiser en N- ou C-terminal ou bien au milieu de la GH. L'exigence de CBM existant en tant que modules dans de plus grandes enzymes, place cette classe de protéine liant les sucres en dehors des autres protéines de liaison aux sucres non catalytiques, tels que les lectines et les protéines de transport de sucre.

Initialement découverts en 1988 chez les cellulases, Les CBM étaient classées en tant que Cellulose Binding Domains (CBD), en raison de leur fixation spécifique sur la cellulose (Gilkes, 1988 ; Tomme *et al.*, 1988). Cependant, à partir de 1999 des modules associés aux GHs fixant d'autres molécules que la cellulose tels que l'amidon, la chitine, les xylanes, les β -1,3-glucanes,...etc ont été mis en évidence tout en répondant aux critères CBM (Boraston *et al.*, 1999).

A ce jour, 81 familles de CBM sont connues. Du point de vue structural, ces modules renferment entre 30 à 200 résidus d'acides aminés. Ils peuvent se présenter aussi bien sous la forme d'un seul domaine que sous la forme de multi-domaines. Les CBM sont généralement reliés au domaine catalytique des GHs par l'intermédiaire de séquences de liaison (linker) riches en proline et en acides aminés hydroxylés tels que la sérine et/ou la thréonine (Tomme *et al.*, 1995 ; Divne *et al.*, 1998).

La résolution de la structure 3D (dimension) de plus de 81 familles de CBMs a permis de les classer en sept superfamilles (tableau 1)

Tableau 1: Les superfamilles de repliements des CBMs (Hashimoto, 2006) (Annexe n°01)

Super-famille	Repliement	Famille des CBMs
1	Beta-sandwich	4, 6, 11, 25, 26, 31, 33, 34
2	Beta-trèfle	13, 42
3	Noeud de cystéine	1
4	Unique	5,12
5	Motif OB	10
6	Motif Hévéine	18
7	Unique	14

La plupart des CBMs présentent un repliement tridimensionnel de type β -sandwich, constitué essentiellement de deux feuillets β , comprenant chacun trois à six brins β anti-parallèles (figure 1). Ce repliement est observé entre autres dans les CBM des familles 20, 21, 2, 25, 26, et 34 fixant l'amidon (Janeček *et al.*, 2011).

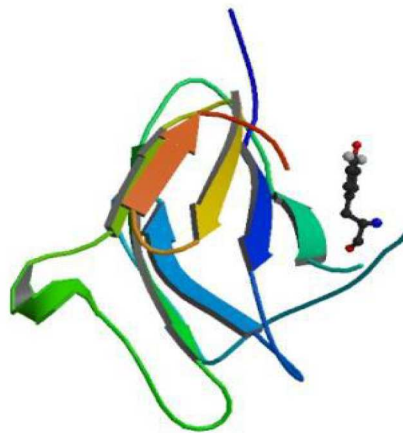


Figure 1 : Structures tridimensionnelles de CBM25 de l'amylase de *Bacillus halodurans* (pdb2c3v)

1.2. Modes d'action des GHs

Le mode d'action des glycosides hydrolases est basé sur l'hydrolyse du substrat qui peut être endo- ou exolytique. Le mode endolytique se traduit par la rupture de la liaison osidique de manière aléatoire à l'intérieur de la chaîne polysaccharidique. Quant au mode exolytique, il se traduit par la dégradation du polysaccharide à partir de l'extrémité réductrice ou non réductrice et peut être processive. Dans ce cas, le substrat reste associé à l'enzyme et les sucres sont libérés à partir de l'extrémité nouvellement créée (figure 2).

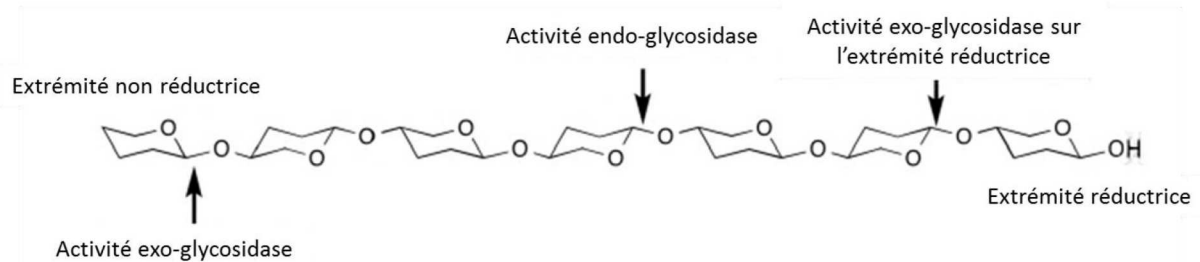


Figure 2: Représentation schématique d'un polysaccharide et des sites de coupures pour les enzymes à activité endoglycosidase ou exoglycosidase des GHs (« CAZypedia » 2016).

1.3. Topologies du site actif des GHs

Le mode d'action d'une enzyme est dicté par la structure du site actif (Davies et Henrissat, 1995) (figure 3). Ainsi la topologie du site actif en forme de poche (ou cratère) est caractéristique pour les exo-enzymes. Cette topologie est optimale pour la reconnaissance de l'extrémité non-réductrice d'un saccharide ou réductrice d'une chaîne d'oligo- ou de polysaccharide. Elle est retrouvée chez les monosaccharidases et les exopolysaccharidases. Cette topologie n'est pas du tout adaptée aux substrats fibreux tels que la cellulose, par exemple.

La crevasse (ou sillon) est une structure ouverte qui permet la fixation de plusieurs unités de sucre des substrats polysaccharidiques. Cette topologie est retrouvée chez les endopolysaccharidases, tel que les α -amylases GH13.

La dernière topologie en tunnel dérive de la précédente, lorsque la protéine présente de longues boucles, recouvrant une partie de la crevasse pour former une structure en tunnel. Dans ce cas, le produit enzymatique peut être libéré, bien que la chaîne polysaccharidique reste fermement liée, ce qui permet à l'enzyme de réaliser plusieurs cycles consécutifs d'hydrolyse, se définissant sous le terme de « processivité » (Breyer et Matthews, 2001). Ce processus est probablement un facteur clé pour l'efficacité enzymatique sur des substrats insolubles tel que la cellulose microcristalline.

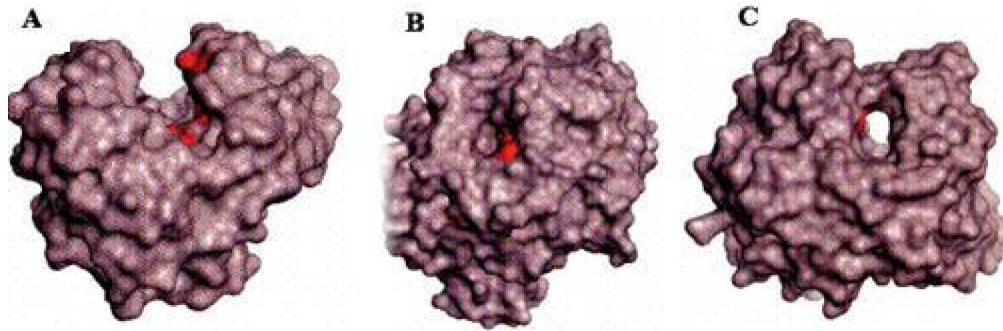


Figure 3: Topologie du site actif des GHs (A: forme de poche, B: forme de sillon, C: forme de tunnel) (Maktouf, 2013).

1.4. Mécanismes d'action catalytique des GHs

Deux mécanismes d'actions sont retrouvés le plus couramment chez les GHs. Ils ont été décrits pour la première fois par Koshland en 1953. Dans la plupart des cas, l'hydrolyse de la liaison glycosidique est catalysée par deux résidus d'acides aminés de l'enzyme : un acide donneur de protons et un autre agissant comme un nucléophile/base (Davies et Henrissat, 1995). En fonction de la position spatiale de ces résidus catalytiques. L'hydrolyse se produit par rétention ou inversion globale de la configuration anomérique. Un mécanisme complètement indépendant a été récemment démontré pour deux familles de glycosidases GH4 et GH109 utilisant le NAD^+ comme cofacteur (Rajan *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2007).

1.5. Le site actif et les sous-sites de fixation du substrat

Avant 1997, la nomenclature des sous-sites n'était pas cohérente pour toutes les GHs. Une nouvelle nomenclature a été alors proposée prenant en compte deux critères primordiaux :

- La position relative des sous-sites par rapport au point d'hydrolyse.
- La conservation de la numérotation des sous-sites du côté réducteur et non réducteur lors de nouveaux complexes.

La cartographie des sous-sites adoptée est donc une nomenclature de type $-n$ à $+n$ représentant respectivement l'extrémité non-réductrice et réductrice. Le site de coupure se situant par définition entre les sous-sites -1 et $+1$. Dans le site catalytique des enzymes à activité endoglycosidase, les polysaccharides sont orientés avec leur extrémité réductrice du côté des sous-sites positifs et l'extrémité non- réductrice du côté des sous-sites négatifs. Chez les enzymes à activité exoglycosidase qui hydrolysent les ramifications, le résidu à hydrolyser se situe dans le sous-site -1 et la chaîne principale du polysaccharide vient se fixer dans les sous-sites positifs (Davies *et al.*, 1997) (figure 4).

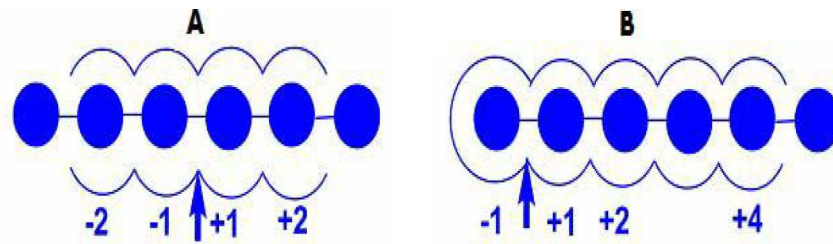


Figure 4 : Sites de coupure des A: endo-enzymes et B: exo-enzymes

2. Les activités amylolytiques

2.1. Définition de l'activité amylolytique

L'activité α -amylolytique est définie comme une activité enzymatique responsable de la rupture des liaisons α -(1,4)-glucosidiques présentes dans l'amidon. Cette activité endolytique est déployée par deux catégories différentes d'enzymes. Ces dernières sont classées sur la base de leur homologie de séquences dans les familles 13, 57 et 119 des glycosides hydrolases. Par ailleurs, l'amidon peut aussi être hydrolysé par des enzymes exolytiques du type β -amylases (famille GH14).

2.2. L'Amidon substrat des amylases

L'amidon est un polysaccharide d'origine végétale qui est composé de deux types d' α -glucanes, l'amylose et l'amylopectine, représentant globalement 98 à 99% de son poids sec total.

2.2.1. L'Amylose

L'amylose, fraction minoritaire, représente 15 à 25% de l'amidon. Il est constitué de longues chaînes linéaires d'unités D-glucopyranosyle, liées en α -(1,4) pouvant aller de 10^5 à 10^6 Da en masse moléculaire. L'amylose présente une structure hélicoïdale renfermant de 6 à 8 résidus glucopyranosyle par tour de spire (pas de l'hélice 10,6 Å). Il est localisé dans la zone amorphe du granule d'amidon (Malumba *et al.*, 2011) (figure 5). On retrouve cependant deux types de chaînes dans l'amylose : des chaînes strictement linéaires, et des chaînes modérément ramifiées, qui représentent 25 à 55% de la molécule selon l'espèce étudiée (Takeda *et al.*, 1987).

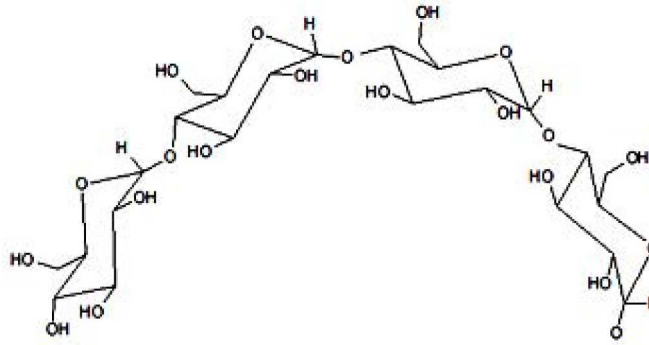


Figure 5: Structure de l'amylose

2.2.2. L'Amylopectine

C'est l'un des plus grands polymères d'unités glucosyle présents dans la nature avec un poids moléculaire compris entre 10^7 et 10^8 Da. L'amylopectine constitue la fraction majoritaire de l'amidon, puisqu'elle représente 70 à 80% de son poids sec. Elle est principalement constituée d'une chaîne linéaire de résidus D-glucopyranosyle liés en α -(1,4), et 5 à 6% de ramifications en α -(1,6). L'ensemble confère à l'amylopectine une structure arborescente. Ainsi, au sein de l'amidon, les points de branchement sont concentrés dans certaines régions, appelées lamelles amorphes. Les chaînes linéaires, elles, s'organisent en doubles hélices au sein de la lamelle cristalline (Parada, 2012) (figure 6). La structure en grappe de l'amidon est donc constituée d'une lamelle cristalline et une lamelle amorphe. Elle mesure 9 nm quelle que soit l'espèce végétale considérée.

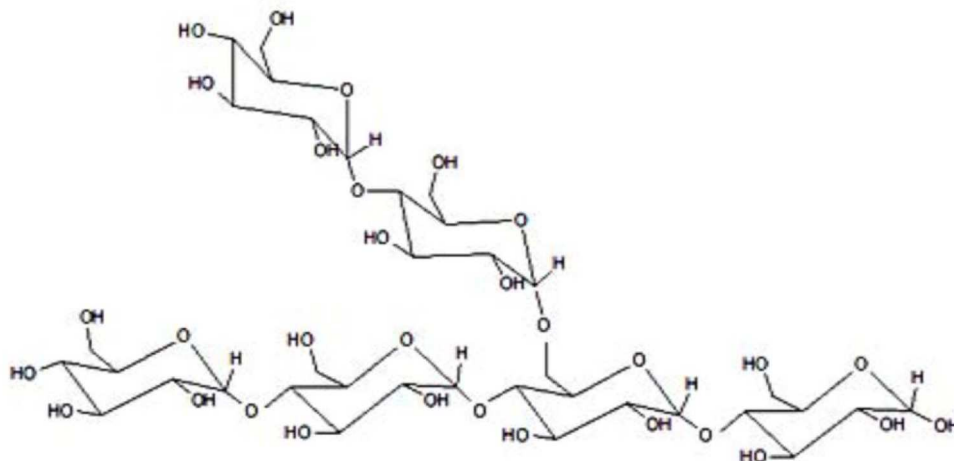


Figure 6: Structure de l'amylopectine

2.3. Définition des amylases

Les micro-organismes élaborent un large éventail d'amylases, intracellulaires et/ou extracellulaires (Mohsen *et al.*, 2005). Les amylases intracellulaires sont importantes pour divers processus cellulaires et métaboliques, tels que la sporulation, le renouvellement des

protéines, la maturation des enzymes et des hormones et le maintien du taux protéique cellulaire (Yakup *et al.*, 2010). Les amylases extracellulaires sont importantes pour l'hydrolyse de l'amidon et de la cellulose dans des environnements exempts de cellules. Elles permettent à la cellule d'absorber et d'utiliser des produits hydrolytiques (Chi Wen Li *et al.*, 2011). En même temps, ces amylases extracellulaires ont également été exploitées commercialement pour aider la dégradation de l'amidon dans divers processus industriels (Encarnacion *et al.*, 2011).

Lors de la régulation de la production des amylases, plusieurs études ont montré que les amylases sont produites avec un niveau basal, qui va permettre l'hydrolyse de l'amidon et la libération de produits de faible masse moléculaire. Ces produits d'hydrolyse vont pénétrer par la suite dans la cellule et induire la synthèse d'amylases. Dans ce cadre, le maltotétraose a été décrit comme un bon inducteur des amylases (Maktouf, 2013).

2.3.1. Les α -amylases

Les α -amylases (EC3.2.1.1), classées dans la famille GH-13 des glycosides hydrolases, sont les enzymes endo-actives. 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 (Bahareh *et al.*, 2011). 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 ; Sivaramkrishnan *et al.*, 2006).

2.3.2 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. 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 dextrines limites. Ce sont des enzymes qui inversent l'anomérisation de la liaison selon un mécanisme en une seule étape. Le maltose libéré aura donc une anomérisation β .

2.4. Source des alpha-amylases

Les α -amylases sont des enzymes ubiquitaires produites par les plantes, les animaux et les microbes, où elles jouent un rôle dominant dans le métabolisme des glucides (Varel *et al.*, 1994). 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). Les amylases provenant de sources végétales et microbiennes sont utilisées pendant des siècles comme additifs alimentaires (Mabel *et al.*, 2008). Celles de l'orge sont utilisées dans l'industrie brassicole, tandis que les amylases fongiques et bactériennes sont principalement utilisées pour des applications industrielles. Cela en raison de leur rentabilité, de leur cohérence, 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).

2.5. Les différentes familles des amylases

Les enzymes qui possèdent une activité amylolytique sont classées sur la base de leur homologie de séquences dans les familles GH13, 57, 119 et 14.

2.5.1. Famille des GH13

La famille GH13 regroupe les enzymes sur la base de leurs homologies de séquences reflétant des traits structuraux et mécanistiques communs. La famille 13 des GH est communément appelée famille des " α -amylases". Elle renferme 49476 séquences dont 812 caractérisées et compte 26 activités enzymatiques différentes (« CAZy - Home », 2017). L'analyse des homologies de séquences des enzymes de cette famille par Stam *et al.*, (2006) a permis de proposer une division de la famille 13 en 42 sous-familles dotées d'activités distinctes. Cette sous-classification comprend aussi des transporteurs d'acides aminés répertoriés dans les sous-familles.

2.5.1.1. Spécificité de substrat et de produit

La famille GH13 présente le plus de diversité de fonction dans le groupe des GHs, leurs activités enzymatique regroupent des hydrolases, des transglycosidases et des isomérasés (MacGregor *et al.*, 2001). Elle comprend des enzymes qui catalysent le clivage de liaisons α -glucosidiques par un même mécanisme de rétention de la configuration α -anomérique pour produire des mono- ou oligosaccharides α -anomères (hydrolyse) ; ou pour synthétiser des liaisons glycosidiques α -(1,4) ou α -(1,6) (transglycosylation) ; ou bien pour présenter les deux activités. Les GH13 peuvent agir sur une large variété de substrats tels que l'amylose, l'amidon, le glycogène, les maltooligosaccharides ou encore le saccharose et le tréhalose (Kelly *et al.*, 2009).

2.5.1.2. Mécanisme d'action catalytique des enzymes de la famille GH13

Le clivage de la liaison osidique s'opère entre les sous-sites -1 et +1. La catalyse procède selon un double-déplacement impliquant un acide glutamique, jouant alternativement le rôle de catalyseur acide-base et un acide aspartique jouant le rôle de nucléophile. Un troisième résidu catalytique (un acide aspartique) intervient conjointement avec deux

histidines conservées au sein de la famille GH13, afin de stabiliser le complexe intermédiaire covalent.

2.5.1.3. Structure et organisation des domaines

Les enzymes de la famille 13 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 7). En dehors de ces trois domaines, certaines enzymes de la famille possèdent aussi des modules supplémentaires aux extrémité C ou N-terminales, tels que des domaines de liaison au substrat CBM, ou des modules de fonction inconnue (Jespersen *et al.*, 1991 ; Janecek, 1997).

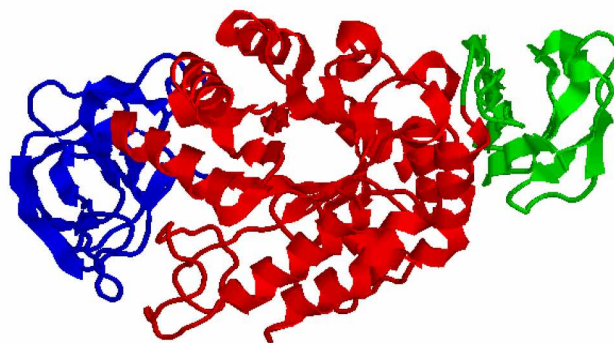


Figure 7: Structure du module GH13 de l' α -amylase de *Bacillus halmapalus* (Davies *et al.*, 2005). En rouge le domaine A, en bleu le domaine B et le domaine C en vert

- **Le domaine A** : est le plus conservé, il renferme le site catalytique en forme de sillon ou de poche selon les enzymes. Il est situé dans la plupart des cas à l'extrémité N-terminale de la protéine et adopte une structure en tonneau $(\beta/\alpha)_8$ (Macgregor *et al.*, 1996). Le site actif se trouve dans une crevasse entre le domaine A et le domaine B (Brzozowski et Davies, 1997). Il comprend une triade catalytique formée d'un acide glutamique (Glu) jouant le rôle du donneur de proton. D'un acide aspartique (Asp) agissant comme nucléophile. Enfin un second acide aspartique intervenant dans la stabilisation de l'intermédiaire covalent glycosyl-enzyme (Uitdehaag *et al.*, 1999). La liaison au substrat se trouve dans la boucle C-terminale des feuilletts β de ce domaine.

- **Le domaine B** : est une boucle, de longueur variable, insérée entre le feuillet β_3 et l'hélice α_3 du tonneau catalytique $(\beta/\alpha)_8$ (Janecek *et al.*, 1997). Sa structure primaire et sa structure tertiaire varient grandement d'une enzyme à l'autre. De nombreux travaux indiquent qu'il joue un rôle important dans le contrôle de la spécificité de substrats, ou de produits des enzymes de la famille 13 (Janecek *et al.*, 1997). Il est aussi impliqué dans la liaison des ions

calcium (Ca^{2+}) qui ont un rôle structural. Ils maintiennent la chaîne polypeptidique dans une conformation correcte pour sa stabilité et son activité enzymatique (Boel *et al.*, 1990). La liaison de Ca^{2+} au domaine B facilite son interaction avec le domaine A.

- **Le domaine C** : suit le domaine A et constitue la partie C-terminale de la séquence juste après le tonneau catalytique $(\beta/\alpha)_8$. Il possède une structure tertiaire β -sandwich (MacGregor, 1988) en forme de clef grecque (Ramasubbu *et al.*, 1996). Les deux domaines B et C sont situés sur les côtés opposés du repliement $(\beta/\alpha)_8$ TIM barrel.

Le repliement TIM barrel $(\beta/\alpha)_8$ est constitué de 8 feuillets β parallèles et de 8 hélices α . Les feuillets β et les hélices α alternent le long de la chaîne polypeptidique. Ils sont reliés entre eux par des boucles irrégulières. Les boucles 1 à 8 liants les extrémités C-terminales des feuillets β aux extrémités N-terminales des hélices α adjacentes portent les acides aminés impliqués dans la fixation et la catalyse du substrat (une triade catalytique composée de deux aspartames et d'un glutamate) (figure 8).

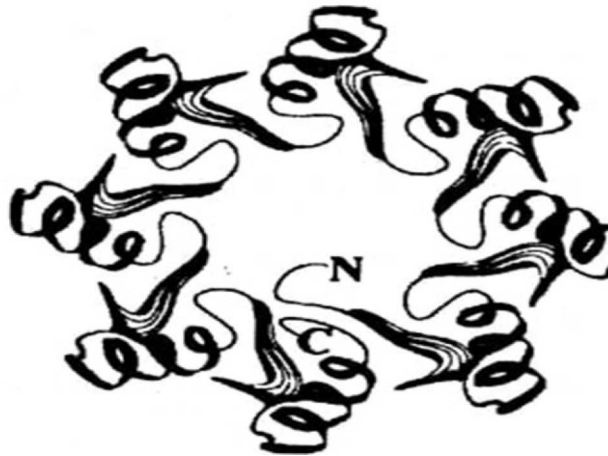


Figure 8: Représentation schématique du repliement $(\beta/\alpha)_8$ (TIM barrel) trouvé chez GH13 et GH14 (Kuriki et Imanaka, 1999)

Les alignements de séquences de différentes α -amylases a permis de mettre en évidence quatre régions conservées (de I à IV) (figure 9). Elles constituent la signature de la famille GH13. Elles se trouvent au niveau du tonneau catalytique $(\beta/\alpha)_8$ sur les brins 3 , 4 et 5 et dans la boucle reliant le brin β 7 à l'hélice α 7 (Jespersen *et al.*, 1993 ; Sarcabal *et al.*, 2000). Une étude par mutagenèse dirigée guidée par ces travaux d'alignement a permis à Sarcabal *et al.*, (2000) d'identifier les résidus catalytiques du site actif.

Enzyme	Région VI β2	Région I β3	Région II β4	Région III β5	Région IV β7
TAKA	56_GFTAIWIT-P	117_DVWANH	202_GLRIIDTVKH	230_EVLD	292_FVE--NHD
AMY1	34_GVYHVWLP-P	98_DIVINH	176_AWRIDFARG	205_EVWD	236_FVD--NHD
AS	126_GLTYIHLM-P	182_DEIFNH	282_ILRMDAVAF	328_EAIV	388_YVR--SHD
OLG	44_GIDVINLS-P	98_DIVINH	196_GFRMDVINP	255_EMPG	324_YWN--NHD
CGT	70_GVTALWISQP	135_DEAPNH	226_GIRVDAVKH	257_EWFL	323_FID--NHD
SUP	34_AIGGVHLL-P	82_DFMINH	192_LIRLDAFAY	215_EIWD	290_TLD--THD
TRS	54_GVDCIHWVP-P	108_DFVMNH	206_GFRLDVVPY	252_EANQ	322_FLR--NHD

Figure 9: Régions conservées de quelques enzymes de la Famille GH 13 (Sarcabal *et al.*, 2000)

En Rouge : les résidus strictement conservés (triade catalytique) ; **en Bleu :** les résidus les mieux conservés.

TAKA: α -amylase d'*Aspergillus oryzae*, **AMY1:** α -amylase d'orge, **As:** l'amylosaccharase de *N. polysacchara*, **OLG:** oligo-1,6-glucosidase de *Bacillus cereus*, **CGT:** cyclodextrine glucanotransférase de *Bacillus circulans* 8, **SUP:** sucrose phosphorylase de *Leuconostoc mesenteroides*, **TRS:** trehalose synthétase de *Pimelobacter* sp. R48.

2.5.2. Famille des GH57

La famille GH57 a été créée en 1996, c'est une famille multispécifique comprenant 1936 séquences dont 24 caractérisées. La première séquence caractérisée date de 1988 avec l' α -amylase de *Dictyoglomus thermophilum* (Fukusumi *et al.*, 1988). Il faudra attendre plus de dix ans pour qu'une première structure tertiaire, celle de la 4- α -glucanotransférase TLGT de l'archaea hyperthermophile *Thermococcus litoralis* (Imamura *et al.*, 2003), soit publiée.

2.5.2.1. Mécanisme d'action

La détermination des produits de réaction catalysée par l'enzyme de branchement produite par *Thermus thermophilus* ainsi que l'observation de l'intermédiaire glycosyl-enzyme ont permis de mettre en évidence que l'enzyme agissait selon le mécanisme de rétention de la configuration anomérique décrit par Koshland (1953).

2.5.2.2. Les différentes activités

La famille GH57 comprend les activités suivantes : α -amylase (EC 3.2.1.1), α -galactosidase (EC 3.2.1.22), amylopullulanase (CE 3.2.1.41), 4- α -glucanotransférase (CE 2.4.1.25) et des enzymes de branchement (EC 2.4.1.18).

2.5.2.3. Structure tridimensionnelle

Avant la résolution de la première structure d'une enzyme de la famille GH57, plusieurs efforts ont été déployés pour tenter d'unir cette famille à la famille GH13 dans le clan GH-H.

Cependant, la famille GH57, malgré une prédominance d'activités amylolytiques, elles ne présentent pas de similitude de séquence avec les familles du clan GH-H. En particulier, elles n'ont pas le même domaine catalytique et ne possèdent pas les régions conservées caractéristiques des enzymes de la famille GH13 (Janecek, 2002 ; Zona *et al.*, 2004).

Le repliement de la famille GH57 a ainsi pu être caractérisé comme présentant une architecture en tonneau de type $(\beta/\alpha)_7$. Ce repliement est assez rare au sein des glycosides hydrolases, mais il est néanmoins rencontré dans quelques familles, notamment la famille GH119. Au-delà de son repliement, cette famille présente plusieurs originalités. Elle n'est en effet présente que chez les procaryotes, dont un grand nombre est issu de milieux extrêmes, en particulier de milieux à hautes températures.

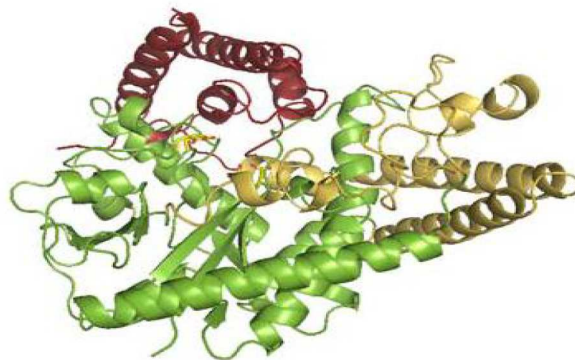


Figure 10: Structures tertiaires de l' α -amylase de *Thermotoga maritima* 2B5D (GH57) (Dickmanns *et al.*, 2006)

Le domaine A est coloré en vert, en jaune **le domaine B** et **le domaine C** en rouge.

Topologiquement, le domaine central catalytique en TIM barrel $(\beta/\alpha)_7$ constitue le domaine A. La structure présente en outre deux domaines additionnels, peu similaires, mais superposables (figure 10) :

Le domaine B, qui est un domaine fonctionnel constitué d'hélices α insérées entre des éléments de structure secondaire du domaine A.

Le domaine C, de composition variable située en position C-terminale.

L'alignement de toutes les séquences disponibles de la famille GH57 (Zona *et al.*, 2004) a permis de mettre en évidence cinq régions conservées. Le nucléophile catalytique (Glu) et le catalyseur acide/base (Asp) étant situés respectivement dans les régions conservées 3 et 4 (figure 11).

GH57:					
57_AAMY_Mccja	8_EVHQP	96_GNVELI	142_RNTELI	235_YM Y YETFGHEH	349_LQTSNLIYY
57_PAMY_Botth	9_EIHQI	98_GCCEFL	143_RNSSLI	240_FMEL S SALGMA	343_LQASNNFRF
57_APU_Pycfu	39_HQHQP	262_GNVEVT	314_WAA E SA	418_TLD G ENPWEH	566_AEASDWFWW
57_APU_Thchy	40_HQHQP	263_GNVEVT	315_WAA E SA	418_TLD G ENPVEN	565_AEASDWFWW
57_APU_Thcli	37_HQHQP	260_GNVEVT	312_WAA E SA	416_TLD G ENPWEH	562_AEASDWFWW
57_APU_Thesi	45_HQHQP	268_GNVEVT	320_WAA E SA	424_TLD G ENPWEH	572_AEGSDWFWW
57_BE_Thcko	10_HTHIP	134_GYVEVI	180_WLPE C A	352_PYD E TELF G HW	463_LEASDWQFL
57_BE_Theth	9_HAHL P	135_GQ V ELI	181_WLPE M A	351_PYD E AELF G HW	456_LEASDW W FL
57_BE_Thtma	10_HAHL P	135_GK L EIV	182_WLAE C G	347_PFD E AELF G HW	460_AQSSDWAFI
57_4AGT_Argfu	11_HNHQP	76_GQ I EIV	120_WLTER V	212_HD G EKFGVW	350_AQCNDAYWH
57_4AGT_Pycfu	12_HNHQP	76_GQ V EIV	121_WLTER V	213_HD G EKFGI W	351_AQCNDAYWH
57_4AGT_Thcko	11_HNHQP	76_GQ L EIV	120_WLTER V	212_HD G EKFGVW	350_AQCNDAYWH
57_4AGT_Thcli	11_HNHQP	76_GQ L EIV	120_WLTER V	212_HD G EKFGVW	350_AQCNDAYWH
57_4AGT_Dicth	12_HNHQP	77_GQ I EFV	122_WLAE R V	214_FD G EKFGI W	359_GQANDAYWH
57_AGAL_Pycfu	7_HGNLQ	69_GLIE I L	114_WLPE L A	246_GTD I EFLGYR	331_AENS D ARGW
57_MGA_Pycfu	10_HAYQP	104_TY V EPV	150_WLPE N V	251_SS D ELESLVAN	445_ANHSCPRFW
57_AMY_Uncba	10_HFYQP	106_GHG N AI	151_WLPE T A	261_AD G ETYGHH	426_MYTSCGWFF

Figure 11: Les cinq régions conservées dans la famille GH57 (Janeček *et al.*, 2012).

En rouge : les résidus catalytiques, **en jaune :** les résidus décrits comme importants dans l'activité ou la spécificité des enzymes. **AAMY:** α -amylase ; **PAMY:** α -amylase putative -like protein; **APU:** amylopullulanase; **BE:** enzyme de branchement; **4AGT:** 4- α -glucanotransferase; **AGAL:** α -galactosidase; **MGA:** maltogenic amylase; **AMY:** amylase.

2.5.3. Famille des GH119

La famille 119 des glycosides hydrolases contient l'alpha-amylase produite par *Bacillus circulans* et quatorze autres protéines hypothétiques. A l'heure actuelle, très peu d'informations sur les caractéristiques biochimiques, mécanistiques et structurales de cette famille sont malheureusement disponibles. Janecek et ses collaborateurs (2012) ont très récemment mis en évidence une relation nette entre les familles GH57 et GH119. Une analyse *in silico* indique en effet clairement une similarité entre les régions conservées (figures 12), les résidus catalytiques et le repliement du domaine catalytique de type $(\beta/\alpha)_7$ pour ces deux familles (figures 13). Il n'y a pas de corrélation entre les repliements et les mécanismes catalytiques observés. Dans la séquence de l'alpha-amylase de *B. circulans* les résidus Glu231 et Asp373 jouent respectivement le rôle de nucléophile et de donneur de proton. Janecek propose de ce fait de regrouper les familles GH57 et GH119 dans un nouveau clan (Janecek *et al.*, 2012).

	CSR1	CSR2	CSR3	CSR4	CSR5
GH119:					
119_Bacci	40_HNHMP	178_NRLDLI	228_FPTE L LG	371_AH D GDNSSGR	502_AKTAEQIWL
119_Cocco	34_HNHMP	172_RSLDLI	222_FPTE L LG	367_AH D GDNSSGR	497_AKTAEQIWL
119_Pabcu	48_HNHMP	186_RTMDLI	236_FPTE L LG	379_AH D GDNASGR	510_AQTAEQIWL
119_Pabmu_1	38_HNHMP	176_RTMDMV	226_FPTE L LG	369_AH D GDNSSGR	500_AKTAEQIWL
119_Pabmu_2	81_HNHMP	219_RTMDMV	269_FPTE L LG	412_AH D GDNSSGR	543_AKTAEQIWL
119_Stiau	33_HNHMP	171_RTLDLI	221_FPTE L LG	366_AH D GDNSSGR	496_AKTAEQIWL

Figure 12: Les cinq régions conservées de la famille GH119 (Janecek *et al.*, 2012).

Bacci : *Bacillus circulans* AM7 ; **Cocco:** *Coralloccoccus coralloides* DSM 2259; **Pabcu:** *Paenibacillus curdolanolyticus*; **Pabmu-1:** *Paenibacillus mucilaginosus* 3016; **Pabmu-1:** *Paenibacillus mucilaginosus* KNP414 ; **Stiau:** *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1

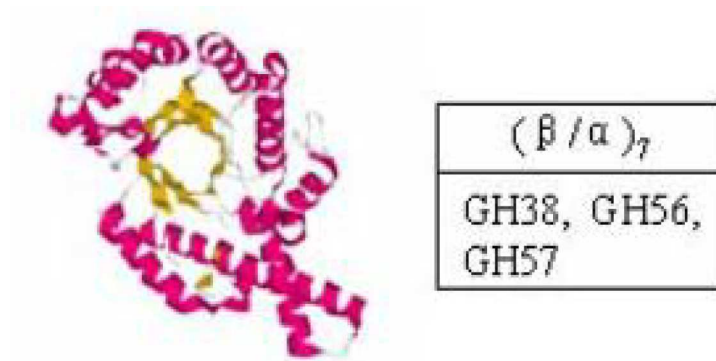


Figure 13: Illustration du repliement $(\beta/\alpha)_7$ trouvé chez GH57 et GH119 (Stam, 2006)

2.5.4. Famille des GH14

Les β -amylases appartiennent à la famille GH14 selon la classification CAZy définie par Henrissat *et al.*, (2001). Cette famille regroupe de nombreuses enzymes qui n'ont qu'une seule activité connue, l'activité β -amylase (EC 3.2.1.2). Elle renferme 499 séquences dont 30 caractérisées.

On retrouve au sein de leur séquence trois domaines hautement conservés, dans lesquelles ont été identifiés deux résidus situés à l'extrémité C-terminale du domaine catalytique. Ils sont impliqués dans la réaction catalytique. Il s'agit de deux résidus d'acide glutamique. La résolution de structures tridimensionnelles montre une structure commune à ces enzymes sous forme de tonneau $(\beta/\alpha)_8$ (figure 14).

Trois domaines de séquences hautement conservés sont présents dans toutes les β -amylases connues. Le domaine A est situé dans la section N-terminale des enzymes. Il contient un acide aspartique connu pour être impliqué dans le mécanisme catalytique (Sakiyama *et al.*, 1989). Le domaine B située à un endroit plus central, est centrée sur un glutamate impliqué également dans le mécanisme catalytique (Totsuka *et al.*, 1994). Enfin le domaine C semble jouer le rôle de domaine de fixation au substrat.

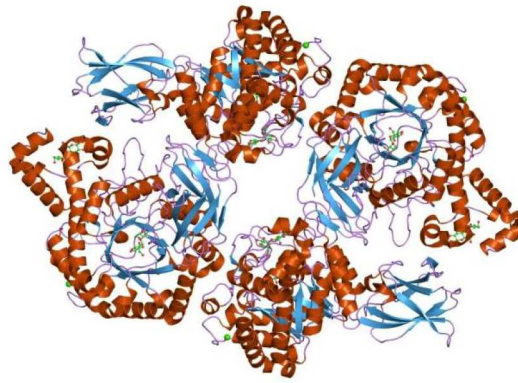


Figure 14: beta-amylase de *Bacillus cereus* var. *mycoides* en complexe avec le maltose Brayer *et al.*, (1995).

2.6. Applications industrielles des activités amylolytiques

Commercialisées pour la première fois en 1984 (Gupta *et al.*, 2003), les amylases sont d'une grande importance en biotechnologie. Leur marché représente environ 25-33% du marché mondial des enzymes (Sharma *et al.*, 2013). Elles trouvent des applications 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)

2.6.1. Liquéfaction de l'amidon et saccharification

Les enzymes amylolytiques sont très utilisées pour la production d'hydrolysats d'amidon, en particulier de sirops à haute teneur en fructose très utilisés comme édulcorants dans les boissons gazeuses (Crabb et Mitchinson, 1997). Le processus comprend deux étapes enzymatiques : la liquéfaction et la saccharification. Il exploite toute une panoplie d'enzymes donnant un ensemble varié de produits. De telles enzymes sont largement utilisées dans l'alimentation, les industries chimiques et pharmaceutiques (Nigam et Singh, 1995).

2.6.2. 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).

2.6.3. 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 des 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).

2.6.4. La détergence

Les amylases sont les enzymes les plus utilisées dans la formulation des détergents enzymatiques derrière 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.

2.6.5. 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).

2.6.6. Les biocarburants

Plus récemment, la commercialisation d'amylases a été fortement stimulée par le développement des biocarburants de première génération, en particulier pour la production de bioéthanol.

Traditionnellement, la fermentation de l'éthanol dépend de substrats riches en sucre, principalement la canne à sucre, car leur hydrate de carbone est sous forme fermentescible. Cependant, la canne à sucre est un substrat coûteux et non disponible en continu car c'est une culture saisonnière (DeMoraes *et al.*, 1999), c'est pour ça qu'il est remplacé par l'amidon, le substrat le plus utilisé en raison de son faible coût et de sa disponibilité (Chi *et al.*, 2009).

L'amidon est hydrolysé par voie enzymatique en sucre fermentescible via un processus de liquéfaction et de saccharification avant la fermentation de l'éthanol par la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Rao et Satyanarayana, 2007). Afin d'obtenir une nouvelle souche de levure qui puisse directement produire de l'éthanol à partir d'amidon sans avoir recours à une pré-saccharification, la fusion de protoplastes a été réalisée entre la levure amylolytique *Saccharomyces fibuligera* et *S. cerevisiae* (chi *et al.*, 2009).

2.6.7. Autres applications

Les α -amylases sont également étudiées actuellement pour plusieurs autres applications telles que la biodégradation des n-alcane, la synthèse de nanoparticules et autres (Karimi et Biria, 2016). Dans une étude, le potentiel bio-réducteur de *Micrococcus luteus* pour la synthèse de nanoparticules d'or (PNG) a été étudié. L' α -amylase extracellulaire et l'acide teichuronique de la paroi cellulaire (TUA) de *M. luteus* ont été utilisés dans la synthèse de nanoparticules d'or (Arunkumar *et al.*, 2013).

3. Les actinomycètes

3.1. Caractéristiques générales

Les actinobactéries filamenteuses sont un groupe de micro-organismes unicellulaires ramifiés, dont la plupart se composent de mycéliums aérobie formant un mycélium de substrat et un autre aérien. Ils se reproduisent par fission binaire ou en produisant des spores asexuées ou des conidies. La sporulation des actinobactéries, est due à la fragmentation et la segmentation ou la formation de conidies. La chimie de leur paroi, en particulier celle du peptidoglycane, la séquence de l'ARNr 16S et la forte teneur en G+C% de leur ADN (70%) sont également caractéristiques de ce groupe de bactéries. L'aspect morphologique des actinobactéries est compact, souvent coriace, donnant un aspect conique avec une surface sèche sur les milieux de culture et est fréquemment recouvert de mycélium aérien.

Elles présentent un cycle biologique semblable à celui de certains champignons, mais leur structure procaryotique, sans noyau distinct, les classe parmi les bactéries. Cependant leur croissance est plus lente que celle des autres bactéries ; le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (Larpen et Sanglier, 1989). En effet, leurs parois ne renferment ni cellulose ni chitine (Kikani *et al.*, 2010) mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives). Enfin, elles sont sensibles aux antibiotiques antibactériens (Koneman, 2006), aux attaques des bactériophages et des lysozymes (Hawker et Linton, 1971).

3.2. Classification morphologique

Les principales caractéristiques utilisées pour délimiter la taxonomie des actinobactéries au niveau du genre et de l'espèce sont la morphologie microscopique et la chimiotaxonomie. La dernière de ces caractéristiques concerne principalement la composition de la paroi cellulaire et la distribution du sucre dans la cellule entière, bien que la composition en phospholipides et en ménaquinone puissent également être prise en compte (Labeda, 1987).

Les actinobactéries présentent une grande variété de morphologies, différant principalement par la présence ou l'absence de mycélium de substrat ou de mycélium aérien, la couleur du mycélium, la production de pigments mélanoides diffusibles et la structure et l'aspect de leurs spores (Holt *et al.*, 1994).

Il existe des groupes qui ne forment qu'un mycélium de substrat poussant à la surface et dans le milieu de culture, ou un mycélium aérien dont les hyphes sont attachés au milieu par des crampons (Kalakoutskii et Agre, 1976). En culture liquide et sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (Van Keulen *et al.*, 2003). Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores.

3.3. Phylogénie des actinomycètes

La taxonomie microbienne est une branche complexe de la biologie. Il est acquis que le vivant se divise en trois domaines principaux et bien distincts : celui des *Archae*, celui des *Bacteria* et celui des *Eucarya*. Cette division du vivant s'appuie sur les travaux de comparaison de séquences ADNr de Carl Woese (Woese, 1987). Parmi le groupe des *Bacteria*, il existe un groupe de microorganismes appelé actinomycètes, qui sont les bactéries aérobies, Gram positif filamenteuses (formant des hyphes ramifiés) à haut taux en G+C%, elles ont la propriété de former des spores asexuées (Prescott *et al.*, 2007).

Néanmoins, d'un point de vue phylogénétique, le taxon des actinomycètes n'est pas monophylétique, il ne regroupe pas qu'un seul embranchement bien défini : il comprend le phylum complet des *Actinobacteria* qui sont les bactéries Gram positif à haut taux en G+C%, mais aussi quelques genres supplémentaires appartenant aux bactéries Gram positif pauvres en G+C%. Cela a d'ailleurs toujours été sujet à débat (Stackebrandt et Woese, 1981). L'exemple représentatif de cette difficulté de classification du vivant est le changement opéré dans le Bergey's manual of systematic bacteriology, entre la première et la seconde édition.

En effet, initialement considéré comme un groupe à part entière (Bergey, 1989), les représentants des actinomycètes se retrouvent à présent dispersés au sein des *Bacteria*, avec les *Actinobacteria* (bactéries Gram positif riches en G+C%) et des genres appartenant aux bactéries Gram positif pauvres en G+C% (Prescott *et al.*, 2007 ; Bergey, 2009 ; Bergey, 2011) (figure 15).

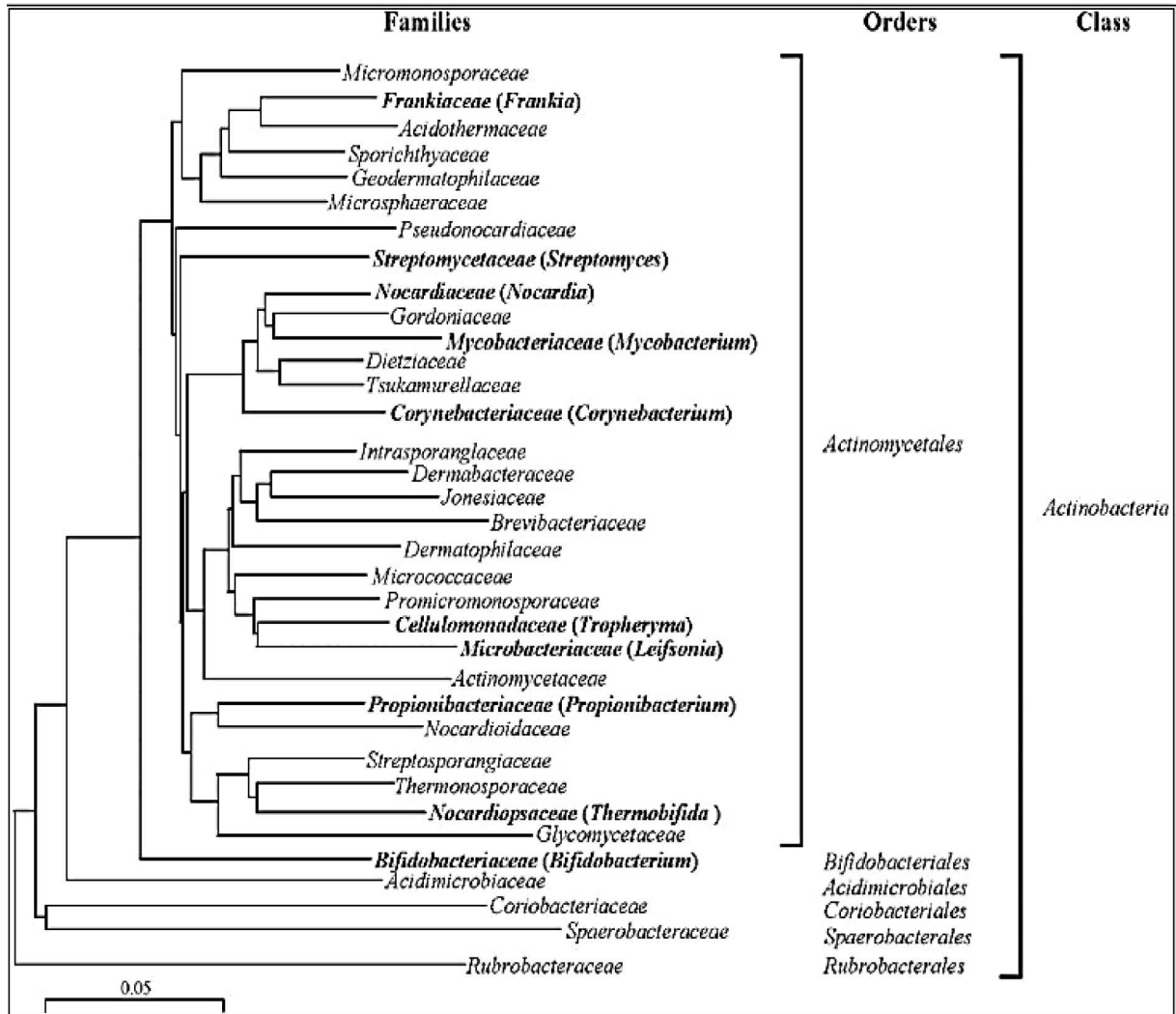


Figure 15 : Classification du phylum des *Actinobactéria* basée sur des données de séquençage de l'ADNr 16S. Les familles contenant des membres soumis au séquençage complet du génome sont représentées en gras (Zhi *et al.*, 2009).

3.4. Les types des actinomycètes

De nombreuses études ont été menées par les chercheurs pour confirmer l'existence d'actinobactéries de sol extrêmophile et extrême tolérant (tolérantes aux acides et à l'alcalinité, psychrotolérant et thermotolérants, halotolérants et halo-alkali-tolérants ou xérophiles).

3.4.1. Actinobactéries thermophiles

Les actinobactéries mésophiles peuvent croître à une température optimale de 20°C à 42°C, tandis que les espèces thermotolérantes peuvent survivre à 50°C. Les actinobactéries modérément thermophile ont une croissance optimale à 45°C-55°C (Jensen *et al.*, 2005), alors

que les actinobactéries strictement thermophiles se développent à 37°C-65°C avec une température optimale de 55°C-60°C (Jiang et Xu, 1993).

3.4.2. Actinobactéries acidophiles

Les actinobactéries acidophiles, qui sont communs dans les habitats terrestres tels que les forêts acides et le sol de drainage de la mine, se développent dans la gamme de pH d'environ 3,5 à 6,5 avec des taux optimaux de croissance à pH 4,5 à 5,5 (Khan et Williams, 1975 ; Hagedorn, 1976). Il a été démontré que les actinobactéries acidophiles forment systématiquement deux taxons distincts (neutrotolérant acidophiles et strictement acidophiles) (Khan et Williams, 1975).

3.4.3. Actinobactéries halophiles

Les actinobactéries halophiles sont classés en différents types en fonction de leur croissance dans les milieux contenant différentes concentrations en sel. Les halophiles extrêmes se développent mieux dans les milieux contenant 2,5-5,2M de sel, alors que les halophiles extrêmes limites poussent mieux dans des milieux contenant 1,5-4 M de sel, les halophiles modérés poussent mieux dans des milieux contenant 0,5-2,5M de sel, et finalement halotolérants qui ne présentent pas une exigence absolue en sel pour la croissance, mais poussent bien jusqu'à des concentrations de sel souvent très élevées et tolèrent au moins 100g/l de sel (équivalent à 1,7M de NaCl). L'eau de mer, les sols salins, les lacs salés, les saumures et les milieux salins alcalins sont considérés comme les meilleurs habitats pour isoler les actinobactéries halophiles. Les actinobactéries halophiles isolées des milieux marins sont attribuées à quelques genres, dont *Micromonospora*, *Rhodococcus* et *Streptomyces* (Maldonado *et al.*, 2005).

3.4.4. Actinobactéries endophytes

Les actinobactéries endophytes sont définis comme ceux qui habitent la partie interne des plantes, ne provoquant apparemment pas de changements visibles à leurs hôtes. Ces Actinobactéries jouent des rôles spécifiques, par exemple, protéger les plantes hôtes contre les insectes et les maladies. Les actinobactéries endophytes constituent une grande partie de la rhizosphère, qui se trouve également à l'intérieur des plantes dans lesquelles les espèces étudiées de manière extensive sont du genre *Frankia*, des bactéries fixatrices d'azote de plantes non légumineuses (Benson et Silvester, 1993), et quelques espèces du genre *Streptomyces* qui sont des phytopathogènes.

3.4.5. Actinobactéries symbiotiques

Environ 15% de l'azote mondial est fixé naturellement par les relations symbiotiques entre diverses espèces de *Frankia* appartenant à la famille des actinobactéries. Les plantes qui forment les relations symbiotiques avec *Frankia* sont appelées plantes actinorhiziennes. Les chercheurs ont trouvé plus de 160 plantes dont les hôtes sont des actinobactéries, notamment des oliviers russes, des baies des Caraïbes, des fougères douces, des broussailles amères et des rosiers des falaises. Les *Frankia* ont la capacité de fournir la plupart ou la totalité des besoins en azote de la plante hôte. Ces bactéries fixatrices d'azote et leurs plantes hôtes sont souvent des espèces pionnières sur de jeunes sols déficients en azote et perturbés tels que les coulées volcaniques et les dunes de sable (Anandan *et al.*, 2016).

3.4.6. Actinobactéries endosymbiotiques

Un endosymbionte est un organisme qui vit dans le corps ou les cellules d'un autre organisme. Le processus d'endosymbiose est parfois obligatoire, c'est-à-dire ni l'endosymbiote ni l'hôte ne peut survivre sans l'autre. Les membres du phylum Actinobacteria ont été identifiés comme étant des membres abondants des communautés microbiennes associées aux éponges (Anandan *et al.*, 2016).

3.4.7. Actinobactéries intestinales

Bien que les actinobactéries se trouvent dans divers habitats, certaines sont également connues pour former des associations intimes avec des invertébrés et des vertébrés. Les interactions symbiotiques sont essentielles principalement pour la survie et la reproduction, car ils jouent un rôle crucial dans la nutrition, la désintoxication de certains composés, les performances de croissance et la protection contre les bactéries pathogènes. De nombreuses études ont montré que certaines espèces actinobactériennes symbiotiques, telles que les probiotiques, contrôlent des maladies bactériennes chez le bétail, la volaille et l'aquaculture. Ils participent également à la santé de l'hôte en transformant les aliments en biomasse microbienne et en produits de fermentation pouvant être utilisés par l'animal hôte (Anandan *et al.*, 2016).

4. Les *Streptomyces*

4.1. Généralités

La famille des *Streptomycetaceae* a été créée en 1943 par Waksman et Henrici, Les *Streptomyces* (du grec *Streptos* : courbé, tordu et *Myces* : moisissure) sont des bactéries présentant une coloration de Gram positive, à haut pourcentage en bases G+C, variant de 69 à 78 % selon les espèces, ce genre possède le plus haut taux du vivant (Prescott *et al.*, 2003). appartenant à l'ordre des *Actinomycétales*, ce sont des bactéries filamenteuses dont le biotope est le sol où ils peuvent constituer jusqu'à 20% de la flore microbienne de ce biotope. Les *Streptomyces* présentent un cycle de différenciation complexe, caractérisé par une différenciation morphologique et biochimique (Chater, 1993).

Ces bactéries possèdent également un métabolisme assez complexe, puisque par la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires, elles sont capables de métaboliser de nombreux sucres, acides aminés, alcools et composés aromatiques. Ils produisent aussi une grande variété de composés de grands intérêts dans l'industrie pharmaceutique mais aussi l'agriculture.

4.2. Cycle de développement

Les streptomycètes présentent un cycle de développement complexe qui comprend des processus programmés de mort cellulaire, ainsi que des phénomènes de différenciation conduisant à la sporulation (Manteca *et al.*, 2005, 2006). Leur cycle passe par quatre grandes étapes sur milieu solide que sont la germination des spores, le développement du mycélium végétatif puis du mycélium aérien et enfin la sporulation (figure 16). Le cycle de différenciation débute par la germination d'une spore. A partir de cette spore, un mycélium végétatif à croissance radiale va se développer (Miguélez *et al.*, 1999, 2000). Ce mycélium est constitué de filaments qui contiennent de nombreuses copies du génome. Quand le milieu devient limitant en ressources nutritives, le mycélium végétatif se différencie en mycélium aérien. En effet le mycélium végétatif s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien. Ce dernier est formé d'hyphes contenant plusieurs copies du génome de la bactérie. Ces hyphes se spiralisent puis forment des chaînes de spores uninuclées par séptation. Chaque spore contient une seule copie du génome de *Streptomyces*, ces spores sont des agents de dissémination. Les *Streptomycetaceae* se différencient des autres actinomycètes par le fait que le mycélium végétatif n'est pas à l'origine de la formation de spores (Waksman et Henrici, 1943).

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire qui se ramifient et s'agrègent pour former enfin les pellets, même si de très rares *Streptomyces* peuvent sporuler dans cet environnement. En milieu solide, une différenciation morphologique est donc observée (formation du mycélium aérien) tandis qu'en milieu liquide, la différenciation est généralement physiologique.

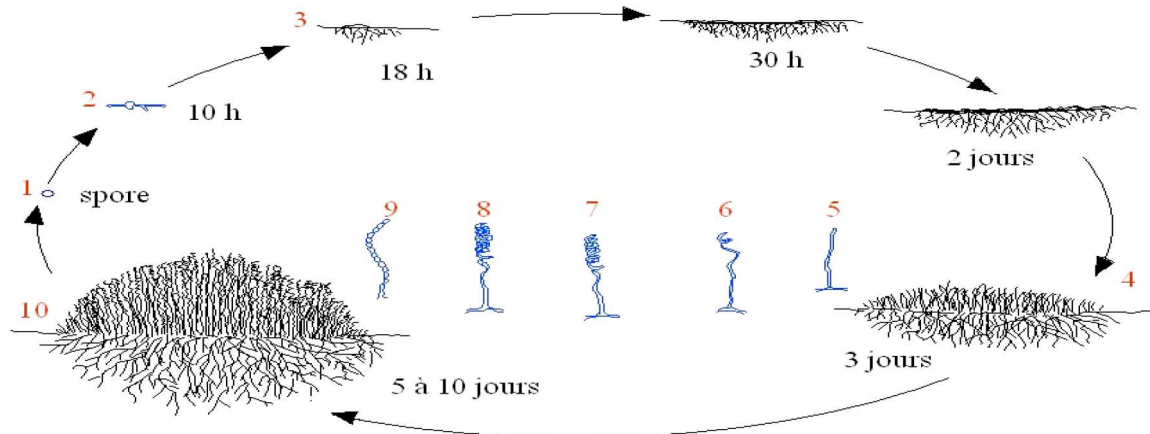


Figure 16 : Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Hopwood *et al.*, 1985)

4.3. Habitats et niches écologiques

Les streptomycètes sont des saprophytes ayant su coloniser un très large panel de niches écologiques toutes aussi variées les unes que les autres, grâce à leur mode de vie, de développement et de reproduction. Ainsi, des espèces ont été trouvées dans les habitats terrestres et aquatiques. Les données concernant leur répartition géographique ou plus spécifiquement leurs macro et micro-niches sont rares (Saintpierre, 2001). Ceci est dû au fait que les études écologiques appliquent principalement la technique de la plaque de dilution, qui ne permet pas de déterminer si les streptomycètes présents dans l'environnement sont présents sous forme de mycélium actif ou d'arthrospores endormies.

4.3.1. Environnement terrestre

Le sol contient 10^4 à 10^7 UFC de streptomycètes par gram, représentant 1-20% de la totalité de la flore bactérienne (Donadio *et al.*, 2002). De plus, le genre *Streptomyces* représente plus de 95% des actinomycètes isolés de la plupart des types de sols. Leur aptitude de coloniser le sol est très facilitée par le développement des hyphes végétatives et qui peuvent se différencier en spores qui se dispersent et assurent leur persistance.

Ils sont ubiquistes dans les sols bien drainés (limon sableux, sols recouvrant du calcaire). Le fourrage et le compost semblent être les principaux réservoirs de leur isolement.

Dans le bac à compost, riche en matière organique récalcitrante, 70% des souches isolées étaient des procaryotes, dominés par le genre *Streptomyces* (13%). Les champignons ne représentaient que 30% de tous les isolats (Ryckeboer *et al.*, 2003).

Les métabolites secondaires comme les antibiotiques rendent les streptomycètes très compétitifs dans la nature, en particulier dans les habitats pauvres en nutriments comme les déserts. Plusieurs rapports montrent la répartition des streptomycètes dans divers endroits, tels que les sols sableux, les sols alcalins noirs, les sols sableux-limoneux, sol à dessert alcalin, et sol à dessert subtropical, où *Streptomyces sp.* ont été dominants suivis par les autres organismes, tels que *Nocardia*, *Nocardiopsis* (Cundell et Piechoski, 2016).

De même, plusieurs bactéries de ce genre jouent un rôle majeur dans la communauté microbienne de la rhizosphère dans le renouvellement de la matière organique végétale récalcitrante, et c'est due à leur caractère d'antagonisme contre des autres bactéries comme *Pseudomonas* et *Bacillus* (Kieser *et al.*, 2000).

Les streptomycètes jouent un rôle majeur dans la dégradation de la matière organique et plus spécifiquement de composés assez complexes comme la lignine, l'amidon, la cellulose, la lignocellulose, la kératine, la chitine ou encore la pectine et d'autres composés aromatiques grâce à la production de nombreuses enzymes lytiques extra cellulaires comme par exemple les amylases, les xylanases, les lipases. C'est pourquoi ces bactéries sont extrêmement importantes dans le processus de compostage (Dworkin *et al.*, 2006 ; Loria *et al.*, 2003 ; Yikmis et Steinbüchel, 2012).

4.3.2. Environnement marin

Comme les Streptomycètes du sol, les Streptomycètes aquatiques constituent eux-mêmes un pourcentage assez important. Alan et Stach, (2007) estiment le nombre des actinomycètes à 35% de la flore bactérienne des larges zones des océans. L'espèce *S. thermogriseus* a par exemple été isolée à partir d'une source chaude (Xu *et al.*, 1998).

Les Streptomycètes marines constituent une très importante source de molécules bioactives, tel que les antibiotiques, les molécules bioactives à différents usages thérapeutiques mais de type différent, puisque les conditions de l'environnement marin sont différentes de celles de l'environnement terrestre (Solanki *et al.*, 2008 ; Das *et al.*, 2010 ; Bhatnagar et Kim, 2010).

Les Streptomycètes de l'environnement marin sont plus connues pour leur potentiel à produire les anticancéreux comme les: Borophycine, Daunorubicine et Gutingimycine

(Bhatnagar et Kim, 2010 ; Boopathy et Kathiresan, 2010). À part leur rôle comme producteurs d'antibiotiques, les *Streptomyces* de l'environnement marin participent vivement dans le recyclage et la biodégradation continue des différents matériaux (Das *et al.*, 2010).

4.4. Applications industrielles

Ces bactéries présentent un grand intérêt industriel, en possédant des structures chimiques et des activités biologiques très variées qui n'existent dans aucun autre genre bactérien. En effet, la différenciation morphologique des *Streptomyces* est accompagnée d'une différenciation métabolique. Leur métabolisme secondaire se met en place dans les étapes tardives de leur développement morphologique. Elles sont à l'origine de la grande majorité plus de 70% des antibiotiques utilisés en thérapie humaine et vétérinaire et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (Sujatha *et al.*, 2005). Cette diversité considérable de composés biologiquement actifs a pour conséquence la grande importance des *Streptomyces* dans l'industrie pharmaceutique puisque les molécules produites par fermentation sont la deuxième source de revenus de l'industrie biotechnologique après la brasserie (Thomson *et al.*, 2004).

L'espoir que ces bactéries soient à nouveau une source majeure de découverte de nouveaux composés utiles est apparu suite au séquençage des génomes de plusieurs *Streptomyces* (Ikeda *et al.*, 2003 ; Vera Ortseifen *et al.*, 2015). En effet, il a été démontré qu'il y'a une influence majeure des conditions de culture de la bactérie productrice sur la production des métabolites recherchés (Smaoui, 2010), en plus, l'analyse fonctionnelle des gènes a révélé que les prédispositions génétiques de ces microorganismes à produire des métabolites secondaires étaient très sous-estimées. Ces bactéries possèdent en réalité un grand nombre de métabolites cryptiques. Si on arrive à induire la production de ces métabolites, il serait possible d'obtenir plusieurs nouvelles molécules d'intérêts thérapeutique et industriel.

Dans cette partie bibliographique, nous nous pencherons sur quelques applications des streptomycètes.

4.4.1. Les Enzymes

Il existe une réelle demande au niveau industriel pour des enzymes d'origine microbienne afin d'améliorer certains procédés de fabrication. Les domaines d'application enzymatiques sont très divers: industrie textile, papeterie, dépollution (attaque des substances phénoliques), et industrie alimentaire (Ait Barka *et al.*, 2015). La plupart des enzymes industrielles sont des hydrolases, principalement utilisées dans la fabrication de détergents (37%), d'aliments et de boissons (19%), de textiles (12%) et d'aliments pour animaux (6%).

Ils sont principalement produits à grande échelle par *Streptomyces* spp. en raison du métabolisme et du système de sécrétion bien développé de ce groupe d'organismes. En effet, l'analyse des séquences des gènes du génome entier de *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002) a révélé que 7,8% (614 protéines) et 10,5% (819 protéines) respectivement, étaient des transporteurs et des protéines putatives sécrétées (Weber *et al.*, 2003).

En outre, les hydrolases d'importance industrielle produites par les streptomycètes comprennent les protéases (Aretz *et al.*, 1989), les lipases (Vujaklija *et al.*, 2002), les phosphatases (Labeda *et al.*, 1997), les xyloses isomérases (Bandlish *et al.*, 2002), les xylanases (Kansoh et Nagieb, 2004), et les alpha amylases, qui sont d'une grande importance dans les applications biotechnologiques en raison de leur capacité à dégrader l'amidon (Pandey *et al.*, 2000) (tableau 2). Ils sont utilisés pour la dégradation des protéines (textile), l'élimination des graisses (détergents), l'hydrolyse de l'amidon en glucose (boissons gazeuses, production de bière, cuisson, détergents), libération de phosphate (alimentation animale), conversion du glucose en fructose (boissons gazeuses) et dégradation des polysaccharides - bioblanchiment (alimentation animale, textile, industrie papeterie).

Le criblage de nouveaux isolats ou l'ingénierie des protéines a permis la sélection de protéines améliorées possédant une thermostabilité plus élevée (Kristijansson, 1989), une alcalitolerance (Horikoshi, 1999), et un pH plus élevé ou une meilleure spécificité de substrat.

Tableau 2: *Streptomyces* spp. en tant que producteurs d' α -amylases et leurs applications industrielles (Lanoot, 2004).

Enzyme	Utilisation	<i>Streptomyces</i>	Références
α -amylases	Production de glucose et de maltose (industrie alimentaire)	<i>Streptomyces</i> . sp <i>S. megasporus</i> SO 12 <i>S. lividans</i> <i>S. griseus</i> <i>S. rimosus</i> <i>S. limosus</i> <i>S. venezulae</i> <i>S. hygrosopicus</i> <i>S. yunnanensis</i> <i>S. scopiformis</i> <i>S. thermogriseus</i>	Ammar <i>et al.</i> , 2002 Dey et Agarwal, 1999 Nguyen <i>et al.</i> , 1997 Vigal <i>et al.</i> , 1994 Vukelic <i>et al.</i> , 1992 Virolle et Bibb, 1988 Virolle <i>et al.</i> , 1988 Hoshiko <i>et al.</i> , 1987 Zhang <i>et al.</i> , 2003 Li <i>et al.</i> , 2002 Xu <i>et al.</i> , 1998

4.4.2. Les Antimicrobiens

Les streptomycètes produisent des métabolites secondaires lorsqu'ils manquent de nutriments pour la croissance, c'est-à-dire pendant l'idiophase. Près de 80% des antibiotiques du monde sont connus pour être dérivés principalement des genres *Streptomyces* et *Micromonospora* (Jensen *et al.*, 1991 ; Hassan *et al.*, 2011), en particulier, les espèces de *Streptomyces* qui produisent environ 7600 composés, dont beaucoup sont des métabolites secondaires qui sont des antibiotiques puissants, qui ont fait des streptomycètes les principaux organismes producteurs d'antibiotiques exploités par l'industrie pharmaceutique (Watve *et al.*, 2001). Les antibiotiques produits par les Streptomycètes sont: les macrolides, les tétracyclines, les streptogramines, les aminoglycosides, et les β -lactames (Jensen *et al.*, 2007 ; Ramesh et Mathivanan, 2009). La raison derrière la capacité du genre *Streptomyces* à produire des composés commercialement significatifs reste suprême en raison de l'ADN génomique extra large de ces bactéries (Kurtboke, 2012).

Outre le domaine des antibiotiques, une multitude d'autres composés naturels sont produits par les streptomycètes (Weber *et al.*, 2003), tel que les immunosuppresseurs, les anticancéreux (Olano *et al.*, 2009), les antidiabétiques (Kulkarni-Almeida, 2011), les antiviraux (Ara *et al.*, 2012), les antifongiques (Oskay, 2009), les herbicides (Dhanasekaran *et al.*, 2010), les insecticides (Deshpande *et al.*, 1988), les antiparasitaires (Pimentel-Elardo *et al.*, 2010).

4.4.3. La Bioremédiation

Les sols contaminés par des niveaux élevés de métaux lourds peuvent affecter la structure qualitative et quantitative des communautés microbiennes, entraînant une diminution de l'activité métabolique et de la biomasse ainsi qu'une diminution de la diversité (Kozdroj et VanElsas, 2001). Une grande attention est maintenant accordée à la remédiation microbienne de quelques sites contaminés (Diels *et al.*, 1999) nécessitant une connaissance détaillée des bactéries résistantes aux composés métalliques et chimiques (Mengoni *et al.*, 2001; Ambujom, 2001).

Les actinobactéries possèdent de nombreuses propriétés qui en font de bons candidats pour l'application dans la biorestauration de sols contaminés par des polluants organiques. Dans certains sites contaminés, le genre *Streptomyces* représente le groupe dominant parmi les dégradeurs (Lallai et Mura, 2004 ; Goris *et al.*, 2004). Ils jouent un rôle important dans le recyclage du carbone organique et sont capables de dégrader les complexes de polymères.

4.4.4. Humification et biodégradation

Les feuilles et les tiges des plantes sont constituées des composants structuraux importants que sont la cellulose, la lignine, la pectine et la chitine. Afin de raccourcir le cycle des nutriments dans la nature, la transformation et la dégradation de ces molécules en composants réutilisables pour l'écosystème sont nécessaires. Outre les streptomycètes, un nombre limité d'autres bactéries aérobies (*Cytophaga*), anaérobies (*Clostridium*) et les champignons y jouent un rôle majeur (Johansen *et al.*, 2002 ; Wirth et Ulrich, 2002).

4.4.5. Bioconversion de composés chimiques

Les produits naturels peuvent nécessiter une manipulation chimique pour être efficaces ou pour améliorer leur fonction avant leur application médicale. Cela implique parfois des méthodes chimiques coûteuses employant des solvants organiques non compatibles avec l'environnement. D'un point de vue écologique et environnemental, le remplacement de ces procédés chimiques par fermentations biologiques ou bioconversions enzymatiques seraient souhaitables, car une spécificité plus élevée et des conditions d'opération plus douces sont obtenues en utilisant des enzymes. Cela implique une connaissance approfondie des voies de conversion. Une telle stratégie a été élaborée avec succès pour la production de la céphalosporine semi-synthétique et de la pravastatine en utilisant la machinerie enzymatique de *Streptomyces* spp. (Thykaer et Nielsen, 2003).

4.5. Le génome des *Streptomyces*

Les *Streptomyces* présentent des caractéristiques génomiques originales au sein des bactéries. En effet, chaque génome caractérisé se compose d'un chromosome linéaire (Dworkin *et al.*, 2006) de grande taille entre 7 et 10 Mb (8,7 Mb pour *S. coelicolor*, 9,1 Mb pour *S. avermitilis*), il est considéré comme le plus large chromosome dans le monde bactérien, avec un pourcentage très élevé en bases G+C (69% à 78%) selon la nature des gènes et des espèces (Medema *et al.*, 2010). De nombreuses espèces possèdent en plus des plasmides linéaires et/ou circulaires.

La complexité de sa niche écologique a conduit à la sélection de voies métaboliques complexes, ce qui pourrait également expliquer la taille importante de son chromosome. Ce métabolisme complexe se traduit notamment par la production d'un très grand nombre de métabolites bioactifs d'intérêt industriel.

La structure chromosomique est caractérisée par la présence de séquences terminales inversées, appelées TIR (Terminal Inverted Repeats). Elles ont une taille qui varie considérablement de 25kb à 550kb suivant les espèces. Les TIR sont associés de manière covalente à des protéines permettant, entre autre, la protection des extrémités chromosomiques de l'action d'exonucléases (Chen, 1996). Enfin, Les *Streptomyces* sont les rares bactéries ayant un chromosome linéaire avec une origine de réplication *oriC* située approximativement au centre du chromosome et fonctionnant de manière bidirectionnelle, définit les deux bras chromosomiques (Fischer *et al.*, 1998).

La région centrale chromosomique, nommée région «core», contiendrait la quasi-totalité des gènes dits «essentiels» au développement végétatif de *streptomyces* (intervenant dans la division cellulaire, la réplication, la transcription et la traduction) (Zhou *et al.*, 2011). Les régions, contenant les gènes probablement non essentiels à la croissance végétative, comme les gènes du métabolisme secondaire, ont été définies comme régions de contingence. Ces régions correspondent aux régions terminales (Les bras chromosomiques) (figure 17).

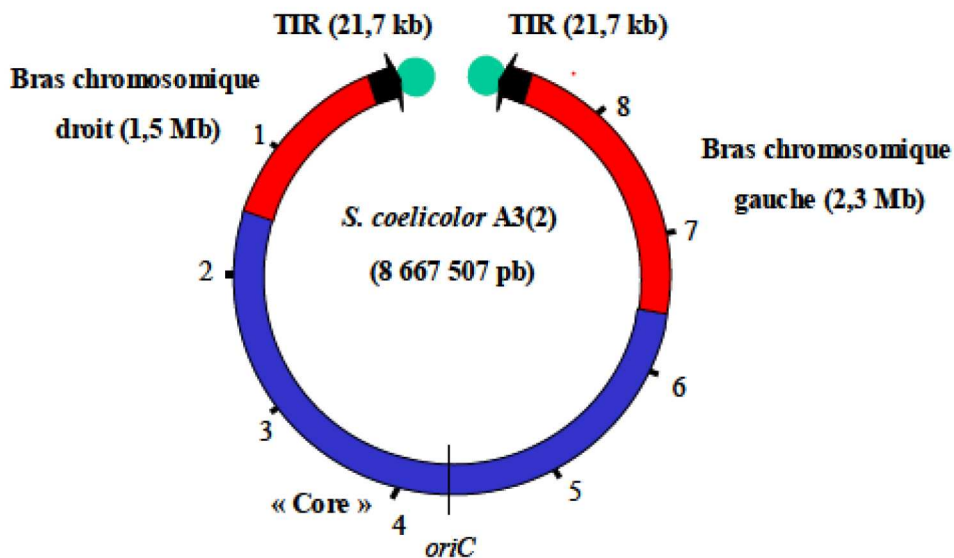


Figure 17: Structure du Génome circulaire de *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002)

MATERIEL ET METHODES

1. Souches utilisées

Quatorze souches actinomycétales, ont été testées pour la production de l' α -amylase. Ces souches ont été identifiées par le Pr. Kitouni (Kitouni *et al.*, 2005).

Les souches d'actinomycètes choisies pour la réalisation de cette étude ont été isolées à partir d'un échantillon provenant d'eau, de sol et d'écorces d'arbres sur deux sites (Les marais salants d'Ain Mlila (Ezemoul) et Djebel El Ouahch, Constantine) localisés dans le nord-est de l'Algérie.

Les souches bactériennes sont cultivées sur milieu gélosé ISP2 (Annexe n°02). Ce milieu est préconisé par Shirling et Gottlieb, (1966) pour la croissance et la sporulation des actinomycètes.

2. Conservation des souches actinomycétales

Les souches sont ensemencées sur le milieu de Bennett (Annexe n°02). Après 5 jours d'incubation à 30°C, le stock de culture est maintenu à 4°C en tube sur gélose inclinée, et à -20°C en suspension de spores dans le milieu de Bennett liquide additionné de glycérol comme agent cryoprotecteur à 50% (v/v).

3. Sélection de la meilleure souche productrice d' α -amylase

3.1. Préparation de l'inoculum

Les spores des cultures de 5 jours ont été récoltées des boîtes de pétri par l'ajout de 10 mL d'eau distillée. Les spores ont été délogées à l'aide d'une anse de platine sous conditions aseptique. des dilutions de toutes les suspensions de spores ont été effectuées jusqu'à l'obtention d'une solution mère d'une DO_{600} de 0,68 de chaque souche (Solis-pereira *et al.*, 1993).

3.2. Recherche de l'activité amylosique

Pour sélectionner la souche la plus productrice d' α -amylase, les colonies de toutes les souches actinomycètes (quatorze) ont été ensemencées par trois techniques (technique des puits, des spots et des stries) sur un milieu gélosé à base d'amidon (0,2%) contenant ($g.L^{-1}$): extrait de viande 3, peptone 10, amidon soluble 2, agar 15, pH 7,2. Les souches productrices d'amylase ont été identifiées, après une période d'incubation de 3 jours à 30 °C, en ajoutant une solution de lugol 0,1% (Annexe n°02) et en observant une zone d'hydrolyse entourant la culture (Tatsinkou *et al.*, 2005). Le diamètre des zones de lyse, est pris en considération pour la sélection de la souche amylosique la plus performante. Les essais sont effectués en deux répliques.

Remarque : si les zones d'hydrolyses sont d'une couleur claire, il s'agit d'une β -amylase, si par contre les zones sont de couleur rouge-brune, l'enzyme est une α -amylase (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990).

3.2.1. Technique des puits

Des puits de 4 mm de diamètres creusés dans des boîtes de pétri contenant la gélose nutritive additionné de 0,2 % d'amidon reçoivent 30 μ l d'inoculum des souches. Les boîtes sont incubées pendant 3 jours à 30 °C (Merouane, 2016).

3.2.2. Technique des spots

1 μ l d'inoculum des souches actinomycétales d'une DO_{600} de 0,68 sont déposés en spots sur la surface du milieu GN additionnée de 0,2% d'amidon. Les boîtes de pétri sont incubées à 30 °C pendant 3 jours, pour permettre une diffusion des enzymes amylolytiques dans le milieu de culture. Les diamètres des zones de lyse sont mesurés et notés.

3.2.3. Technique des stries

Toutes les souches d'actinobactéries sont ensemencées à la surface du milieu GN additionné de 0,2% d'amidon en grandes stries espacées sur toute la boîte de pétri, elles sont ensuite incubées pendant 3 jours à 30 °C.

La souche (20r) est la souche performante ayant répondu le plus positivement aux tests d'activité amylolytique, en plus de sa grande capacité de croissance et de sporulation. Cette dernière, a fait l'objet d'investigations plus poussées. La souche *Streptomyces* sp. (20r) a été isolée à partir d'un échantillon provenant d'un milieu extrême (les eaux des marais salants d'Ain Mlila, Algérie). La séquence de son gène ADN_r 16S a été déterminée et soumise à GenBank sous le numéro d'accèsion KP314280.

4. Criblage de gènes d'alpha amylase

4.1. Extraction d'ADN génomique de la souche *Streptomyces* sp. (20r)

La plupart des méthodes utilisées pour isoler l'ADN génomique des actinomycètes font face à de nombreux problèmes, tels que le faible rendement en ADN et les contaminants de polysaccharides élevés. Le faible rendement est dû à une lyse incomplète, en raison de la tendance des actinomycètes à se développer sous forme de masses compactes ou de pellets de mycélium (Hopwood *et al.*, 1985). Dans la présente étude, l'azote liquide a été utilisé pour briser les pellets de mycélium augmentant ainsi la surface, de sorte que le lysozyme dissout correctement la paroi cellulaire. Les protoplastes résultants ont été donc facilement lysés.

L'extraction d'ADN génomique de la souche *Streptomyces* sp (20r) à partir d'une culture liquide sur le milieu ISP2 (50 mL) pendant 48 h à 180 rpm à 30°C a été réalisée par deux méthodes :

1- Par le Kit GenElute Bacterial Genomic DNA Kit Protocol (Sigma-Aldrich) selon les recommandations du fournisseur (Annexe n°03).

2- Selon la méthode modifiée de Vijay *et al.*, (2010). Après centrifugation à 10600 g pendant 10 min, le surnagent est écarté. 0,5 g de mycélium est transféré dans un creuset en porcelaine puis écrasé dans l'azote liquide à l'aide de pilons stériles. Le mycélium broyé est transféré dans un tube Eppendorf contenant 500 µl de tampon TE (Annexe n°11), additionné de 20 mg/ml de lysozyme puis incubé à 37°C pendant 30 min. Vingt microlitres (20µL) d' SDS à 10% (p/v) et 20µl de protéinase K sont alors additionnés, la suspension est incubée de nouveau à 55°C pendant 3-4 heures. En fin le tube est conservé à -20°C pendant toute la nuit.

L'ADN est extrait avec un volume égal de 540 µl de phénol/chloroforme (v/v). La solution est ensuite agitée à 70 rpm pendant 15 min. Après une centrifugation à 10600 g pendant 5 min, la phase aqueuse est transférée dans un autre tube. L'ADN est précipité par l'ajout de 600 µl d'éthanol à 70% puis laissé pendant 30 min à -20°C. Une centrifugation de 12800 g pendant 10 min permet de précipiter l'ADN. Le culot est ensuite séché puis réhydraté dans 500 µL de tampon TE. Afin d'éliminer l'ARN, 25 µl de RNase (20µg/ml) sont ajoutés. Le tout est incubé à 37°C pendant 1 heure. Une deuxième extraction de l'ADN est alors réalisée avec un volume égal de phénol/chloroforme comme précédemment. L'ADN est ensuite resuspendu dans 100 µl de tampon TE. La quantité d'ADN est mesurée par la lecture de l'absorbance à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre Nano Drop. L'échantillon de notre ADN est alors stocké à -20°C jusqu'à son utilisation.

4.2. Séquençage du génome de *Streptomyces* sp. (20r)

Le séquençage haut débit du génome de *Streptomyces* sp. (20r) a été effectué grâce à la technologie Illumina HiSeq 2000 (2×100pb) de la plate-forme Get Génome et Transcriptome du Génomoul de Toulouse, France. Le principe de ce séquençage peut être simplifié en 6 étapes :

- ✓ Préparation de la librairie (des banques d'ADN).
- ✓ Fixation de la matrice sur la « flow-cell » (cellule).
- ✓ Amplification en pont.
- ✓ Séquençage.
- ✓ Acquisition et analyse de l'image (base calling).
- ✓ Analyse des données générées.

Tout commence par la fragmentation aléatoire des ADNs génomiques, par nébulisation et sonication en morceaux de 200 pb, puis des adaptateurs, sont liés à chaque extrémité des fragments. Ces fragments sont ensuite attachés aléatoirement à la surface d'un support solide appelé « flow-cell ». C'est sur cette cellule que les matrices seront multipliées par un système d'amplification en pont. Pour cela des ADNs simple brin vont dans un premier temps être attachés à la surface de la flow-cell grâce aux adaptateurs situés à leurs extrémités. La première étape d'amplification va permettre la création de ponts doubles brins puis, après dénaturation, une nouvelle étape d'amplification pourra être initiée pour obtenir à nouveau des ADNs simple brin. Cette étape d'amplification aboutit à l'obtention d'un cluster, ou groupe d'ADNs clonaux autour de l'ADN initialement fixé à la cellule. Une fois l'étape d'amplification achevée vient la phase de séquençage. Pour cela les ADNs sont dénaturés et l'extrémité 3' est bloquée afin d'empêcher toute nouvelle formation de pont. Des amorces sont hybridées sur la matrice et des nucléotides marqués sont ajoutés avec la polymérase. Les nucléotides possèdent également un terminateur réversible bloquant la synthèse après leur incorporation. Ce nucléotide incorporé est excité par un laser permettant l'émission de la fluorescence de celui-ci. L'acquisition de la couleur est faite en temps réel à chaque cycle pour chaque assimilation de nucléotide. Chacun des nucléotides (A/T/G/C) est en effet porteur d'une couleur différente permettant l'analyse de l'image acquise. La séquence est déduite par différenciation de la couleur des fluorochromes, ce qui est appelé « base calling ». Une fois l'acquisition finie, le terminateur est clivé ce qui permet l'ajout d'un nouveau nucléotide qui bloque à son tour la synthèse. Ces cycles de séquençage sont répétés et permettent de déterminer la séquence des fragments. Une fois le séquençage des groupes de séquences (cluster) terminé, les données sont analysées en passant dans un premier temps par une série de filtres servant à vérifier la qualité des séquences et éliminer celles qui ne correspondent pas à l'attente minimum fixée par le constructeur. Les séquences seront alors alignées avec une stringence plus ou moins importante, suivant les attentes des utilisateurs.

4.3. Traitement bioinformatique des séquences

Les différents scripts informatiques nécessaires au traitement des séquences ont été développés grâce à la plate-forme Bioinformatique du Genotoul Bioinfo (Toulouse, France). L'assemblage des reads (lecture) en contig a été effectué afin d'obtenir une séquence unique contenant plus de 98% de la séquence totale du génome.

4.4. Blast et alignements des séquences

Pour recenser l'ensemble des α -amylases caractérisées, nous avons utilisé la base de données CAZY, qui répertorie la famille des GH13. C'est à partir de cette dernière que nous

avons sélectionné deux séquences protéiques d' α -amylase de taille connue de *Streptomyces*. Une α -amylase de *Streptomyces lividans* composée de 993 acides aminés et une autre de *Streptomyces griseus* de taille 566 acides aminés. Les séquences obtenues sont par la suite comparées avec celles de la banque de données du site du NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) grâce au programme BLAST (Altschul *et al.*, 1990) afin d'identifier les séquences les plus proches. L'alignement multiple des séquences homologues est alors effectué en utilisant le logiciel Clustal omega (Sievers *et al.*, 2011). L'analyse de cet alignement est enfin réalisée par le programme ESPript 3.0 (Gouet *et al.*, 2003).

Afin de déterminer les orthologues putatifs (Nodes) des gènes et les familles d' α -amylases de la souche *Streptomyces* sp. 20r une analyse *in silico* est effectuée. Quatre séquences protéiques d' α -amylases de taille différentes préalablement choisi lors de l'alignement précédent (507aa/566aa/914aa/989aa) (Annexe n°04), appartenant à *S. lividans*, *S. albus*, *S. lividans TK24* et *S. griseorubens* respectivement sont utilisées comme sonde. Pour cela nous avons fait un Translated BLAST (tblastn) de l'assemblage génomique contre les séquences protéiques d' α -amylases.

Un Blast protéique de l'assemblage génomique contre la pdb (Protein Data Bank) a été effectué. Le but de ce Blast est de sélectionner les séquences protéiques homologues à notre assemblage dans la pdb. Suivie d'un alignement de ces séquences par Clustal omega et ESPript 3.0.

4.5. Annotation structurale et fonctionnelle des séquences

L'annotation d'un génome consiste à analyser la séquence nucléotidique qui constitue l'information brute pour en extraire l'information biologique. Cette analyse a deux objectifs. Le premier est de localiser les gènes et les régions codantes. Le second est d'identifier ou de prédire la fonction biologique des gènes localisés.

L'annotation structurale consiste à définir la position précise des gènes, ainsi que leur cadre de lecture. Ceci est réalisé en recherchant les ORFs de la séquence génomique.

L'annotation fonctionnelle est une prédiction bioinformatique, car pour prédire la fonction potentielle de ces gènes, on utilise des programmes de recherche d'homologie de séquence. Lorsque le produit d'un gène prédit à des ressemblances avec une protéine connue, on en déduit en général une homologie probable de fonction. On peut également identifier dans la séquence protéique prédite des motifs d'acides aminés caractéristiques de certaines

classes de protéines ce qui peut permettre d'attribuer une fonction probable au gène correspondant.

La prédiction de la position des ORFs des Nodes ou contigs de notre assemblage génomique a été effectuée grâce au logiciel Clone Manager Professional 9.2, suivie d'une annotation fonctionnelle afin de prédire la fonction des ORFs en tant que GH et plus précisément des amylases à l'aide de Blastp contre la pdb.

Les contigs et les ORFs obtenus ont été analysés par alignements (Blastp) de séquences contre les banques nr (non-redundant protein sequences) (Altschul *et al.*, 1990), pour pouvoir déterminer les domaines conservés des séquences amylolytiques.

La présence d'un peptide signal (PS) a été prédite à l'aide du serveur SignalP 4.1 Server, La séquence du PS est enlevée de celle des ORFs de nos nodes, puisque généralement celui de *Streptomyces* sp. qui se localise en N-terminal des amylases exocellulaires n'est pas compatible avec celui d'*E. coli*. Les peptides signaux sont nécessaires lorsque les protéines sont sécrétées à travers la membrane. La longueur et la composition en acides aminés des peptides signaux pourraient affecter la production de protéines recombinantes (Lammertyn *et al.*, 1998 ; Morosoli et Dupont, 1999).

4.6. Construction d'amorces pour l'amplification des gènes d'alpha-amylases

Une construction d'amorces a été réalisée pour l'amplification par PCR des deux ORFs ou orthologues putatifs (Nodes) (65/67) de la souche *Streptomyces* sp. (20r). Ces derniers codent pour deux α - amylases de taille différentes. Ils sont sélectionnés pour la suite des travaux. Afin de réaliser le clonage, des sites de restriction des enzymes NdeI en 5' et SpeI en 3' déterminés grâce au logiciel Bioedit sont ajoutés aux amorces des séquences des nodes 65 et 67 (tableau 3).

Tableau 3 : les séquences des amorces d'amplification des gènes d' α -amylases

Amorces	Positions	Tm°	Séquences 5' =>3'
NODE65ORF3F (P81)	5' Position 1	86.8	GATATACATATGTC ^R CCCCGCGCACCGCCCCCGT ^F CG
NODE65ORF3R (P82)	3' Position 2880	77.3	AATTC ^R ACTAGTCTACTT ^F GAGGTACGGTCCGGCGG
NODE67ORF28F (P83)	5' Position 1	81.1	GATATACATATGGC ^R ACCGCCCGGTGAGAAGGACG
NODE67ORF28R (P84)	3' Position 1611	79.0	AATTC ^R ACTAGTTCAGCTGCGGAACGTGTCGTTCA

Les séquences sur fond gris correspondent aux sites de restrictions NdeI et SpeI ; **R**: reverses ; **F**:forwards.

4.7. Optimisation des conditions de PCR

4.7.1. Principe

Le principe de la PCR consiste à amplifier grâce à des couples d'amorces spécifiques sens et antisens, de manière exponentielle, une séquence d'ADN particulière située sur un ADN d'intérêt en utilisant une ADN polymérase. La PCR se déroule en plusieurs cycles successifs de température au cours desquels la quantité d'ADN cible est doublée à chaque cycle.

Dans notre étude, nous avons réalisé une optimisation de la PCR, car on n'obtient pas forcément les tailles moléculaires attendu ou des fois on obtient plusieurs bandes qui apparaissent ou des smears, pour cela la stringence des conditions de PCR doit être modifiée. Plusieurs programmes PCR ont été testés (tableau 4).

4.7.2. Révélation des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

Afin de s'assurer de la qualité et de la spécificité de la PCR une révélation des produits de PCR est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans le tampon TBE. Les échantillons d'ADN (6 μ L) sont mélangés avec un tampon de charge (1,5 μ L de DNA loading dye \times 6) avant qu'ils soient déposés dans les puits. 5 μ L de marqueur de taille sont déposés dans un puits, ce dernier sert de référence pour estimer la taille de nos échantillons d'ADN. La migration s'effectue à 200V pendant 20 min. La révélation des bandes d'ADN se fait sous U.V par le logiciel Gel Smart à l'aide d'une solution de révélation (Gel red annexe n°05) pendant 15 min et sous agitation.

Tableau 4 : Optimisation des conditions de PCR des α -amylases

PCR	Mix	Volume	Programme		Nombre de cycles
PCR1 Nodes 65/67	H ₂ O	14 μ L	Dénaturation	95 °C => 30 'S	30 Cycles
	Buffer Taq Dream	5 μ L			
	dntp	0,5 μ L	Hybridation	55-56-57 °C => 1min	
	Primers [5 μ M]	2,5 μ L(R) +2,5 μ L(F)			
	Taq Dream (ThermoScientific)	0,25 μ L	Elongation	72 °C => 1min 45'S	
	ADN génomique	0,5 μ L	Elongation finale	72°C => 5min	
PCR2 Nodes 65/67	H ₂ O +DMSO (5%)	14 μ L+ 1 μ L	Dénaturation	95 °C => 30 'S	30 Cycles
	Buffer Taq Dream	5 μ L			
	dntp	0,5 μ L	Hybridation	57 °C => 1min	
	Primers [5 μ M]	2,5 μ L(R) +2,5 μ L(F)			
	Taq Dream (ThermoScientific)	0,25 μ L	Elongation	72 °C => 1min 45'S	
	ADN génomique	0,5 μ L	Elongation finale	72°C => 5min	
PCR3 Nodes 65/67	H ₂ O +DMSO (5%)	14 μ L+ 1,33 μ L	Dénaturation	95 °C => 30 'S	30 Cycles
	Buffer Taq Dream	5 μ L			
	dntp	0,5 μ L	Hybridation	57 °C => 1min	
	Primers [5 μ M]	2,5 μ L(R) +2,5 μ L(F)			
	Taq Dream (ThermoScientific)	0,25 μ L	Elongation	72 °C => 1min 45'S	
	ADN génomique (1/10) ; (1/50)	2 μ L	Elongation finale	72°C => 5min	

Tableau 4 : Optimisation des conditions de PCR des α -amylases (suite)

PCR	Mix	Volume	Programme	Node 65	Node 67	Nombre de cycles
PCR4 Nodes 65/67	H ₂ O + DMSO (5%)	14 μ L + 1,33 μ L	Dénaturation Initiale	95 °C => 5 min	95 °C => 5 min	30 Cycles
	Buffer Taq Dream	5 μ L				
	Dntp	0,5 μ L	Dénaturation	95 °C => 2 min	95 °C => 2 min	
	Primers [5 μ M]	2,5 μ L(R) + 2,5 μ L(F)	Hybridation	57 °C => 1 min	57 °C => 1 min	
	Taq Dream	0,5 μ L	Elongation	72 °C => 2min 50'S	72 °C => 1min 45'S	
	ADN génomique (1/10) ; (1/50)	2 μ L	Elongation finale	72 °C => 5 min	72 °C => 5 min	
PCR5 Nodes 65/67	H ₂ O	10 μ L	Dénaturation Hybridation Elongation	Node 65	Node 67	30 Cycles
	Primers [0,3 μ M]	1 μ L(R) + 1 μ L(F)		98 °C => 10 'S	98 °C => 10 'S	
	Premix de la prime Star Max (Takara)	12,5 μ L		68 °C => 3min 20'S	68 °C => 2 min	
	ADN génomique (1/10)	1 μ L				
PCR6 Nodes 65/67	H ₂ O	10 μ L	Dénaturation Hybridation Elongation	PCR a trois étapes	PCR a deux étapes	30 Cycles
	Primers [0,3 μ M]	1,5 μ L(R) + 1,5 μ L(F)		98 °C => 10 'S	98 °C => 10 'S	
	Premix de la prime Star Max (Takara)	12,5 μ L		60 °C => 15 'S	-	
	ADN génomique (1/10)	1,5 μ L		68 °C => 2min 30'S/kb	68°C => 2min 30'S/kb	

Tableau 4 : Optimisation des conditions de PCR des α -amylases (suite)

PCR	Mix	Volume	Programme	PCR a trois étapes	PCR a deux étapes	Nombre de cycles
PCR7 Nodes 65/67	H ₂ O	9 μ L	Dénaturation	98 °C => 10 'S	98 °C => 10 'S	32 Cycles
	DMSO (2%)	0,5 μ L				
	Primers [0,3 μ M]	1 μ L(R) + 1 μ L(F)	Hybridation	55-60-65-70 °C => 15 'S		
	Premix clone Amp (Clontech)	12.5 μ L	Elongation			
	ADN génomique (1/10)	1 μ L			72°C => 1min	
PCR8 Nodes 65/67	H ₂ O +DMSO (3%)	11 μ L+ 0,6 μ L	Dénaturation initiale	95 °C => 2 min	30 Cycles	
	Phusion Buffer	4 μ L	Dénaturation	95 °C => 30 'S		
	dntp	0,4 μ L	Hybridation	55 °C => 30 'S		
	Primers [5 μ M]	1 μ L(R) +1 μ L(F)				
	la Phusion high-fidelity (Thermo-scientific)	1 μ L	Elongation	72 °C => 2 min		
	ADN génomique (1/10) ; (1/100)	1 μ L	Elongation finale	72°C => 5min		
PCR9 Nodes 65	H ₂ O	29 μ L	Dénaturation	98 °C => 10'S	30 Cycles	
	Tp 3 \times prime star Buffer	10 μ L				
	dntp	4 μ L	Hybridation	68 °C => 2 min		
	Primers [5 μ M]	2,5 μ L(R) + 2,5 μ L(F)				
	la prime Star GXL (Takara)	1 μ L	Elongation			
	ADN génomique (1/10) et non dilué	1 μ L				

4.7.3. Purification des produits PCR sur gel

La purification des produits PCR sur gel est conçue pour un nettoyage rapide des fragments d'ADN. Elle est réalisée à l'aide de GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo Scientific selon les recommandations du fournisseur (Annexe n°06).

4.7.4. Purification des produits PCR

Vu que la purification des produits PCR sur gel n'a pas donné un bon taux d'ADN pour la suite de l'étude, on a refait une autre purification directement sur les produits PCR, qui est réalisée à l'aide de GeneJET PCR Purification Kit, Thermo Scientific selon les recommandations du fournisseur (Annexe n°07).

5. Clonage des ORFs codant les alpha-amylases

Dans le cas d'un clonage par PCR, il faut introduire au niveau des extrémités de la séquence d'intérêt et du vecteur des sites de restriction adaptés à chacun d'entre eux pour permettre le clonage des inserts dans le vecteur d'expression. En ce qui nous concerne les sites de restriction (tableau 5) des enzymes (NdeI et NheI) et (NdeI et SpeI) sont introduits aux extrémités des séquences du vecteur pET28a(+) et des produits de PCR (Node 67/65) respectivement.

5.1. Construction de plasmides recombinants

Dans notre étude nous avons utilisé le vecteur pET28a(+) (figure 18). C'est un plasmide bactérien qui permet l'expression de fragments PCR avec le promoteur T7lac. Il porte une séquence codant une étiquette hexahistidines en N-terminal de la protéine. Il contient le gène de résistance à la kanamycine ce qui permet la sélection directe des plasmides recombinants lors du clonage.

Le vecteur d'expression (Plasmide pET28a(+)) et les produits PCR (Node 67/65) à cloner sont mis en présence des enzymes de restriction (NdeI ; NheI) et (NdeI ; SpeI) respectivement, afin d'obtenir les extrémités cohésives, dans le tampon adéquat (tableau 6), puis incubés 1-2 h à 37°C.

Les produits de digestion sont alors purifiés sur colonne. 250 µL de tampon de liaison sont ajoutés aux produits de digestion enzymatique ce qui induit un changement de pH et une diminution de concentration en sel qui permet une fixation de l'ADN sur la membrane de la colonne. Une centrifugation de 10.600 g pendant 30'S est alors réalisée. Les fragments libérés lors de la digestion < 100pb ne vont pas être adsorbés sur la colonne. 50 µL de tampon d'élution sont ensuite ajoutés puis incubé à 56 °C pendant 10min, puis 700 µL de tampon de lavage sont ajoutés puis centrifugés a 10.600 g pendant 30'S. Une deuxième centrifugation est

alors effectuée à 16.600 g pendant 1 min. La colonne est incubée à 56 °C pendant 5 min. Enfin 30 µL de tampon d'éluion sont ajoutés puis incubé à 56 °C pendant 5 min et la colonne est centrifugée à 16.600 g pendant 1min.

La ligation est ensuite réalisée dans un très petit volume (20 µL) pendant 10-15 min à température ambiante, de façon à faciliter le rapprochement des extrémités cohésives de l'insert et du vecteur sous l'action de la T4-ADN ligase. Généralement, le ratio (vecteur : insert) est de (1:3) (tableau7).

Les tailles totales des vecteurs attendues recombinaés avec les inserts 65 et 67 sont de 8294 pb et 6980 pb respectivement.

Tableau 5 : Les sites de reconnaissance des enzymes de restriction utilisées

NdeI:	5'.... C A ↓ T A T G.... 3'
	3'.... G T A T ↑ A C.... 5'
SpeI:	5'.... A ↓ C T A G T.... 3'
	3'.... T G A T C ↑ A.... 5'
NheI:	5'.... G ↓ C T A G C.... 3'
	3'.... C G A T C ↑ G.... 5'

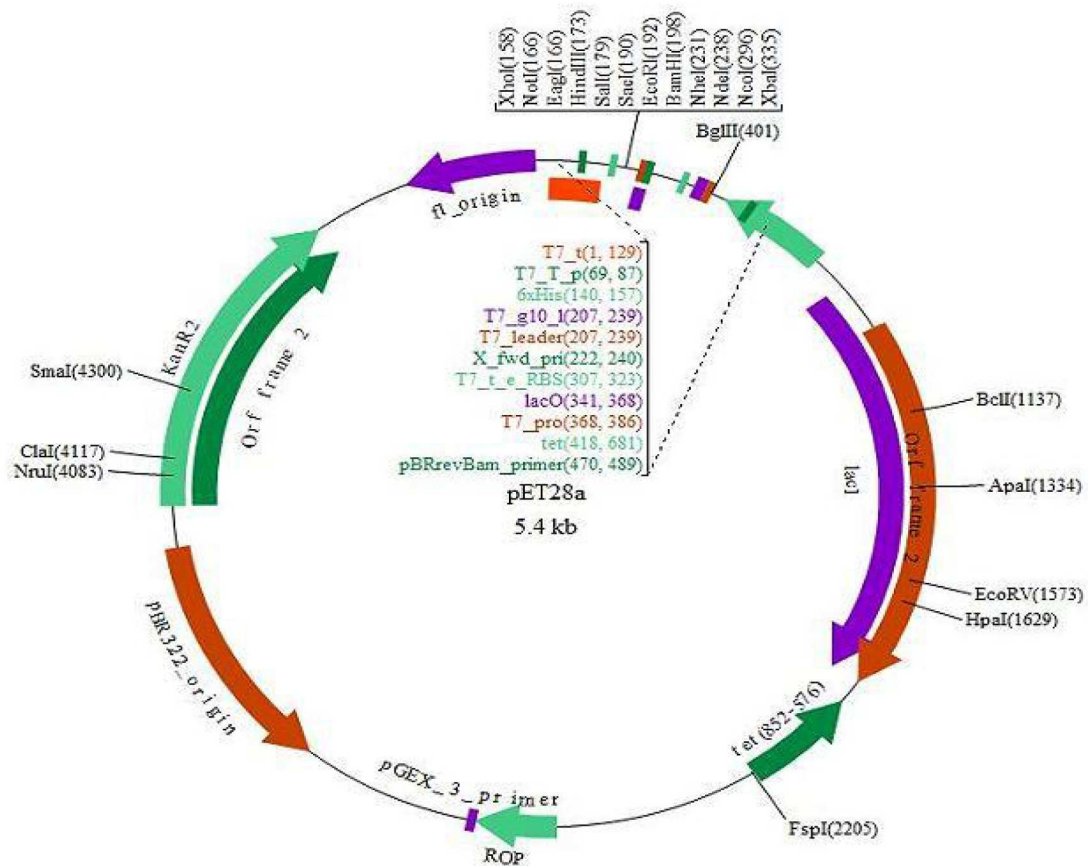


Figure 18 : pET28a(+) vecteur d'expression

Tableau 6 : Digestion du vecteur et des inserts par les enzymes de restrictions

Mix	Node 67 (25,9 ng/μL)	Node 65 (6,8 ng/μL)	Plasmide pET28a(+) (55 ng/μL)
H ₂ O	15μL	8μL	21μL
Tampon Fast digest 10x	3μL	5μL	3μL
ADN des inserts et du vecteur	10μL	35μL	4μL
Enzymes de restrictions (NdeI et SpeI)	1μL+1μL	1μL+1μL	
Enzymes de restrictions (NdeI et NheI)			1μL+1μL
Volume final	30μL	50μL	30μL

Tableau 7 : Ligation du vecteur avec les inserts Node 65/67

Mix	Volume (μL)
Tampon T4 ADN ligase 10x	2
ADN vecteur	7
ADN inserts 65/67	10
T4-ADN ligase	1
Volume final	20

5.2. Amplification des plasmides recombinés

Pour l'amplification des différentes constructions, différentes souches d'*E. coli* sont utilisées (tableau8). Il s'agit de bactéries compétentes avec une forte efficacité de transformation ce qui en fait de bons hôtes, d'autre part, elles portent les mutations *recA*⁻ et *endA*⁻ qui permettent de hauts rendements d'ADN plasmidique de bonne qualité.

Tableau 8 : Souches compétentes d'*E. coli* utilisée pour l'amplification

Souches Compétentes	Génotype	caractéristiques
HB101	F ⁻ , thi-1, hsdS20 (r _B ⁻ , m _B ⁻), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (str ^r), xyl-5, mtl-1	
DH5α	F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺) phoA supE44 -thi-1 gyrA96 relA1	Souche optimisée pour la réplication de plasmide, permet la stabilité des inserts

Un aliquot de la souche compétente d'*E. coli* HB 101 (pour le vecteur recombiné avec l'insert 65) et d'*E. coli* DH5α (pour le vecteur recombiné avec l'insert 67) est décongelé sur glace. 20 µL des produits de ligation du vecteur avec les inserts 65/67 sont ajoutés à 200 µL de la souche d'*E. coli* HB 101/DH5α, respectivement. Après 20 minutes sur glace, un choc thermique de 45'S à 42 °C est réalisé puis immédiatement refroidi dans un bain de glace pendant 2 min. 800µL du milieu SOC (Annexe n°02) sont alors ajoutés aux cellules qui sont incubées 1 h à 37°C. 175 µL des souches HB 101/DH5α sont étalées avec des billes sur six boîtes de pétri (trois boîtes pour chaque insert 65/67) contenant le milieu LB (Luria-Bertani) additionné de kanamycine (416µL/250 mL de LB). Les boîtes sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C toute la nuit.

5.3. Analyse plasmidique par criblage virtuel

Une carte de restriction du plasmide établie à partir d'un criblage virtuel, est réalisée à l'aide du logiciel Clone Manager Professional 9.2. La cartographie de restriction a pour objectif de reconstituer et de calculer la taille de la séquence d'ADN en réordonnant les fragments issus des digestions, c'est-à-dire, le vecteur pET28a(+) plus les inserts 65/67 plus les sites de restriction. Il permet aussi de déterminer les éventuelles enzymes de restriction qui digèrent les fragments du vecteur et de l'insert.

5.4. Analyse plasmidique par digestion de restriction

Parmi les transformants ayant intégré un plasmide, il s'agit de sélectionner ceux qui ont intégré le plasmide recombinant. Ce type de criblage convient lorsque l'on procède à un clonage classique avec un fort taux de réussite. Pour cela, une dizaine de clones sont sélectionnés à partir des boîtes de pétri puis mis en préculture, ils sont inoculés dans dix tubes pour chaque insert 65/67 contenant 3 mL du milieu LB liquide additionné de 5 µL de

kanamycine (50 µg/ml). Les tubes sont incubés sous agitation à 182 rpm toute la nuit à 37°C. Des mini-préparations ont été effectuées par la suite pour extraire et purifier le plasmide.

a- Extraction et Purification de l'ADN plasmidique

L'extraction et la purification des plasmides sont réalisées en utilisant le kit QIAprep Spin Miniprep par Qiagen selon les instructions du fabricant. La méthode est basée sur la lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989). Les étapes de la miniprep consistent à lyser les cellules par un détergent en milieu alcalin afin de libérer l'ADN génomique et plasmidique. L'ADN génomique et les protéines sont précipités par la suite. Le précipité est séparé par centrifugation, le surnageant contient l'ADN plasmidique. Celui-ci est précipité par de l'éthanol à 95 % et lavé par de l'éthanol à 70 % pour dissoudre les sels et restituer ses propriétés physico-chimiques à l'ADN.

Ce protocole est utilisé pour purifier jusqu'à 20 µg d'ADN plasmidique à partir d'une culture de 1-5 mL d'*E. coli* dans le milieu LB (Annexe n°08).

b- Digestion enzymatique et sélection des clones positifs

Les mini-préparations des deux plasmides recombinants sont ensuite digérées avec une enzyme de restriction BglII pendant 1h à 37°C (tableau9). Cette enzyme a été sélectionnée par criblage virtuel car elle a une capacité de digestion de l'insert et du vecteur. Le produit de restriction est ensuite analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %. Les clones positifs ayant intégré un plasmide muni de l'insert souhaité montreront deux bandes distinctes après restriction.

Le palindrome de BglII est :



Tableau 9 : Digestion de l'ADN plasmidique

Mix	Volume (µL)
H ₂ O	2,5
Tampon Fast digest 10x	2
ADN plasmidique	5
Enzyme de restrictions BglII	0,5
Volume final	10

6. Tests d'expression des protéines recombinantes en système procaryote

Pour la production et l'expression des différentes constructions, deux souches d'*E. coli* sont utilisées. Il s'agit d'*E. coli* BL21(DE3) et *E. coli* Rosetta 2 pLysS (DE3). La première est une souche classique d'*E. coli* BL21 modifiée, qui a intégré le phage λ DE3. Elle contient le gène codant l'ARN polymérase du bactériophage T7 dans son génome sous le contrôle d'un promoteur *lac* inductible par l'IPTG.

La deuxième est une souche améliorée afin de palier à la présence de codons rare (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA). Cette souche nécessite une sélection au chloramphénicol (0,34 μ g/mL). Le vecteur pLysS exprime le lysozyme T7, qui inhibe l'activité basale de l'ARN polymérase T7, optimisant de ce fait la régulation du niveau d'expression.

6.1. Transformation des souches d'expression et séquençage des plasmides recombinés

Des aliquots de deux souches compétentes : *E. coli* BL21 (DE3) et *E. coli* Rosetta 2 pLysS (DE3), sont décongelés sur glace. Les plasmides des deux inserts 65/67 ont été isolés à partir de cellules *E. coli* HB101/DH5 α respectivement à l'aide de mini-préparation d'ADN plasmidique. Ils sont ensuite introduits dans les deux souches *E. coli* BL21 (DE3) et *E. coli* Rosetta 2 pLysS (DE3). Pour cela, 1 μ L de plasmide recombinants sont ajoutés à 50 μ L des souches *E. coli* BL21 et Rosetta 2 pLysS (DE3). La transformation se fait comme décrit précédemment (Sambrook *et al.*, 1989).

Les plasmides des clones positifs sont ensuite analysés pour vérifier l'insertion et la séquence, puis séquencés par (GATC, Constance, Allemagne). Pour cela des précultures des clones ont été réalisés. 3 mL du milieu LB additionnés de 5 μ L de Kanamycine ont étéensemencés par une colonie des clones positifs puis incubés à 37°C toute la nuit. Des mini-préparations d'ADN plasmidique ont été réalisées pour chaque clone puis envoyées au séquençage.

6.2. Conservation des plasmides

Des stocks glycérolés à 25% des souches d'*E. coli* BL21 (DE3) et d'*E. coli* Rosetta 2 pLysS (DE3) transformées ont été réalisés à partir de 500 μ L de précultures des clones positifs additionnés de 500 μ L de glycérol à 50%.

6.3. Tests d'expression des α -amylases sur milieu LB chez *E. coli* BL21 (DE3)

Une culture des clones positifs de l'insert 65 est réalisée. 1,2 mL de préculture des clones d'*E. coli* BL21 (DE3) contenant l'insert 65 est additionné à 60 mL du milieu LB-Kanamycine (100 μ L de Kanamycine (50 μ g/ml)), la culture est incubée à 37 °C sous

agitation. L'expression est induite par l'ajout de d'IPTG à 0,5 mM final au début de la phase de croissance exponentielle (à une DO_{600} de 0,5-0,6 de culture),. Après 2 h d'induction, des prélèvements de 5 mL sont effectués chaque heure afin de suivre l'évolution de l'expression. La croissance est poursuivie pendant 5 h. Un témoin négatif d'induction a été réalisé en utilisant des BL21 DE3 non induites. Elle est incubée à 37 °C toute la nuit.

6.4. Tests d'expression des α -amylases sur milieux LB et auto inductible chez *E. coli* BL21 (DE3)

D'autres paramètres, comme la température de la culture d'expression, peuvent influencer et améliorer la solubilité des protéines recombinantes. Une culture de 60 mL de milieu LB-kanamycine est alorsensemencée avec un volume de 1,2 mL de préculture des clones positifs des deux inserts 65/67 de manière à obtenir une DO_{600} de 0,5-0,6. Cette culture est ensuite placée à 37 °C sous agitation. Pour les clones 67 l'expression des protéines recombinantes est induite par l'ajout de 0,5 mM final d'IPTG dans les milieux de cultures lorsque la DO_{600} atteint la valeur voulue. La culture est alors poursuivie pendant 5 h à 37 °C puis elle est stoppée (après 2 h d'induction, des prélèvements de 5 mL seront effectués chaque heure). Tandis que pour les clones 65, à l'issue de ce délai de 5 h d'induction, une baisse de température à 20 °C de la croissance bactérienne est réalisée, et la croissance est poursuivie toute la nuit.

Une autre culture des clones 65 est réalisée avec cette fois ci un milieu auto-inductible (tableau 10). Ce milieu permet un contrôle strict de l'expression des protéines recombinantes. Une culture de 50 mL de ce milieu estensemencée avec 1 mL de préculture, elle est incubée à 20 °C pendant 72 h sous une agitation de 175 rpm.

Tableau 10 : Composition du milieu auto inductible

Composants	Volume
solution de sels 10X	10 mL
solution de sources carbonée 25X	4 mL
solution de trace metal 100X	1 mL
MIX Vitamines 500X	200 μ L
eau mQ Stérile	100 mL

6.5. Tests d'expression des α -amylases sur milieu LB chez *E. coli* Rosetta 2 pLysS (DE3)

Lors de ce test d'expression, on utilise les souches Rosetta 2 pLysS (DE3), car le vecteur pLysS permet une inhibition de la fuite du T7 polymérase, cette fuite conduit à une surexpression des protéines sans induction par l'IPTG.

Les souches Rosetta ont été transformées par le vecteur d'expression des deux inserts 65/67 encodant les amylases, puis mises en préculture afin d'ensemencer la culture de 60 mL de milieu LB-chloramphénicol. L'expression de la protéine a été induite à une DO_{600} de 0,5-0,6 par l'ajout de 0,5 mM final d'IPTG, puis maintenue à 20 °C sous agitation toute la nuit.

La même culture est réalisée mais à 37 °C. Cette dernière est stoppée au bout de 5 h d'induction. Des prélèvements de 5 mL sont effectués chaque heure, après 2 h d'induction.

6.6. Détermination des paramètres d'expression des α -amylases sur milieu LB

Afin de déterminer les conditions favorables pour l'expression protéiques des deux constructions, des changements ont été effectués dans la concentration d'inducteur, la température, et le tampon de lyse. Pour cela, des cultures de 60 mL de milieu (LB-kanamycine) pour les souches *E. coli* BL21 (DE3) et une autre (LB-chloramphénicol) pour les Rosetta2 pLysS (DE3), sont ensemencées avec 1,2 mL de préculture des clones des deux inserts 65/67. Les cultures sont incubées à 37 °C sous agitation jusqu'à obtention d'une DO_{600} de 0,5-0,6. A partir de là, une induction est réalisée à 0,1 mM final d'IPTG. Les cultures sont ensuite remises en incubation à 30 °C pendant 4 h.

On réalise ensuite le même test d'expression que le précédent, mais cette fois ci, on fait une réplique de cultures : une avec les deux souches munis des deux inserts 65/67 est induite par 0,1 mM final d'IPTG, et l'autre non induite (témoin négatif). Ces dernières sont placées à 30 °C sous agitation pendant 4 h. Cette fois ci lors de la lyse des cellules et l'extraction des protéines recombinante, un changement du tampon de lyse est réalisé : (25 mM Tris pH 8, 200 mM KCl, 10% de glycérol, 0,1% et 1% de triton X-100).

6.7. Extraction des protéines recombinantes

La lyse des cellules bactériennes et l'extraction des protéines sont réalisées de la manière suivante. Les bactéries sont sédimentées en culot par centrifugation 15 min 10.000 g 4°C, après élimination du surnageant, les culots bactériens sont congelées à -20°C.

Les culots bactériens sont décongelés à température ambiante. Ils sont ensuite transférés dans un bécher en verre et placés dans la glace. La lyse est effectuée par sonication. Les culots sont remis en suspension dans 1,5 mL de tampon de lyse (trizmabase 100 Mm pH 8, NaCl 150 mM, lysozyme 0.75 mg/mL). La rupture des membranes bactériennes est initiée en introduisant du lysozyme. Afin de compléter la lyse des membranes, l'homogénat est soumis à 4 cycles de sonication pendant 1 min à 4 °C. L'amplitude est de 50 %, un temps de pulse de 1S' active et 1S' inactive, à la puissance 4 (on laisse reposer l'échantillon dans la glace pendant 2 min après chaque cycle). Après la lyse, l'échantillon est centrifugé 30 min à 10.000 g à 4 °C. Le contenu cytoplasmique des bactéries est récupéré dans le surnageant (extrait cellulaire). Le culot contenant le matériel insoluble est resuspendu avec 1,5 mL de tampon de lyse. Les fractions seront ensuite analysées par électrophorèse SDS-page.

6.8. Analyse de l'expression des protéines recombinantes

La pureté et le poids moléculaires des enzymes ont été déterminés par électrophorèse. Les protéines sont analysées par une électrophorèse SDS-Page sur un gel d'acrylamide à 10 % (Laemmli, 1970) (annexe n°05) composé d'un gel de séparation et un autre de concentration (tableau 11).

Dans un tube Eppendorf, 5 µL de tampon de charge 5X sont rajouté à 20 µL d'échantillons (culot/surnageant). Ces derniers sont dénaturés pendant 5 min à 95 °C par chauffage, puis déposées dans les puits du gel en plus du marqueur de taille. La migration se fait dans un tampon de migration 10X à 200 V pendant 1 h. Après migration des protéines, le gel est ensuite coloré pendant 10 min sous agitation dans du bleu de coomassie, puis décoloré jusqu'à ce que les bandes de protéines soient clairement visibles.

Tableau 11 : Composition d'un gel SDS page à 10%

Composants	Gel de séparation	Gel de concentration
Acrylamide 40%	2,1 mL	600 µL
H ₂ O	4,2 mL	3,8 mL
Tris HCl [1,5M/0,5M] (pH 8,8/ 6,8)	2,1 mL	500 µL
SDS 20%	40 µL	25 µL
APS 10%	60 µL	40 µL
TEMED	20 µL	20 µL

7. Test de purification des protéines recombinantes par chromatographie d'affinité

Le test de purification a été mené par chromatographie IMAC (immobilized metal affinity chromatography). Ce type de chromatographie d'affinité fait appel à l'immobilisation, sur une résine, d'un atome métallique, dans notre étude on a utilisé le cobalt.

L'étape de purification consiste en une chromatographie d'affinité en «batch». L'ensemble du processus a été réalisé à 4 °C. Les éluions se font par gravité, en faisant passer l'échantillon à travers une résine déposée dans une petite colonne en plastique de 20 mL. Deux cent (200 µL) de résine de cobalt en billes (Clonetech) ont été déposés dans la colonne, puis centrifugés à 560 g pendant 5 min à 4 °C. Par la suite elle est lavée avec de l'éthanol pour éviter toutes contaminations, ce dernier est retiré par gravité. 5 mL de surnageant des souches *E. coli* BL21 et Rosetta2 pLysS (DE3) des clones 65/67 après sonication ont été chargés sur la résine. La suspension est placée 5 min dans la glace puis centrifugé à 560 g à 4 °C pendant 5 min. La fraction non retenue est collectée et conservée à 4 °C. Les protéines recombinantes sont retenues sur la résine par le biais de son étiquette à hexa-histidines. La résine est resuspendu dans un eppendorf dans 500 µL d'un tampon composé de 100 mM tris pH 7, 150 mM NaCl, puis centrifugé. Elle est lavée 3 fois avec 500 µL d'un tampon (100 mM tris pH 7, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole). Le premier lavage c'est pour retirer tout ce qui n'est pas fixé sur la résine. Le second lavage est réalisé deux fois afin d'éliminer tout ce qui s'est fixé de façon non spécifique sur la résine. L'éluion a été menée à 3 reprises en introduisant 100 µL d'un tampon d'éluions contenant (100 mM tris pH 7, 150 mM NaCl, 300 mM imidazole). L'ensemble des fractions recueillies lors du lavage et de l'éluion ont été collectées et conservées à 4 °C, puis analysées sur gel d'électrophorèse SDS-page.

8. Déchets d'orange substrat de fermentation

8.1. Milieu de base

Les déchets d'oranges sont issus de l'ENAJUC une entreprise de production de jus de Ramdhan Djamel, Skikda. Algérie. Ils sont d'abord séchés à l'air, puis réduits en poudre à l'aide d'un broyeur, et enfin tamisés à travers un tamis de 0,25 mm de diamètre. Les déchets sont stockés dans des boîtes à température ambiante.

Le milieu de base est préparé sous forme de suspension de déchets d'oranges (5% et 10% (p/v)) avec de l'eau distillée, sous agitation jusqu'à obtention d'une solution homogène. Le mélange est ensuite centrifugé à 4000 g, puis le surnageant est filtré à travers la gaze. Le

filtrat est alors utilisé comme milieu de base pour la production enzymatique après une dilution au $\frac{1}{2}$ avec un tampon phosphate de 0,1M pH5. La composition du milieu de fermentation varie selon les plans d'expériences (Saci, 2012).

8.2. Composition physico-chimique du déchet d'orange

8.2.1. Dosage des sucres totaux

Les sucres réducteurs sont déterminés par la méthode de Dubois *et al.*, (1956) (Annexe n°09). La réaction des sucres avec l'acide sulfurique provoque la formation des composés furfural. Ces produits se condensent avec le phénol pour donner un complexe jaune orangé, leur concentration est déterminée à 488 nm par rapport à une gamme étalon de glucose.

8.2.2. Dosage des protéines

Les protéines sont quantifiées par la méthode de Lowry *et al.*, (1951) (Annexe n°09). La bovine serum albumine (BSA) a été utilisée comme standard.

8.2.3. Mesure du pH

La poudre de déchets d'oranges est solubilisée dans l'eau distillée, puis centrifugée à 4000 g pendant 20 min, puis filtrée à travers la gaze. Le pH de la solution du déchet d'orange est alors mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

8.2.4. Détermination de la matière sèche

La détermination de la matière sèche consiste à sécher 2g de l'échantillon dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à poids constant (Afnor, 1986) (Annexe n°09).

8.2.5. Dosage des cendres et des minéraux

La teneur en cendres de l'échantillon est déterminée après calcination suivant les normes Afnor (1986) (Annexe n°09). Deux grammes d'échantillon sont placés dans un creuset en porcelaine préalablement pesé. Le creuset est incinéré dans un four à moufle à une température de 550°C pendant 5h jusqu'à minéralisation complète. Le taux de cendres se calcule comme étant le rapport de masse restante après incinération sur la masse initiale.

8.2.6. Détermination de l'azote total

Dans la méthode de Kjeldahl (Afnor, 1986) (Annexe n°09), le dosage de la matière azotée se fait par une minéralisation. Elle est effectuée à l'aide d'un excès d'acide sulfurique concentré et chaud. Son but est de dégrader la matière organique azotée sous forme de sel d'ammonium. Cette dégradation se fait à l'aide d'un mélange de catalyseurs (sélénium en poudre pur). L'ammonium du minéralisât se transforme alors sous forme d'ammoniaque. Ce dernier est recueilli dans une solution d'acide borique par distillation. Le titrage de l'ammoniaque se fait ensuite par une solution d'acide sulfurique de normalité connue 0,1N.

Tableau 12: La matrice de Plackett-Burman pour l'étude de 23 variables avec 24 expériences.

N° d'essais	Facteurs																						
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1
4	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1
5	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1
6	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1
7	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
9	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
10	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1
11	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1
12	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1
13	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1
14	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1
15	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1
16	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1
17	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1
18	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1
19	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1
20	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
21	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
22	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
23	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1
24	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1

8.2.7 Détermination de la matière grasse

Le dosage de la matière grasse se fait par la méthode de Soxhlet (Lecoq, 1965) (Annexe n°09). L'extraction de la matière grasse se fait à chaud grâce à l'éther de pétrole par distillation. Cette opération est réalisée à l'aide d'un appareil Soxhlet. La teneur en extraits lipidiques est déterminée après évaporation du solvant.

9. Optimisation de la production enzymatique

L'optimisation statistique des conditions de fermentation est un problème important dans le développement du bio-processus économiquement réalisables. L'optimisation du milieu par la méthode classique implique de changer une variable indépendante en maintenant les autres facteurs constants. Les méthodes classiques pour la conception expérimentale multifactorielle sont longues et incapables de détecter l'optimum réel, en raison des interactions entre les facteurs (Liu et Tzeng, 1998). Dans le processus de fermentation, les variables opérationnelles interagissent et influencent mutuellement la réponse. Il est important que la méthode d'optimisation tienne compte de ses interactions afin de déterminer un ensemble de conditions expérimentales optimales (Weuster-Botz, 2000). Des processus optimaux peuvent être développés en utilisant une procédure de conception expérimentale efficace.

Dans cette étude, une première approche statistique a été utilisée, dans laquelle un plan de Plackett-Burman (1946) est employé pour sélectionner et identifier les variables qui ont un effet significatif influençant la production amylasique sous SmF par *Streptomyces* sp. (20r). Une deuxième approche est effectuée lors de ce travail, afin de déterminer les optima des variables par CCD de Box et Wilson (1951) combiné avec la méthodologie des surfaces de réponse (RSM).

9.1. Conditions de fermentation

Les cultures sont réalisées dans des erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL du milieu de production additionnés de sources de carbone et d'azote à différentes concentrations selon le (tableau 12), générant 24 essais différents. Après une stérilisation à 121 ° C (15 psi) pendant 20 min, les milieux sont inoculés avec 10% et 5% (v/v) d'une suspension de spores de la souche *Streptomyces* sp. (20r) (DO600 = 0,68). Les cultures sont ensuite incubées pendant 5 jours à 30 °C sous agitation à 140 rpm. Après centrifugation à 4000 g à 4°C pendant 20 min, le filtrat (l'extrait enzymatique brut) est utilisé pour différents dosages : dosage de l'activité enzymatique, des protéines totales et mesure de la biomasse.

Tableau 14 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans les matrices de Plackett-Burman pour 19 facteurs.

Facteurs	Niveaux	
	(+)	(-)
X1 Déchets d'oranges (g/L)	15% (150)	5% (50)
X2 Amidon soluble (g/L)	1% (10)	0
X3 Dummy	-	-
X4 Solution saline (ml/L)	0,1% (1)	0
X5 CaCl ₂ (g/L)	0,1% (1)	0
X6 NaCl (g/L)	6,5% (65)	0
X7 Glycérol (ml/L)	0,02% (0,2)	0
X8 Taux d'inoculum (ml/L)	10% (100)	5% (50)
X9 pH	9	5
X10 Tween 80 (ml/L)	1% (10)	0
X11 Corn Steep Liquor (ml/L)	0,1% (1)	0
X12 Dummy	-	-
X13 Extrait de levure (g/L)	0,1% (1)	0
X14 Peptone (g/L)	1% (10)	0
X15 Tryptone (g/L)	0,1% (1)	0
X16 Dummy	-	-
X17 Urée (g/L)	0,1% (1)	0
X18 Caseine (g/L)	0,1% (1)	0
X19 Dummy	-	-
X20 Sulfate d'ammonium (g/L)	0,5% (5)	0
X21 Extrait de viande (g/L)	1% (10)	0
X22 Phosphate d'ammonium (g/L)	0,1% (1)	0
X23 Nitrate de sodium (g/L)	0,1% (1)	0

9.2. Les plans d'expériences

Les plans d'expériences, sont des modèles statistiques permettant d'obtenir un maximum d'informations sur une réponse en un minimum d'expérience (Imbert, 2012). Il est ainsi possible d'étudier l'impact de paramètres expérimentaux sur les mesures réalisées, ou encore d'optimiser ces paramètres, mais également d'étudier les variations des niveaux de tous les paramètres biologiques en même temps pour chaque essai.

9.2.1. Plan d'expériences Plackett et Burman

La Matrice de Plackett-Burman est un plan factoriel fractionnaire de premier ordre. Ce sont des matrices carrées établies à partir d'un générateur de base (tableau 13). Ce plan permet d'identifier les constituants du milieu en ce qui concerne leurs principaux effets significatifs. La conception expérimentale de Plackett-Burman est une conception factorielle à deux niveaux qui identifie différents paramètres critiques requis pour la production élevée d' α -amylase en sélectionnant n variables avec un nombre d'expériences minimales $n + 1$ (Plackett et Burman, 1946). Vingt-trois variables ont fait l'objet de la présente étude, dont 19 variables réelles et quatre dummy conduisant à 24 essais (tableau 12).

Tableau 13: Générateurs des matrices de Plackett et Burman

N	Générateurs des matrices
8	+ + + - + - -
12	+ + - + + - - - + -
16	+ + + + - + - + + - - + - -
20	+ + - - + + + + - + - + - - - - + + -
24	+ + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - -

La matrice expérimentale pour la sélection des variables est donnée dans le (tableau 12). Les colonnes représentent les variables et les lignes représentent les différentes expériences. Pour estimer l'erreur expérimentale, quatre variables (X3, X12, X16 et X19) sont conçues comme étant muettes. Tous les facteurs sont désignés comme des facteurs numériques et sont étudiées à deux intervalles espacés -1 (niveau bas) et +1 (niveau élevé) (tableau 14).

Le plan de Plakett-Burman suppose qu'il n'y a pas d'interactions entre les différents constituants du milieu X_i dans l'intervalle des variables sous les conditions d'essai. Une approche linéaire est donc jugée suffisante pour la sélection des facteurs qui ont un effet positif sur la production amyliasique.

La réponse expérimentale peut être donc approchée par une équation polynomiale de premier degré :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \varepsilon \quad (i = 1 \dots k) \quad (1)$$

Où Y est la réponse expérimentale, β_0 les effets principaux des facteurs, β_i sont les coefficients de régression et ε est l'erreur aléatoire. L'effet principal d'une telle conception peut être simplement calculé comme la différence entre la moyenne des mesures effectuées au niveau élevé (+1) du facteur et la moyenne des mesures effectuées au bas niveau (-1).

L'effet des paramètres individuels sur la production d' α -amylase a été calculé par l'équation suivante :

$$E = \left(\sum (Y +) - (Y -) \right) / N$$

E représente l'effet de chaque paramètre ; Y_+ et Y_- sont des réponses (activités de l' α -amylase) des essais auxquels le paramètre était à son niveau supérieur et inférieur, respectivement. N est le nombre total d'essais.

Les coefficients polynomiaux de premier ordre ont été calculés et analysés à l'aide du logiciel statistique «R» (version 2.14.1 (2011-12-22)).

La signification de chaque variable sur la production de l' α -amylase est déterminée via le test- t de student. S'il est significatif, l'effet est vraiment dû au changement du niveau du facteur et non pas au hasard ni aux erreurs expérimentales. Autrement dit, le changement du facteur du niveau (-) au niveau (+) entraîne un effet positif ou négatif sur la réponse. Le niveau de confiance accepté est $(1-\alpha) \geq 90\%$.

9.2.2. Plan Composite Centré

Le plan composite centré (CCD) de Box et Wilson (1951), combiné à la méthodologie de la surface de réponse (RSM) a été adopté pour déterminer les optima des quatre variables les plus significatives (concentration du déchet d'orange, taille d'inoculum, NaCl et pH), afin d'améliorer la production amylasique par l'isolat *Streptomyces* sp. (20r). 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).

Le plan CCD est composé de trois parties distinctes, générant 28 essais différents (tableau 15):

- un plan factoriel complet 2^k (k est le nombre de facteurs égal à 4) sur deux niveaux (- et +1) soit 16 points factoriels.
- 8 points en étoile avec deux niveaux ($-\alpha$ et $+\alpha$) correspondant au plan factoriel : où $\alpha = 1/4(2k)$; k est le nombre de variables, donc dans notre cas $\alpha = 2$
- N=4 répétitions du point central (niveau 0) soit 4 points centraux.

Tableau 15: Matrice du plan composite centré de Box et Wilson à quatre facteurs.

N° d'essais	X1 (Déchets d'oranges)	X2 (NaCl)	X3 (Inoculum)	X4 (pH)
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0

La production d'amylase a été estimée à l'aide d'une équation polynomiale de second ordre :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

Y : la réponse expérimentale (activité de l' α -amylase).

β_0 : la constante du modèle

β_i : le coefficient linéaire.

β_{ii} : le coefficient quadratique.

β_{ij} : le coefficient d'interaction.

X_i : le niveau codé des variables indépendantes.

Les quatre variables indépendantes ont été étudiées à cinq niveaux différents ($-\alpha$, -1, 0, +1, + α) (tableau 16). Ils sont codifiés selon l'équation :

$$X_R = \frac{X_I - X_0}{d}$$

X_R : valeur codée

X_i : valeur réelle

X_0 : valeur au niveau 0

d : pas entre les niveaux

Le calcul des concentrations des quatre facteurs sélectionnés est comme suit :

$$X_1 = \frac{\text{déchets d'oranges} - 15}{5}$$

$$X_2 = \frac{\text{NaCl} - 6.5}{0.5}$$

$$X_3 = \frac{\text{Taux d'inoculum} - 10}{2.5}$$

$$X_4 = \frac{\text{pH} - 9}{1}$$

Tableau 16 : Les niveaux codés et réels des variables indépendantes utilisés dans le plan composite centré

Facteurs	code	Niveaux				
		$-\alpha$ (-2)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+2)
Déchets d'oranges (%)	X1	5	10	15	20	25
NaCl (%)	X2	5,5	6	6,5	7	7,5
Taux d'inoculum (% (v/v))	X3	5	7,5	10	12,5	15
pH	X4	7	8	9	10	11

L'équation polynomiale ajustée a ensuite été exprimée sous forme de contours et de parcelles de surface tridimensionnelles afin d'illustrer la relation entre les réponses et les niveaux expérimentaux de chacune des variables utilisées dans cette étude.

9.2.3. Analyses statistiques et modélisation

Le traitement statistique du modèle a été réalisé pour évaluer la valeur-*t*, la valeur-*P*, ainsi que l'analyse de la variance (ANOVA) qui permet la comparaison entre les variables dépendantes et d'estimer leurs effets.

- Le test de *Student (t)* a été effectué pour déterminer la signification des coefficients de régression.
- Les valeurs-*P* ont été utilisées comme outil pour vérifier la signification des effets d'interactions qui, à leur tour, peuvent indiquer les modèles des interactions entre les variables (Montgomery, 1991)
- La qualité de l'ajustement du modèle de régression a été exprimée via le coefficient de détermination (R^2).
- La signification statistique du R^2 ajusté a été déterminée par un test de *Fisher (F)* ainsi que ces probabilités associées $p(F)$.
- Le logiciel statistique, STATISTICA software (Version10, StatSoft Inc., USA) a été utilisé pour tracer les surfaces de réponse.

9.2.4. Confirmation du modèle expérimental

Le modèle mathématique généré lors de l'RSM a été validé en effectuant une fermentation en trois répétitions avec les optima obtenus. Les données obtenues expérimentalement ont été comparées à celles prédites et l'erreur de prédiction a été calculée.

10. Méthodes analytiques

10.1. Mesure de la biomasse

La mesure du poids sec de la biomasse est effectuée à la fin de chaque fermentation. 2 mL de bouillon de culture sont prélevés et centrifugés à 4000 g à 4°C pendant 20 min. Le culot est lavé avec 2 mL d'eau distillée, puis filtré sur papier Watman N°2. Afin de déterminer le poids sec, la biomasse est séchée dans l'étuve réglée à 105°C pendant 24 heures, puis 15 min dans un dessiccateur sous vide jusqu'à poids constant (Pedersen et Nielsen, 2000). La différence de poids est calculée puis exprimée en poids sec (g/L).

10.2. Dosage de l'activité amylasique

Le surnageant est utilisé pour le dosage de l'activité enzymatiques et des protéines. Il constitue l'extrait enzymatique brut. L'activité amylasique est évaluée selon la

méthode décrite par Bernfeld (1955) (Annexe n°09), basée sur la mesure du pouvoir réducteur lors de l'hydrolyse de l'amidon. La réaction est colorimétrique, elle est due à la réaction du sucre réducteur avec l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de sucre réducteur (maltose) libéré par la réaction d'hydrolyse.

Le mélange réactionnel est composé de 0,5 mL de l'extrait enzymatique brut auquel on ajoute 0,5 mL d'amidon soluble à 1% (*p/v*) dilué dans un tampon phosphate 0,1M, pH5. Le mélange est incubé pendant 30 min à 40°C dans un bain marie agitateur. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 mL de DNSA. Le tout est ensuite chauffé au bain marie à 100°C pendant 5 min, puis refroidis immédiatement dans un bain de glace, 10 mL d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre (Shimadzu UV-120-02) à 540 nm. La concentration des sucres réducteurs est déterminée en fonction de la courbe étalon de 0 à 2 mg/mL de maltose utilisé comme référence.

Une unité de l'activité enzymatique est définie comme 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 sous les conditions d'essai.

10.3. Dosage des protéines

La concentration en protéines des différentes cultures est mesurée selon la méthode de Lowry *et al.*, (1951) (Annexe n°09). Cette méthode est basée sur le fait que le réactif de Folin-ciocalteu en présence d'une protéine donnée est réduit en un complexe bleu.

Un millilitre d'extrait enzymatique est ajouté à 1 mL de la solution M. Le mélange est homogénéisé, puis laissé au repos pendant 15 min à température ambiante. 3 mL de réactif de Folin sont ajoutés à la réaction et agités extemporanément. Les tubes sont placés pendant 45 min dans l'obscurité. L'absorbance est alors mesurée à 750 nm. La solution de sérum albumine bovine (BSA) dont les concentrations varient de 0 à 500 μ g/mL, est utilisée comme protéine de référence pour réaliser la gamme d'étalonnage.

11. Cinétique de production

La cinétique de production de l'enzyme est réalisée avec des paramètres optimaux du milieu testés auparavant. Une culture de 100 mL sur milieu optimisé est réalisée à partir d'une pré-culture de 4 jours du même milieu. La cinétique de production est suivie pendant 14 jours à 30°C sous une agitation de 140 rpm. Des prélèvements sont effectués chaque 24 h, puis centrifugés à 4000 g à 4°C pendant 20 min. Le culot est utilisé pour la mesure de la biomasse.

Le surnageant obtenu est conservé à -20°C puis utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique, des protéines et des sucres totaux.

12. purification préliminaire de l'alpha-amylase de la souche *Streptomyces* sp. (20r)

12.1. Préparation de l'extrait brut

Une pré-culture de 10 mL a été réalisée sur milieu ISP₂, pendant 3 jours. Cette dernière sert à inoculer 100 mL du même milieu. La culture dure 4 jours à 30°C sous une agitation à 140 rpm. Le surnageant obtenu après centrifugation à 4000 g pendant 20 min est filtré à trois reprises à travers différents types de membranes millipore : AA (0,88 µm), HA (0,45 µm), et une membrane de 0,22 µm de diamètre, afin d'éliminer toutes les impuretés et les contaminants. Le filtrat (extrait enzymatique brut) est conservé dans un congélateur à -20°C, il sera utilisé pour la suite de la purification (Saeeda *et al.*, 2011).

12.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

L'extrait brut (60 mL) de la souche *Streptomyces* sp. (20r) est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium avec une saturation de 70% (Annexe n°10), afin de séparer les protéines en différentes fractions. La solution est placée dans un bécher à 4°C, sous agitation constante pendant 4 h. Après centrifugation à 20000 g pendant 30 min à 4°C, les protéines précipitées (culot) sont récupérées dans 2 mL de tampon Tris-HCl (Annexe n°11). Le dosage de l'activité enzymatique et des protéines totales est effectué après cette étape.

12.3. Dialyse

Les protéines précipitées sont mises en suspension dans un volume réduit du tampon Tris-HCl. Elles sont ensuite dialysées contre 2 litres du même tampon, en utilisant une membrane semi-perméable (Spectra/por, 20mm, limite d'exclusion : 12 kDa), sous une faible agitation à 4°C pendant 24 h. Le tampon de dialyse est renouvelé 3 fois chaque 4 h.

12.4. 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. Dans notre présente étude, cette dernière est constituée du gel de Sephadex G75 (Pharmacia). Ce gel possède un domaine de fractionnement situé entre 3 à 80 kDa. Une colonne d'une dimension de (1x60cm) a été préparée puis équilibrée avec du tampon Tris-HCl jusqu'à stabilisation du

débit à 0,8 mL/min. Le volume mort (V_0) de la colonne est déterminé par injection du bleu de dextran (10^3 kDa) à une concentration de 1 mg/mL.

La fraction issue de dialyse (5 mL) est déposée en haut de la colonne, et éluée dans ces conditions à débit constant. Des fractions de 1,5 mL sont recueillies et caractérisées (activité enzymatique d' α -amylase, et teneur protéique à 280 nm). Les fractions douées d'une forte activité enzymatique sont rassemblées puis stockées à -20°C .

13. Caractérisation partielle de l' α -amylase

L' α -amylase partiellement purifiée produite par l'isolat *Streptomyces* sp. (20r) est caractérisée. Cette caractérisation préliminaire est réalisée avec la fraction active obtenue après purification sur gel filtration.

13.1. Activité en fonction de la température

L'influence de la température sur l'activité de l' α -amylase est étudiée. Les mesures sont réalisées pour un intervalle de température allant de 37°C à 100°C afin de déterminer la température optimale de l'enzyme. La mesure de l'activité est réalisée à pH5 pendant 30 min.

13.2. Activité en fonction du pH

L'étude de la variation des activités enzymatiques en fonction du pH est réalisée pour une gamme de pH variant de 2,2 à 10,6. Quatre types de solutions tampon 20 mM sont utilisés pour suivre les effets du pH sur l'activité : tampon Glycine-HCl pH (2,2-3,4), tampon sodium acétate pH (4,0-5,2), tampon phosphate pH (5,8-8,2), et tampon Glycine-NaOH pH (8,8-10,6) (Annexe n°11). L'activité de l' α -amylase a été effectuée à 40°C pendant 30 min.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Sélection de la meilleure souche actinomycétale productrice d' α -amylase

Les diamètres des zones d'hydrolyse d'amidon pour la sélection des actinomycètes productrices d' α -amylase démontrent que deux souches (*Streptomyces* sp. 20r et 19) étaient proéminentes, parmi quatorze actinomycètes, qui présentaient plus ou moins une zone de lyse entourant les spots de croissance microbienne dans le milieu à base d'amidon (figures 19. A, 19. B et tableau 17). La souche de *Streptomyces* sp. (20r) a été choisie en raison de son activité amylasique et de ses bonnes caractéristiques de croissance et de sporulation (figure 20. A). Ce microorganisme a été isolé de l'eau des marais salant d'Ain Mlila, Algérie. La séquence de son gène ADNr 16S a été déterminée et soumise à GenBank sous le numéro d'accèsion KP314280.

NB : La couleur de la zone de lyse entourant la croissance microbienne, nous a permis de différencier les α -amylases des β -amylases. La zone était d'une couleur rouge-brune ce qui nous a démontré que c'est bien une α -amylase (figure 20. B).

Tableau 17 : Criblage d'actinomycètes produisant l' α -amylase, par des zones d'hydrolyse sur milieu à base d'amidon.

Echantillons	Activité amylasique sur boîtes de pétri			
	-	+	++	+++
Sol de sebkha	2	2	1	0
Eau de sebkha	0	1	1	1
Eau de lac	0	2	0	0
Écorces de cèdre	0	2	1	1
Total	2 (14,3 %)	7 (50 %)	3 (21,4 %)	2 (14,3 %)

Zones d'hydrolyse: (-) négative, (+) faible (< 2,0 cm de diamètre), (++) moyenne (2,0 cm < X < 3,0 cm de diamètre), (+++) forte (> 3,0 cm de diamètre)

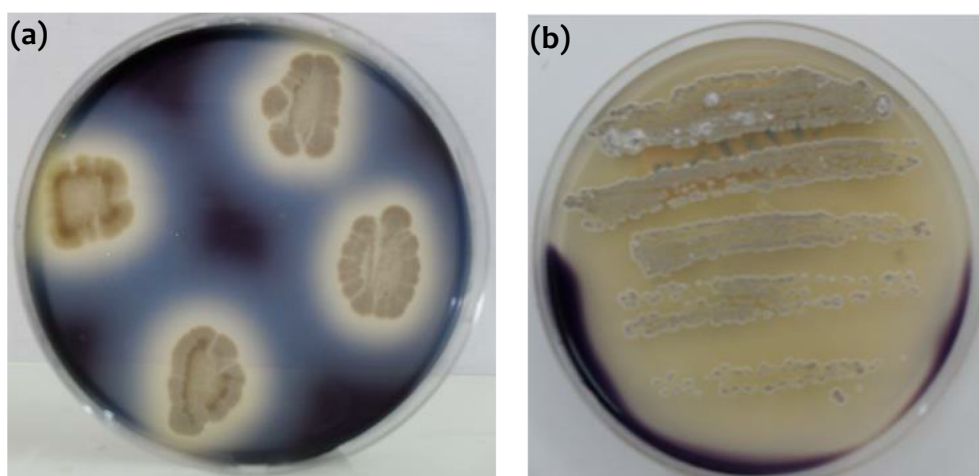


Figure 19. A : Dégradation de l'amidon par la souche actinomycétale 20r.

(a): Technique des spots (b): Technique des stries.

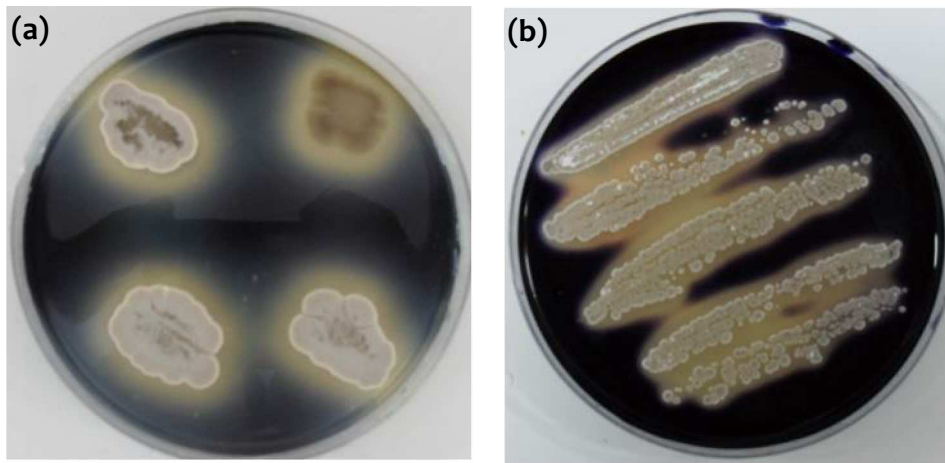


Figure 19. B : Dégradation de l'amidon par la souche actinomycétale 19.
(a): Technique des spots **(b):** Technique des stries.

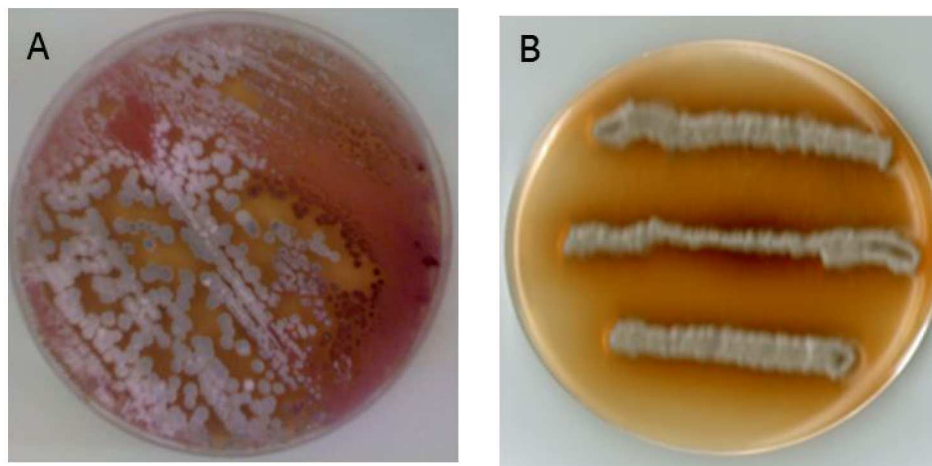


Figure 20 : (A) Aspect macroscopique de la souche 20r. (B) Zone de lyse entourant la souche 20r de couleur rouge-brune sur milieu à base d'amidon.

2. Criblage des gènes d'alpha amylase

2.1. Séquençage génomique de *Streptomyces* sp. (20r)

L'extraction de l'ADN génomique de la souche (20r) a été réalisée par deux méthodes: la première, en utilisant le Kit GenElute Bacterial Genomic DNA ; et la deuxième a été réalisée selon la méthode modifiée de Vijay *et al.*, (2010). La concentration de l'ADN génomique extrait par la première méthode est égale à 70,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, tandis qu'une concentration de l'ordre de 236,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ est obtenu avec la deuxième méthode.

L'ADN génomique a été séquençé par le séquençage haut débit Illumina HiSeq 2000 sur la plate-forme Get Génome et Transcriptome du Génomol de Toulouse, France. La technologie illumina a été initié par la société Solexa avec la sortie d'un nouvel appareil de séquençage en 2004 (Bennett, 2004). Cette méthodologie ne s'appuie pas sur le même

principe que les techniques précédentes. Pour cette technologie illumina la matrice est immobilisée sur un support solide et l'amplification se fait par création de ponts, permettant d'obtenir une longueur de séquence théorique de 2x100 pb (Figure 21).

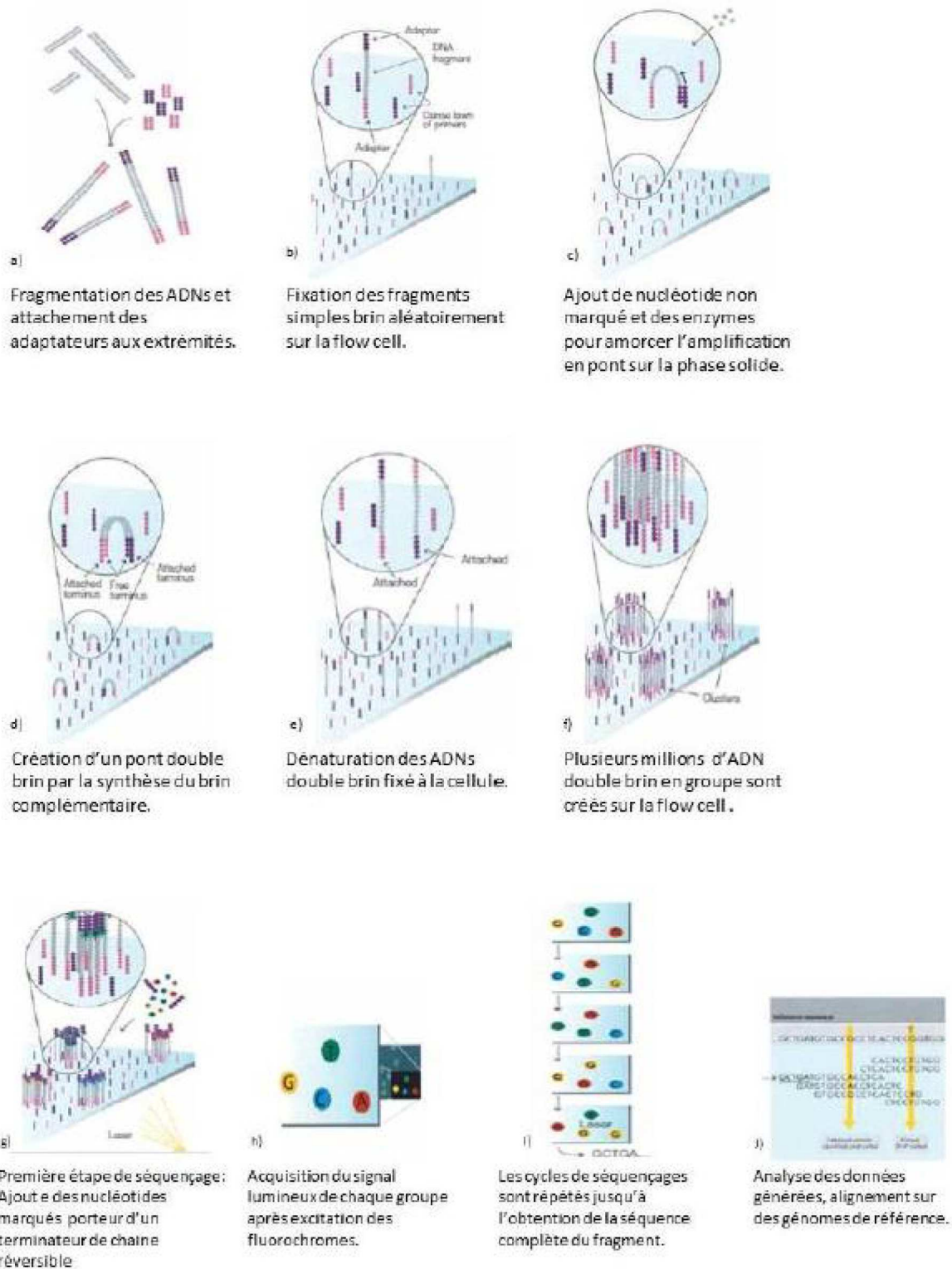


Figure 21 : Schématisation du principe de la technologie de séquençage Illumina D'après

<https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>

2.2. Traitement bioinformatique des séquences

Le traitement et l'analyse qualitative des données ont été effectués à la plate- forme Bioinformatique du Genotoul Bioinfo (Toulouse, France).

Ainsi, l'assemblage final du génome de la souche *Streptomyces* sp. (20r) a permis d'assembler les reads (lecture) afin d'obtenir 165 contigs de tailles supérieur à 2000 pb. La longueur du plus grand contig est de 301.099 pb. La taille des contigs est très satisfaisante, ce qui signifie que les banques de séquences sont de très bonne qualité et peuvent être utilisées dans les assemblages. La taille du génome obtenue est de 7 Mb, ce qui représente 98% de la séquence totale du génome, avec un taux de G+C % égale à 75%.

2.3. Blast et alignements des séquences

Dans un premier temps, un recensement des α -amylases caractérisées dans la base de données CAZY, qui répertorie la famille GH13, est réalisé. Par la suite, on a déterminé les orthologues putatifs (Nodes) de nos gènes d' α -amylases à partir de notre assemblage génomique de la souche de *Streptomyces* sp. (20r). Pour cela, quatre séquences protéiques appartenant au genre *Streptomyces* qui codent pour des α -amylases de tailles différentes (507aa/566aa/914aa/989aa), ont été choisie et qui serviront de matrice ou appât, et dont les séquences sont connues (Annexe n° 04).

Un Translated BLAST (tblastn) sur le génome contre les séquences protéiques d' α -amylases de différentes tailles a été réalisé. Il nous a permis d'identifier six orthologues putatives (Nodes) sur l'ADN génomique de *Streptomyces* sp. (20r), possédant des cadres ouverts de lecture ORFs nommé Node qui ont été identifiés, et présentant des homologies avec des gènes codant potentiellement pour des α -amylases comme suit :

Amylase de *Streptomyces lividans* (507 aa) { Node 67 taille 41288 pb → 93 % d'identité
Node 64 taille 44519 pb → 90 % d'identité

Amylase de *Streptomyces albus* (566 aa) { Node 67 taille 41288 pb → 93% d'identité
Node 64 taille 44519 pb → 78 % d'identité

Amylase de *Streptomyces lividans* TK24 (914 aa) ↔ Node 76 taille 35290 pb → 70 % ID

Amylase de *Streptomyces griseorubens* (989 aa) ↔ Node 65 taille 41819 pb → 97% ID

2.4. Annotation structurale et fonctionnelle des séquences

L'annotation structurale du génome de *Streptomyces .sp* (20r) a permis de définir la position des ORFs se trouvant sur les contigs (Nodes) de notre assemblage génomique. Cette annotation est réalisée à l'aide du logiciel Clone Manager Professional 9.2.

Les bornes nucléotidiques des six orthologues putatives sont les suivant :

Les bornes nucléotidiques du Node 67 ORF-28 sont [688-2298] → 538 aa avec le codon stop

Les bornes nucléotidiques du Node 65 ORF-3 sont [3855-6734] → 961 aa avec le codon stop

Les bornes nucléotidiques du Node 76 ORF-1 sont [24617-26542] → 643 aa avec le codon stop

Les bornes nucléotidiques du Node 67 sont [2310-895] → 473 aa avec le codon stop

Concernant les bornes nucléotidiques des deux Nodes 64 (ORF-9 et ORF-19), on a pas pu trouver les codons stop des deux séquences.

Le séquençage et l'annotation fonctionnelle du génome de *Streptomyces .sp* (20r) a permis de définir différentes régions chromosomiques, basées sur les fonctions prédites en tant qu' α -amylases des différentes ORFs (CDS) retrouvées par le blastp contre la pdb. Enfin des alignements de séquences contre des banques de données protéiques (Protein Data Bank) sont effectués à l'aide de Blastp, afin de sélectionner les séquences protéiques homologues (Annexe n°12). L'analyse de la séquence du Node 65 ORF-3, on la comparant avec la banque

de données NCBI, a révélé la présence d'un gène codant une α -amylase présentant une très forte homologie d'acides aminés avec celle de *Streptomyces bikiniensis* (99% d'identité) avec les positions de quatorze acides aminés qui divergent, ayant été identifiés. Cette analyse suggère donc que ce gène code pour une α -amylase.

Concernant la séquence du Node 67 ORF-28, l'analyse a montré qu'il y'a une identité parfaite de 100% avec une glycosidase (α -amylase) de *Streptomyces* sp. WAC04657 (Gverzdys et Nodwell, 2016), prouvant ainsi que notre ORF-28 code bien pour une α -amylase.

L'alignement de séquences des deux Nodes, indique aussi que l' α -amylase comprend, une triade catalytiques (Asp, Glu et Asp), ainsi que quatre régions hautement conservées (I-IV) précédemment identifiées dans la famille des α -amylases (Nakajima *et al.*, 1986 ; Nielsen et Borchert, 2000).

Les ORFs obtenus ont été alignés à l'aide de Blastp de séquences contre les banques (nr) pour pouvoir déterminer les domaines conservés des séquences amylolytiques (Annexe n°13). Pour cela, parmi les six ORFs codants pour des α -amylases, on a choisi deux séquences pour la suite des travaux, le Node 67 ORF-28 ; et le Node 65 ORF-3. Car ces deux séquences protéiques possèdent des domaines modulaires (CBM) : Les Nodes 67 et 65 possédant un CBM 20 et un CBM 2 en C-terminal et deux CBM 25 en N-terminal, respectivement (Annexe n°13).

Environ 10% des enzymes amylolytiques possèdent un domaine de liaison aux glycosides hydrolases, outre les amylases. Les SBD (starch binding domain) sont classés sous les CBM (modules de liaison aux hydrates de carbone). Un CBM est un module auxiliaire de 40 à 200 acides aminés avec un pli discret qui possède une activité de liaison aux hydrates de carbone et est habituellement contigu au domaine catalytique. Ils n'ont pas d'activité catalytique (Babu et Satyanarayana, 1993). Ils ont une spécificité, on n'ayant pas une affinité avec tous les substrats. Les CBM dégradent des substrats difficilement accessibles, car ils sont suspectés de déstructurer la chaîne de l'amylose qui est assez compacte, puisque les hélices de l'amylose sont assez compactes et rigide, ce qui rend la liaison et l'affinité du substrat avec l'enzyme difficile. Il va déstructurer la structure de l'amylose pour qu'ils puissent se lier avec l'enzyme. Ils permettent aussi à l'enzyme de se fixer au substrat, d'augmenter la concentration de substrat autour de l'enzyme et ainsi d'accroître de deux à cinq fois leur activité (Guillén *et al.*, 2009 ; Cuskin *et al.*, 2012).

Ils ont été classés en familles sur la base de la similarité de séquence d'acides aminés. Le domaine de liaison à l'amidon appartient à sept familles différentes de CBM (CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34, CBM41 et CBM48). Les SBD d' α -amylase sont classés majoritairement dans les familles CBM20 et CBM25. Bien qu'un grand nombre de séquences de SBD bactériennes, d'archées et de champignons soient disponibles à la base de données CAZy; seuls quelques SBD d' α -amylases ont été caractérisés et bien décrits (Guillén *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2012).

Le peptide signal (PS), est la séquence signature reconnue par la machinerie cellulaire pour diriger l'exportation et la sécrétion d'une protéine. De nombreuses études statistiques ont permis de déterminer les caractéristiques principales des PS. Généralement les PS des bactéries à Gram positif ont une longueur moyenne de 32 acides aminés, alors que ceux des eucaryotes et des bactéries à Gram négatif est de 28 acides aminés (Shinde et Inouye, 2000). Nous avons entrepris de produire la forme mature de la protéine, c'est à dire délestée de son peptide d'adressage mitochondrial en N-terminal sur la base de prédictions bioinformatiques. La position du PS des deux séquences protéiques (67 et 65) a été prédite par le logiciel SignalP 4.1 Server, qui est présenté comme l'algorithme le plus fiable d'après une récente étude comparative (Emanuelsson *et al.*, 2001), basé sur la répartition de charge similaire à celles des peptides signaux des bactéries à Gram positif. Leurs séquences ont été omises des séquences protéiques des deux ORFs: l'ORF-28, et l'ORF-3, respectivement :

>NODE-65 ORF-3 (avec le peptide signal 34 aa)

```
MTRTRPRPPARPLAVLVVAAAGLVGLVAAPPATPSPTAPVAAAVESTTTVYYWTKTKNWARYNLHYAPDGGSWT
SVPGTVMEAACTDWVKKTVSLGAAAGLQATFNDGGGTWDNNGGRNYALGTGSVTVKDGVVVAHSDPCADTPPAESR
TATVYYSTASLGWSTANVHYQPTGGAWTTAPGVGMQAACAGWWKREIDLGTATGLKAAFNNNGTWDNNGGSDYA
LGAGVSTVRNRVVTANATDPCAATPPDTPQAPTAPAGLTATADGTSVLLAWNPSTDDRGVTAYQVTRTGGSGGTFV
TDVGSTVFSDTGLAERTAYTYTVRAVDAAGNVSPASSPATATTGDEPAGPANGRPLGTDPRKDPPIYFVLARFHD
GDPSNNRGGSQHAKSGNAANDDPMFRGDFKGLIQKLDYVKGLGFSAIWVTPVVLNRSDYDYHGYHGWDFYKVDPR
LESAGASYQDLIDAHAHAKGMKIYQDVVYNHSSRWGAKGLFTPTVYGVVRSQWSWYYDEKQPGFEYDGLTVPKSG
KSYNGDLWSTAEPGNTCVNWGKPTGGKSAEGYTVYNCQWPSPTSGMFPKDLYHQCWIGNWEGEDSRSCWIHED
LADFNTENPVVQNYLIGAYDKYIDMGVDGFRVDTAVHIPTTWNRRFLPAIQERVAQRHGAEAAKNFFVFEVAA
FVNDKWNRGSVNHSAQFYTWKERKEYALDDGRAALEMYDHEQQRGTGDQPTSNAFLNGNSYHAPDHSRFSGMHV
IDMRMHMNFQDAQNAFNGKSDSDSYNDATYNVVYVDSHDYGPKNSSERYAGGTDAWAENMSLMWTFRGIPTLYY
GSEIEFQKGGKIDCGPSCPLADTGRAYFGAHLAGSVTASDFSAVSSASGTVATTLQQPLVRHVQRLNQIRRAIPA
LQTGGYSTEGVSGMAFKRRYTDAGTDSFALVTVSGGATFTGVPNGTYTDAVTGDVVRTVNTGLTVTAPGKGNLR
VYVLNPGRIGTAGPYLK
```

>NODE-67 ORF-28 (avec le peptide signal 43 aa)

```
HFRQLLATVKSAGGNMARRTVAAALALVAGAAVAVTGNSPVQAAPPGEKDVAVLFEWKFSVAKECTDRLGPAG
YGYVQVSPQEHVQGGQWWTSYQPVSYKIAGRLGDRAAFKSMIDTCHAAAGVKVVVDSVNVHMANGSGTGTGGTTF
SKYDYPGLYSAGDMDDCRAEITNYQDRGNVQNCLEVLHPDLDTGEDHVRGRIAGYLNLLSLGVDGFRIDAAKHM
PAADLANIKSRLTDPGAYWKQEAIHGAGEAVSPSEYLGSGDVQEFRYARDLKRVLQNEKLAYLKNFGEAWGHMPS
GRAGVFDVNDHDERVGDTLVSYKDGANYTLASVFMALWPYGGSPDVHSGYEWTDKDGPPNGGQVNACYSWGKQCQ
AWREISSMVAFRNTARGQAVTDWWDNNGNNAIAFGRGSKAYVAINHESALTRTHQTSLPAGTYCDVQSNNPVTVD
GSGRFTATLGANTALALHVNAKSCGTTTTPPPASTGTSFQATATTVVGQNIHVTGNLAALGNWSPASAPKLDPAAY
PVWKLTLVSLPAGTTFAYKYVRKDAAGNVTWESGANRTATVPASGQLVLDNDFRS
```

2.5. Optimisation des conditions de PCR

La PCR est un outil de diagnostic de routine très utilisé, seul (avec visualisation après migration), ou suivi d'une technique complémentaire de caractérisation de produits amplifiés, tel que le séquençage. Malgré la standardisation de cette méthode, il existe toujours des limites. Le risque de contamination, la présence d'inhibiteurs de PCR, la dégradation des acides nucléiques en cas de mauvais conditionnement, et surtout le risque de mutations au niveau des sites de fixation des amorces, sont autant d'inconvénients auxquels il faut faire face.

Pour cela, lors de notre étude, on a fait une optimisation des conditions de PCR des deux séquences protéiques (ORF-3 ; ORF-28), afin d'obtenir les conditions optimale de la PCR pour chaque Node. Des réactions de PCR ont été réalisées sur l'ADN génomique de la souche 20r avec les couples d'amorces correspondantes à chaque ORF.

- ✓ Les conditions optimales de l'amplification du Node 67 ORF-28 est celles fournit par la PCR-5- utilisant l'enzyme prime Star Max. La PCR-8- utilisant la Phusion high-fidelity a aussi donné de bons résultats pour ce Node. (figure 22. A).
- ✓ Les conditions de la PCR -9- utilisant la prime Star GXL, sont les conditions optimales pour l'amplification du Node 65 ORF-3 (figure 22. B).

Ainsi, la taille attendue des deux gènes 65, 67 est de 2,9 kb et 1,6 kb, respectivement, comme on peut le voir sur le gel de la figure 30. Il semble donc que les séquences codant l' α -amylases aient bien été amplifiées.

Par la suite, on a réalisé une purification des produits PCR du Node 67 à partir du gel d'électrophorèse à l'aide de GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo Scientific. Cette dernière a donné des concentrations d'ADN de l'ordre de :

- ✓ [ADN] Phusion $_{(1/10)} = 4,7 \text{ ng}/\mu\text{L}$
- ✓ [ADN] Phusion $_{(1/100)} = 1,3 \text{ ng}/\mu\text{L}$
- ✓ [ADN] prime Star Max = $6,3 \text{ ng}/\mu\text{L}$

Afin d'obtenir un ADN pure avec une concentration suffisante pour le reste de l'étude, une purification des produits PCR des deux Nodes 67,65 à l'aide de GeneJET PCR Purification Kit, Thermo Scientific , a permis d'obtenir des concentrations d'ADN de l'ordre de :

- ✓ [ADN]₆₇ prime Star Max = 25,9 ng/μL
- ✓ [ADN]₆₇ prime Star Max (1/10) = 91,4 ng/μL
- ✓ [ADN]₆₅ prime Star GXL = 21,1 ng/μL
- ✓ [ADN]₆₅ prime Star GXL (1/10) = 6,8 ng/μL

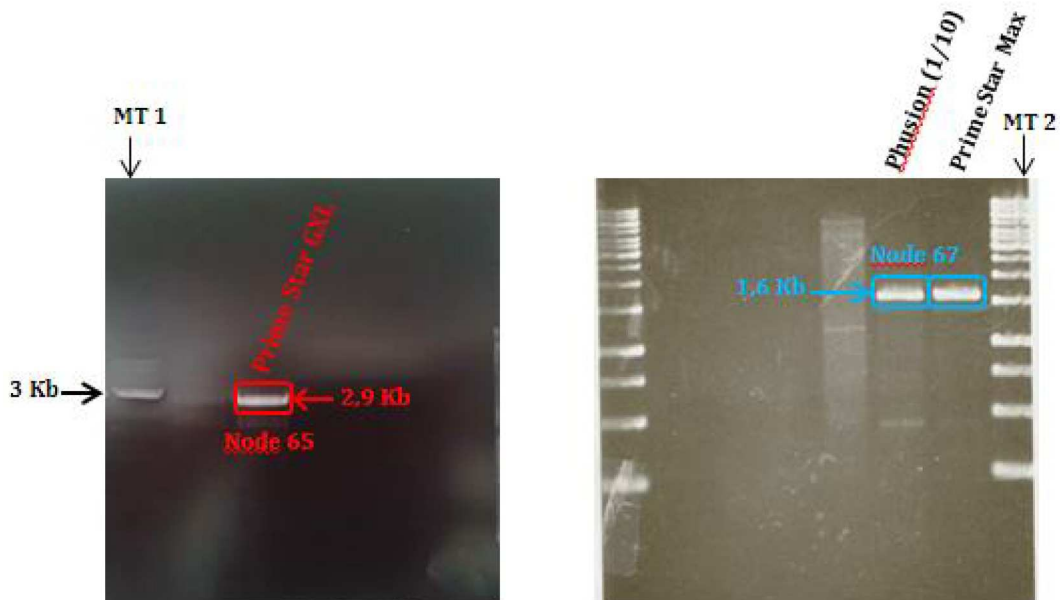


Figure 22: Gel d'agarose après amplification par PCR des séquences codant les α -amylases. (A): Le cadre rouge montre le Node 65 ORF-3 qui fait une taille de 2,9 Kb; (B): Le cadre bleu montre le Node 67 ORF-28 qui fait une taille de 1,6 Kb. (MT) : Marqueur de taille.

3. Clonage des ORFs codant les alpha-amylases

Le génie génétique a été largement utilisé pour le clonage du gène de l' α -amylase produite par différentes souches, principalement chez *E. coli* et *Saccharomyces cerevisiae*. L' α -amylase était l'une des premières protéines adoptées pour les études de biologie moléculaire en raison de nombreuses raisons comme l'existence d'un test d'hydrolyse facile à réaliser, la disponibilité des souches non amylasique, la connaissance de la génétique, la production et la technologie de fermentation de l' α -amylase chez *Bacillus subtilis*.

L' α -amylase est un biocatalyseur important, pour cela, plusieurs tentatives ont été réalisées sur le clonage de gènes codant pour l' α -amylase à partir de plusieurs bactéries et archées dans des hôtes hétérologues tels que *E. coli*, et les gènes codant cette enzyme ont été clonés et caractérisés à partir de certaines espèces de *Streptomyces* spp. (Ahmetagic et Pemberton, 2010 ; Zhibin *et al.*, 2015). Un gène codant pour une α -amylase d'environ 63 kDa de *Streptomyces lividans* TK24 a été exprimé chez *E. coli* (Yin *et al.*, 1997).

Un gène codant pour l' α -amylase de 62 kDa d'un acidophile *Bacillus acidicola* avec une troncature en N et C-terminale a été cloné dans le plasmide pET28a (+) puis exprimé dans *E. coli* (Sharma et Satyanarayana, 2012). Un gène de l' α -amylase digérant l'amidon brut (amyBS-I) avec son peptide signal provenant de la souche de *Bacillus subtilis* AS01a été cloné et exprimé dans *E. coli*. Cette enzyme recombinante a été sécrétée de manière extracellulaire. La production a été multipliée par sept par l'optimisation de la surface de réponse des conditions de culture. Elle a été rajouté en pâte à pain pour l'amélioration de la qualité du pain par rapport au pain additionné d' α -amylase commerciale (Roy *et al.*, 2013). Un autre gène codant pour une amylase (Amy-E) d'*Exiguobacterium* sp.SH3 a été exprimé dans *E. coli* sous la forme d'une protéine étiquetée His-tag fonctionnelle d'environ 53 kDa (Emampour *et al.*, 2015).

Nos α -amylases des deux Nodes caractérisées précédemment présentent des propriétés intéressantes sur le plan de leur résistance à la température et aux pH alcalins ainsi que leur halophilie. Pour identifier les facteurs moléculaires responsables de ces caractéristiques, initier l'étude des relations structure fonction, et éventuellement améliorer davantage ces catalyseurs, nous avons entrepris le clonage des gènes codant ces protéines.

L'objectif de cette étude, est de cloner les deux gènes qui codent pour des α -amylases de différentes tailles, dans le plasmide pET28a(+). Ce dernier, est un plasmide bactérien qui permet l'expression des protéines hétérologues par induction grâce au promoteur T7lac. Il nous permet d'obtenir des protéines étiquetée hexahistidines en N-terminal, puisque généralement la structures des amylases en N-terminal, est en «Flip». Du coup on a pu insérer cette étiquette de 6 histidines en cette position, afin de pouvoir les purifier par la suite. Il contient aussi le gène de résistance à la kanamycine, permettant ainsi la sélection directe des plasmides recombinants.

Le clonage des deux gènes qui codent pour des α -amylases dans le plasmide pET28a(+) a été réalisé. Pour cela, les séquences des deux gènes ont été amplifiées dans leur totalité par PCR avec des couples d'amorces, comprenant des sites de restrictions NdeI en position 5' et SpeI en position 3'.

NB: Les deux concentrations d'ADN après PCR utilisés pour ce clonage sont : de 25,9 ng/ μ L et 6,8 ng/ μ L, pour l'ADN du Node 65 et 67, respectivement.

3.1. Analyse plasmidique par criblage virtuel

Des cartes théoriques simplifiées de la construction attendue des plasmides recombinants (65,67) et du vecteur sont réalisées à l'aide du logiciel Clone Manager Professional 9.2 et sont présentées dans la (figure 23.A, 23.B), respectivement.

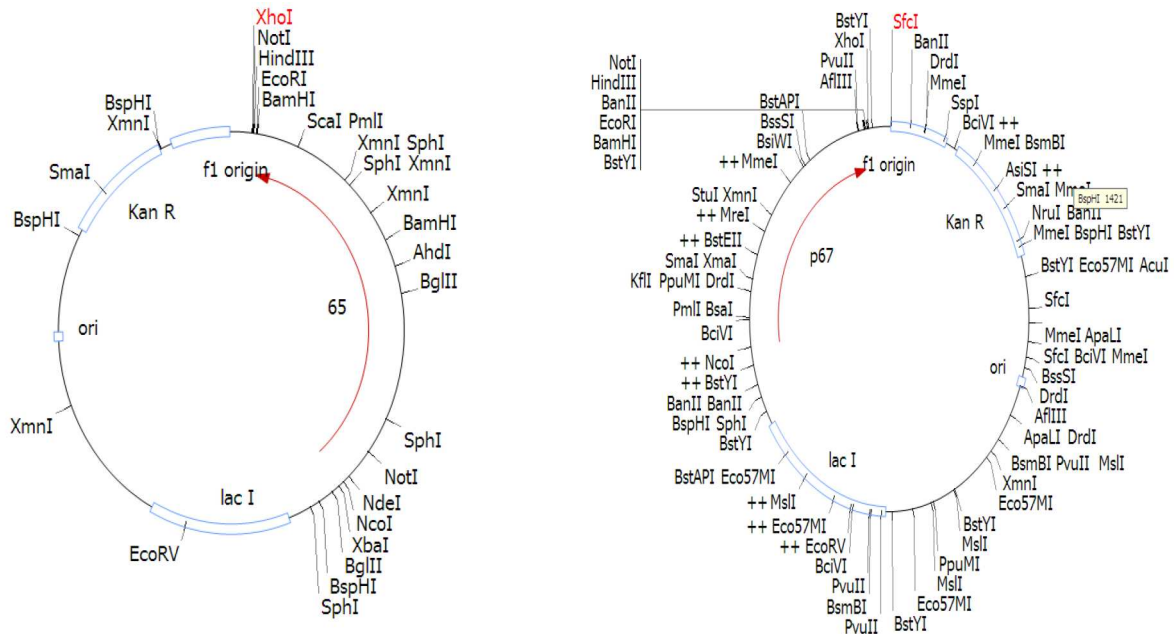


Figure 23. A : Cartographie de restriction théorique des plasmides recombinants attendus de la 65/67

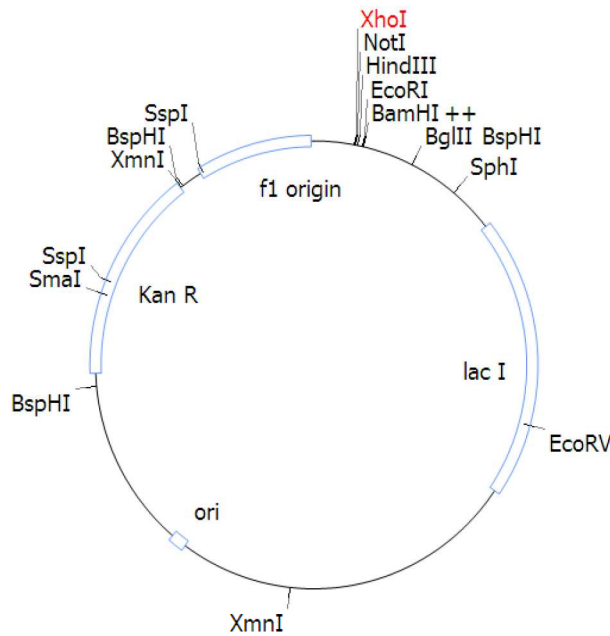


Figure 23. B : Cartographie de restriction du vecteur pET28a

Vecteur pET28a (NdeI/NheI) → 5362 pb } Plasmide recombinants
 Insert Node 65 (NdeI/SpeI) → 2930 pb }

Vecteur pET28a (NdeI/NheI) → 5362 pb } Plasmide recombinants
 Insert Node 67 (NdeI/SpeI) → 1616 pb }

3.2. Analyse plasmidique par digestion de restriction

Les deux gènes ont pu être clonés dans le plasmide pET28a avec succès, une dizaine de clones ont pu être obtenus pour chaque construction à partir de la sélection par l'antibiotique : kanamycine.

Pour contrôler et confirmer l'insertion des deux fragments 65/67 dans les plasmides recombinants, on effectue une digestion enzymatique avec l'enzyme de restriction BglII. Dix clones sont sélectionnés à partir des boîtes de pétri, puis mis en précultures. Des mini-préparations sont effectuées par la suite, pour extraire et purifier les plasmides recombinants. Ces derniers, sont digérés par la BglII pendant 1h à 37°C. L'enzyme de restriction a la capacité de digestion des deux fragments l'insert et le vecteur.

Après digestion enzymatique de l'ADN plasmidique de plusieurs clones, on obtient deux bandes distinctes pour chaque construction comme le montre la (figure 24.A, 24.B), respectivement :

- ✓ Pour les clones positifs de la 65, la taille attendue des deux fragments, après digestion, sont de : 1501 pb et 6793 pb.
- ✓ Pour les clones positifs de la 67, la taille attendue des deux fragments, après digestion, sont de : 1176 pb et 5804 pb.

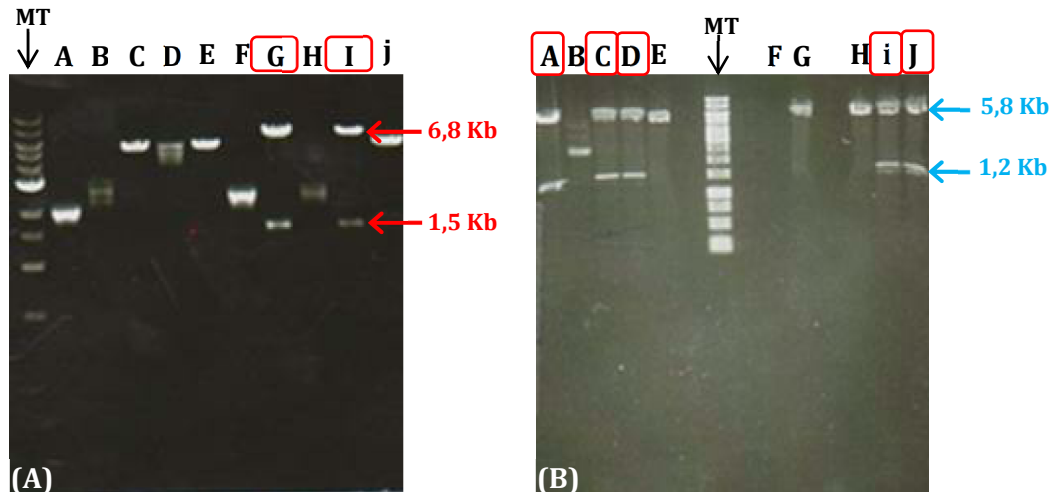


Figure 24 : (A) profil de digestion de l'ADN plasmidique de l'insert 65 avec la BglII (B) profil de digestion de l'ADN plasmidique de l'insert 67 avec la BglII. Les cadres rouges représentent les clones positifs. (MT): Marqueur de taille.

Après vérification sur gel, les deux constructions révèlent une insertion du gène d'intérêt dans le plasmide recombinant avec des tailles de 8,3 kb pour l'insert 65 et de 7 kb pour l'insert 67. Le profil de la digestion enzymatique de l'ADN plasmidique recombinant; nous a permis de constater les deux bandes de la taille attendue pour chaque construction. Pour cela, on a pu sélectionner deux (I et G) et cinq (A, C, D, i, J) clones munis de plasmides recombinants pour les Nodes 65 et 67, respectivement, sur une dizaine de clones positifs analysés, des deux constructions (figure 24).

Les deux constructions plasmidiques ont été vérifiées par séquençage. Pour cela, des mini-préparations des deux plasmides sont réalisées, puis envoyées au séquençage au (GATC, Constance, Allemagne). Les résultats montre qu'il y'a bien eu insertion des deux séquences 65 et 67 dans les plasmides recombinants. Une fois la séquence validée, les tests d'expression ont pu être réalisés.

4. Tests d'expression des protéines recombinantes en système procaryote

Une protéine recombinante peut être produite par des cellules productrices, génétiquement modifiées par l'apport d'un transgène. Le système d'expression est généralement hétérologue : Il s'agit d'une espèce différente de celle produisant la protéine naturelle. La production de telles protéines permet de les purifier et d'en disposer en grande quantité pour les étudier *in vitro*, mais aussi dans un usage médical (antigène) ou industriel (production d'enzymes). Les transgènes sont insérés dans des vecteurs d'expression variés,

selon les organismes hôtes, sous le contrôle de promoteurs inductibles le plus souvent, ce qui réduit la toxicité liée à la surexpression de la protéine recombinante.

Parmi les différents organismes hôtes d'expression disponibles, la bactérie *E. coli* est généralement choisie pour sa facilité de manipulation, sa croissance rapide, sa génétique simple, son faible coût de production, et ces taux d'expression élevés.

4.1. Tests d'expression des α -amylases sur milieu LB chez *E. coli* BL21(DE3)

Les premiers tests de surexpression ont été entrepris dans le but de caractériser l'expression et la solubilité des protéines recombinantes. L'expression des protéines a été effectuée dans le milieu LB, avec des cellules d'*E. coli* BL21 (DE3) compétentes, en présence de 0,5 mM d'IPTG à 37°C pendant 5h sous agitation. Un témoin négatif d'expression a été réalisé en absence d'IPTG. Les cellules ont été lysées par un tampon de lyse (trizmabase 100 Mm pH 8, NaCl 150 mM, lysozyme 0,75 mg/mL), et le lysat protéique ainsi que le surnageant ont été récupérés et analysés par électrophorèse sur gel SDS en conditions dénaturante à 10%.

L'analyse SDS-PAGE de l'expression des deux protéines dans ces conditions est présentée dans la figure 25. Comme le montre cette figure, une large bande de surexpression dont la masse apparente correspond à la masse attendue de 60 kDa pour la 67 et de 100 KDa pour la 65, est observable dans les fractions contenant le culot final et les protéines insolubles. Toutefois, cette bande d'expression n'apparaît pas dans le surnageant de lyse contenant les protéines solubles.

4.2. Tests d'expression des α -amylases sur milieux LB et auto inductible chez *E. coli* BL21 (DE3)

Une diminution de température de 37°C à 20°C a été réalisée. Une première expression des protéines a été effectuée dans le milieu LB, dans des cellules d'*E. coli* BL21(DE3), en présence de 0,5 mM d'IPTG à 20°C toute la nuit. Une seconde expression a été réalisée, cette fois-ci dans un milieu auto-inductible pendant 3 jours à 20°C.

L'analyse SDS-PAGE de l'expression des deux protéines dans ces conditions, montre une importante production de protéine recombinante dans la fraction insoluble, est toujours à la taille attendue pour les deux protéines recombinantes.

4.3. Tests d'expression des α -amylases sur milieu LB chez *E. coli* Rosetta 2 pLysS (DE3)

Afin de trouver les meilleures conditions pour l'expression des protéines, une autre souche d'*E. coli* (Rosetta pLysS (DE3)) a été testée, dans un milieu de culture LB, avec deux conditions d'induction à l'IPTG à 0,5 mM pendant 5 h à 37 °C et toute la nuit à 20°C.

Les extraits cellulaires contenant les fractions solubles et insolubles ont été analysés par SDS-PAGE. La bande d'expression des deux protéines 67 et 65 (60 KDa/ 100 KDa) n'apparaît pas dans le surnageant contenant les protéines solubles.

4.4. Détermination des paramètres d'expression des α -amylases sur milieu LB

L'expression et l'extraction des protéines peuvent être influencées par plusieurs paramètres :

- La température, en effet la température de la culture d'expression peut influencer et améliorer la solubilité des protéines recombinantes en ralentissant le métabolisme bactérien. Une diminution de la température conduit à une réduction des taux d'expression. La diminution de ces niveaux d'expression permet d'une part, de limiter les interactions hydrophobes intermoléculaires qui provoquent l'agrégation, et d'autre part, d'éviter de saturer les systèmes d'assistance au repliement formés par les protéines chaperonnes de *E. coli*.

- L'utilisation des milieux d'auto-induction permettent le contrôle strict du promoteur T7 pendant la croissance via la répression catabolique en présence de glucose comme source de carbone. L'utilisation du glycérol comme source de carbone et du lactose comme inducteur pendant la période de production. Le milieu est tamponné pour compenser l'acidification.

- L'utilisation de souches particulières. Il n'existe pas de souche permettant la solubilisation des protéines, mais parfois quand on change de souche on obtient souvent moins de protéines.

- La quantité d'inducteur, car il faut diminuer au maximum cette quantité pour obtenir une protéine active.

Toutefois, toutes ces techniques visent à diminuer la production, aussi on observe souvent une baisse du rendement.

- Les types de détergents amphiphiles, qui dégradent et perméabilisent les membranes bactériennes, interagissent également avec les surfaces hydrophobes exposées des protéines, et favorisent ainsi leur solubilisation en présentant une extrémité polaire au solvant aqueux.

A l'instar de changement de souches bactériennes, et de milieu de culture, nous avons également réalisé une optimisation d'autres paramètres comme la quantité de l'inducteur

(IPTG), la température d'expression et la nature du détergent utilisé dans le tampon de lyse (Triton X-100), testé a deux concentrations différentes 0,1 % et 1% (v/v).

L'expression des protéines a été effectuée dans le milieu LB, avec les deux souches d'*E. coli* : les BL21 et les Rosetta, en présence de 0,1 mM d'IPTG à 30°C pendant 4h. Un témoin négatif d'expression a été réalisé en absence d'IPTG. Nous avons essayé de recueillir les protéines recombinantes 65/67 dans la fraction soluble, en introduisant un détergent non dénaturant dans le nouveau tampon de lyse (25 mM Tris pH 8, 200 mM KCl, 10% de glycérol, 0,1% et 1% de triton X-100).

L'analyse SDS-PAGE de l'expression des deux protéines dans ces conditions est représentée dans la figure 26. Cette dernière montre que l'induction est faible dans les deux souches. On n'a pas une très grande expression protéique, mais pour autant, on a pu observer une légère bande correspondre à la taille attendue pour les deux séquences 60 kDa pour la 67 et de 100 KDa pour la 65, dans la fraction soluble du lysat contenant une partie des protéines solubles des deux constructions. Une expression protéique a pu être observée dans les cultures non induites pour les clones 65G Rosetta et 65G BL21.

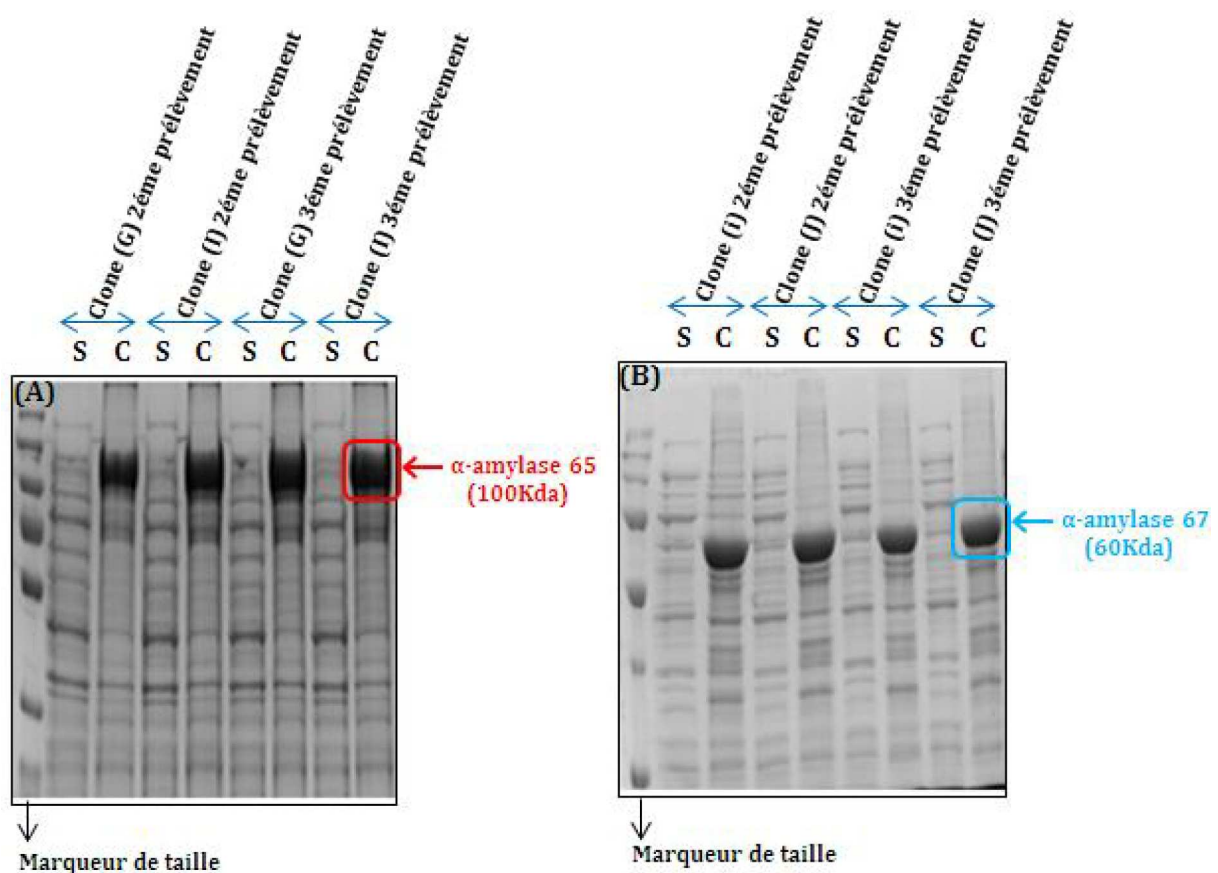


Figure 25 : Gels SDS-PAGE présentant les résultats des tests d'expression, fraction insoluble (culot, C), fraction soluble (surnageant, S). (A) La flèche et le cadre en rouge montre la migration de l' α -amylase 65 à 100 KDa. (B) La flèche et le cadre en bleu montre la migration de l' α -amylase 67 à 60KDa.

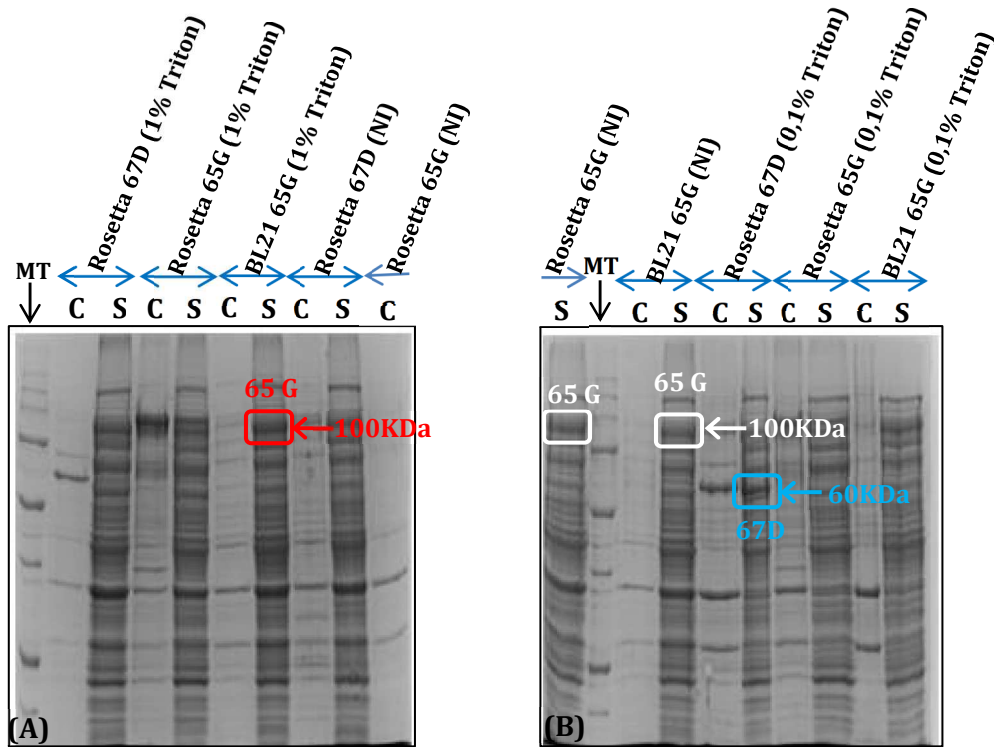


Figure 26 : Gels SDS-PAGE présentant les résultats des tests d’expression, fraction insoluble (culot, C), fraction soluble (surnageant, S). (A) La flèche et le cadre en rouge montre la migration de l’ α -amylase 65 G à 100 KDa. (B) La flèche et le cadre en bleu montre la migration de l’ α -amylase 67 D à 60KDa. Les cadres blancs montrent une expression protéique dans des cultures Non induites (NI).

Malgré une optimisation de quelques paramètres d’expression et d’extraction, et l’obtention d’une partie de nos protéines dans la fraction soluble du lysat, nous en avons conclu que les protéines recombinantes 65/67 sont produites sous forme de corps d’inclusion chez *E. coli*. Des résultats semblables sont représentés dans l’étude de Carlier, (2006). Ce sont des agrégats insolubles composés principalement de protéine recombinante mal repliée et biologiquement inactive. Leur formation est en partie liée au taux d’expression du gène hétérologue dans la bactérie. Ainsi, un taux d’expression trop élevé dans *E. coli*, jusqu’à 50% des protéines totales, favorise les interactions hydrophobes intermoléculaires par rapport aux interactions internes, et empêche le repliement correct de la protéine au profit de la formation d’agrégats (Georgiou et Valax, 1999). Cependant, le fait que la protéine s’agrège en corps d’inclusion a toutefois quelques avantages, elle est protégée de la protéolyse.

5. Purification des protéines recombinantes par chromatographie d'affinité (IMAC)

La purification des α -amylases recombinantes a été facilitée par la présence du tag poly-histidines (6XHis) dans la région N-terminale des enzymes, permettant leur purification en une étape en utilisant une chromatographie d'affinité IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity*) sur colonne à cobalt (Co^{2+}). Le principe de ce type de chromatographie repose sur les interactions ioniques qui se forment entre les ions cobalt et plusieurs noyaux imidazoles de résidus histidines. L'élution de la protéine hétérologue est réalisée par un mécanisme compétitif en ajoutant des quantités croissantes d'imidazole.

La purification par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) a été réalisée (comme décrit dans matériels et méthodes). Les fractions solubles extraites du lysat obtenu des deux clones 65/BL21 et 67/Rosetta, ont été chargées sur résine de cobalt. Toutes les fractions obtenues de la chromatographie d'affinité ont été déposées sur gel SDS-PAGE. Les résultats des gels sont présentés en (figure 27.A ; 27.B et C). Avec ce protocole de purification, il semble que la protéine 65 soit élue lors de la première centrifugation en utilisant le tampon sans imidazole, cela s'explique peut-être par le fait que l'étiquette poly-histidines est cachée (pour des raisons structurales), car la protéine d'intérêt ne va pas interagir avec le cobalt, du coup elle ne sera pas retenue dans la résine. Concernant la protéine recombinante 67, elle semble être restée accroché à la résine, même après élution par l'imidazole, cela peut être dû à un mauvais repliement de la protéine (corps d'inclusion). On conclut que la purification des deux protéines recombinantes n'a pas pu être réalisée.

Le fait que la protéine s'agrège en corps d'inclusion a toutefois quelques avantages, il suffit en effet de purifier les corps d'inclusion par des séries de centrifugations ou par filtration sur filtre de 0,45 μm et par lavage du culot en ajoutant de l'EDTA, des détergents non dénaturants tels que le Triton X-100 ou le desoxycholate ou des détergents dénaturants à faible concentration. Il faut ensuite dénaturer la protéine puis la renaturer pour qu'elle retrouve une structure native en faisant varier les proportions d'agent dénaturant. Techniquement, on ajoute des agents dénaturants, typiquement de l'urée ou des sels de guanidinium, des détergents et un agent réducteur pour couper les ponts disulfures non natifs ou pour éviter qu'ils ne se forment lors de la solubilisation (β - mercaptoethanol ou DTT). Ces agents sont ensuite éliminés soit par dialyse soit en bloquant la protéine sur un gel d'affinité.

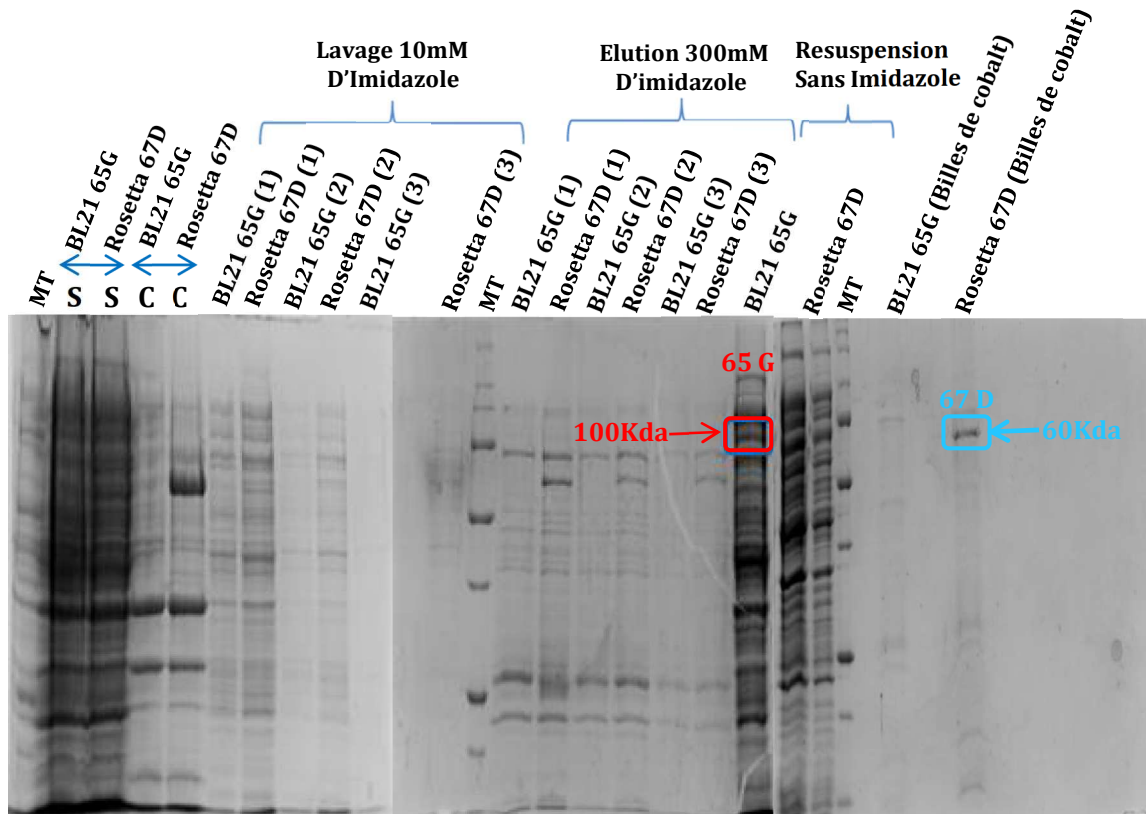


Figure 27: Gels SDS-Page présentant la purification sur résine de cobalt des α -amylases 67/65 après expression dans les souches BL21 et Rosetta. Analyse des fractions de resuspension, de lavage, et d'élution. Le cadre en rouge montre la migration de l' α -amylase 65G à 100 KDa ; et le cadre en bleu montre la migration de l' α -amylase 67D à 60KDa. (MT) : marqueur de taille.

6. Caractères physico-chimiques des déchets d'orange

Les déchets d'orange proviennent de l'UNAJUC, une entreprise de production de jus de Ramdhan Djamel, Skikda. Algérie. Les résultats de l'analyse physico-chimique de la poudre du déchet d'orange sont présentés dans le (tableau 18).

Il ressort que la teneur de la poudre d'orange en glucides est très riche en sucre soluble composée de 43,63%. Ces glucides sont facilement utilisables par le microorganisme pour la fourniture d'énergie rapidement (kirchhoff, 2005). Cette valeur se rapproche de celle trouvé par Rivas *et al.*, (2008) qui ont obtenus des valeurs de 16,9% de sucres dont 3,8% d'amidon. kirchhoff, (2005) indique un pourcentage de 12% de sucre soluble constitués en majorité par du saccharose (40 % du total des glucides) ainsi que par du fructose et du glucose (chacun 30% du total).

Tableau 18 : Composition physico-chimique du déchet d'orange

Composition des oranges	Taux (%)
sucres totaux	43,63
protéines	2,89
pH	3,43
la matière sèche	78,16
humidité	21,84
cendres	95,99
la matière minérale	4,01
l'azote total	4,48
la matière grasse	0,27

Cependant la valeur de l'azote totale (4,48 %) est assez comparable avec celles de Naouel et Cambellas, (1999), avec un taux d'azote de 7,45% qui est relativement élevé par rapport à notre analyse. kirchhoff, (2005) indique que les protides (substances azotées) sont très peu abondants dans l'orange en moyenne 1 %, comme dans tous les fruits à jus.

D'autre part, Les autres constituants énergétiques ne tiennent qu'une place négligeable dans la composition de l'orange ; les lipides (ou matière grasse) sont concentrés dans les pépins, et la pulpe et ne renferme que des traces. Dans notre cas elle est assez faible de l'ordre de 0,27%, ce qui concorde avec celle rapporté par kirchhoff, (2005) avec un pourcentage de moins de 0,2 %.

Il est a noté également la présence d'une bonne quantité de matière minérale 4,01%, cette valeur est semblable à celle de Naouel et Cambellas, (1999) avec une moyenne de 3,64%. L'orange contribue ainsi efficacement à la couverture de l'ensemble du besoin minéral du microorganisme, grâce à son large éventail d'apport (kirchhoff, 2005).

Il a été démontré que les fibres sont assez abondantes dans ces déchets : 1,8% en moyenne. Elles ont l'originalité d'être riches en pectines (environ 50%). On trouve aussi des hémicelluloses et des celluloses (qui constituent la paroi des cellules de l'orange), et quelques traces de lignine (kirchhoff, 2005). Une autre étude a montré que les déchets d'orange

contiennent 42,5% de pectine, 10,5% d'hémicellulose, et 9,21% de cellulose (Rivas *et al.*, 2008)

Notre échantillon de poudre d'orange a une valeur de pH de 3,43 ; ce qui concorde parfaitement avec (Siles et Thompson, 2010) qui indique que le pH des déchets d'orange est compris entre 3 et 4.

Ces valeurs sont à considérer comme des ordres de grandeur, susceptibles de varier selon les variétés, la saison, le degré de maturité, et les conditions de culture.

Pour conclure la richesse des déchets d'orange en sources carbonées en fait un milieu favorable à la culture des microorganismes et à la production des métabolites bioactifs en particulier les enzymes amylolytiques.

7. Optimisation de la production des alpha-amylases

La commercialisation d'une nouvelle industrie enzymatique est généralement limitée au coût élevé du processus de production. Néanmoins, le coût du milieu de culture représente 30 à 40% du coût global de production (Bayoumi *et al.*, 2008). D'un autre côté, le traitement industriel de l'orange, par exemple, la production de jus d'orange génère environ 50-60% de résidus de la masse originale de l'orange. Cette grande quantité de déchets a une teneur élevée en matière organique (95% de la matière sèche), 80-90% d'eau et un pH faible (3-4). Par conséquent une manipulation inappropriée pourrait causer de graves dommages à l'environnement (Siles et Thompson, 2010)

Ces dernières années, l'application des résidus agro-industriels comme source de carbone en industrie enzymatique, a représenté une alternative pour remplacer les matières premières pures et coûteuses. L'utilisation de ces déchets aiderait à résoudre de nombreux problèmes environnementaux (John *et al.*, 2006 ; Santos *et al.*, 2012).

Différentes sources lignocellulosique, telles que les déchets d'orange, d'agrumes, son de blé et de canne à sucre, sont utilisés pour produire diverses enzymes extracellulaires (Techapun *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2003 ; Poorna et Prema, 2007 ; Mohamed *et al.*, 2010 ; Demir *et al.*, 2012). Cependant, la production d' α -amylase à partir de ces substrats n'a été citée que rarement. Bien qu'il existe plusieurs rapports sur la production d' α -amylase extracellulaire par les actinobactéries (Sivakumar *et al.*, 2007), l'optimisation des conditions de culture devrait largement améliorer la production enzymatique.

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

Tableau 19 : Résultats du plan Plackett-Burman de la production d' α -amylase, de biomasse, et de protéines

N° d'essais	Facteurs																							Activité enzymatique (U/ml)	Protéines (g/L)	Biomasse (g/L)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,873	3,06	21,2
2	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1,251	0,63	5,7
3	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	3,237	0,818	2,92
4	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1,132	0,912	3,64
5	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	2,307	0,558	3,38
6	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	1,665	1,238	1,66
7	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	3,133	1,59	3,04
8	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1,757	0,86	4,6
9	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	3,356	3,542	7,1
10	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	0,533	1,709	6,36
11	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0,318	1,688	3,36
12	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	2,127	3,118	14,22
13	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	2,127	3,246	12,58
14	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	0,772	2,189	8,86
15	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	1,529	1,773	2,34
16	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	2,021	3,870	9,92
17	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	5,021	4,146	21,68
18	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	0,930	2,218	9,28
19	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	2,505	3,943	8,1
20	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1,471	3,034	14,58
21	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	4,773	4,379	17,32
22	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	2,013	4,372	17,594
23	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	2,772	4,255	11,22
24	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	8,263	4,357	17,78

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. Les principales approches utilisées pour le criblage et l'optimisation des milieux ont été rapportées par (Parekh *et al.*, 2000). Les techniques statistiques pour la conception expérimentale fournissent un moyen plus précis de concevoir le meilleur milieu (Kar et Ray, 2008). Les conceptions expérimentales statistiques les plus utilisées sont la conception de Plackett-Burman et la conception composite centrée (Broedel *et al.*, 2001). Les avantages des conceptions incluent la simplicité et l'évaluation d'un grand nombre de facteurs sur l'efficacité relative du processus de production.

L'optimisation des conditions de culture de la production d' α -amylase par *Streptomyces sp. erumpens* MTCC7314 sous fermentation submergée a été rapporté par (Kar et Ray, 2007), mais sans utiliser le processus de l'optimisation statistique. Cotârlet *et al.*, (2013) ont rapporté l'utilisation de la conception statistique pour la production d' α -amylase par le *Streptomyces* MIUG 4 Alga psychrotrophique.

Dans notre étude, l'optimisation de la production d' α -amylase par une souche halophile *Streptomyces sp.* (20r) cultivée sur déchet d'orange, en utilisant un plan statistique a été réalisée en deux étapes : la première étant la sélection des variables ayant un effet significatif sur la production enzymatique en utilisant le plan d'expérience de Plackett-Burman (Plackett et Burman, 1946), la deuxième étape consiste à déterminer les optima des paramètres sélectionnés par le plan des composites centrés de Box-Wilson (Box et Wilson, 1951) et de déterminer leurs corrélations par la méthode des surfaces de réponse (RSM).

7.1. Facteurs influençant la production d' α -amylases par *Streptomyces sp.* (20r)

Vingt-trois composants du milieu de culture ont été analysés, en ce qui concerne leurs effets sur la production d' α -amylase par *Streptomyces sp.* (20r). Le protocole de conception expérimentale ainsi que les réponses des différents essais expérimentaux sont consignés dans le (tableau 19). L'adéquation du modèle a été calculée et les variables démontrant des effets statistiquement significatifs ont été examinées pour chaque facteur (tableau 20).

En général, la signification de chaque variable est déterminé comme étant directement proportionnelle au test-*t* et inversement à la valeur *P* (Douglas, 2001 ; Levin *et al.*, 2005 ; Heck *et al.*, 2005).

Tableau 20 : Résultats de l'analyse statistique du plan Plackett-Burman pour la production de l' α -amylase par la souche *Streptomyces* sp. (20r).

Facteurs	α -amylase				Protéines				Biomasse			
	Effets	Valeur- <i>t</i>	valeur- <i>P</i>	Signification de la probabilité	Effets	Valeur- <i>t</i>	valeur- <i>P</i>	Signification de la probabilité	Effets	Valeur- <i>t</i>	valeur- <i>P</i>	Signification de la probabilité
X1 : Déchets d'oranges	2,090	4,023	<0,001	100 %	2,188	7,764	<0,001	100 %	7,923	39,918	<0,001	100 %
X2 : Amidon soluble	0,223	0,429	0,336	66,4	0,554	1,966	0,031	96,9 %	6,203	31,252	<0,001	100 %
X3 : Dummy	0,689	1,326	0,099	90,1 %	0,350	1,242	-	-	0,160	0,806	-	-
X4 : Solution saline	0,085	0,164	0,436	56,4	0,141	0,500	-	-	1,690	8,515	<0,001	100 %
X5 : CaCl ₂	0,143	0,275	0,393	60,7	-0,026	-0,092	-	-	2,214	11,155	<0,001	100 %
X6 : NaCl	1,112	2,140	0,022	97,8 %	0,102	0,362	-	-	4,220	21,261	<0,001	100 %
X7 : Glycérol	-0,701	-1,349	0,905	9,5	-0,493	-1,749	-	-	-2,414	-12,162	-	-
X8 : Taux d'inoculum	0,722	1,390	0,089	91,1 %	-0,164	-0,582	-	-	-1,160	-5,844	-	-
X9 : pH	1,297	2,496	0,01	99 %	-0,205	-0,727	-	-	1,070	5,391	<0,001	100 %
X10 : Tween 80	-0,043	-0,083	0,533	46,7	-0,524	-1,859	-	-	-0,967	-4,872	-	-
X11 : Liqueur Corn Steep	-0,210	-0,404	0,655	34,5	-0,035	-0,124	-	-	-0,797	-4,015	-	-
X12 : Dummy	0,129	0,248	0,403	59,7	-0,119	-0,422	-	-	0,157	0,791	-	-
X13 : Extrait de levure	0,343	0,660	0,258	74,2	-0,328	-1,164	-	-	0,341	1,718	0,05	95 %
X14 : Péptone	-0,683	-1,315	0,899	10,1	-0,371	-1,317	-	-	-0,234	-1,179	-	-
X15 : Tryptone	-0,280	-0,539	0,702	29,8	-0,474	-1,682	-	-	-0,986	-4,968	-	-
X16 : Dummy	0,004	0,008	0,497	50,3	-0,054	-0,192	-	-	-0,311	-1,567	-	-
X17 : Urée	-0,369	-0,710	0,758	24,2	-0,111	-0,394	-	-	-0,096	-0,484	-	-
X18 : Caséine	0,535	1,030	0,157	84,3	-0,173	-0,614	-	-	-0,350	-1,763	-	-
X19 : Dummy	-0,767	-1,476	0,923	7,7	-0,422	-1,497	-	-	-0,103	-0,519	-	-
X20 : Sulfate d'ammonium	0,133	0,256	0,400	60	-0,073	-0,259	-	-	1,294	6,520	<0,001	100 %
X21 : Extrait de viande	-0,714	-1,374	0,909	9,1	0,431	1,529	0,07	93 %	1,064	5,361	<0,001	100 %
X22 : phosphate d'ammonium	-0,199	-0,383	0,647	35,3	0,282	1,001	-	-	2,266	11,417	<0,001	100 %
X23 : Nitrate de sodium	-0,699	-1,345	0,904	9,6	0,519	1,842	0,039	96,1 %	2,180	10,983	<0,001	100 %

La probabilité minimale de signification est de 90%, toutes les variables avec une probabilité de 90% ou plus sont acceptées et considérées comme ayant un effet significatif sur la réponse.

L'analyse de régression démontre que le niveau de réponse (la production d' α -amylase) était significativement affecté par seulement cinq variables indépendantes dont une variable dummy (X3) sur les vingt-trois facteurs testés. Les cinq variables montrant des effets significatifs à $(1 - \alpha) \geq 90\%$ sont : les déchets oranges avec un effet de 2,090 ($p \geq 100\%$) qui est le facteur le plus significatif pour la production d' α -amylase suivie du pH (1,297) ($p \geq 99\%$), NaCl (1,112) ($p \geq 97,8\%$), la taille de l'inoculum du milieu de production (0,722) ($p \geq 91,1\%$) et enfin la dummy (X3) 0,689 ($p \geq 90,1\%$). Alors que la peptone (-0,683) ($p \geq 10,1\%$), le nitrate de sodium (-0,699) ($p \geq 9,6\%$), le glycérol (-0,701) ($p \geq 9,5\%$), et l'extrait de viande (-0,714) ($p \geq 9,1\%$) ont exercés un effet négatif sur la production d' α -amylase.

Cependant dans cette étude les deux variables CaCl_2 et l'amidon qui sont les deux facteurs principaux influençant la production d' α -amylase selon la littérature, n'ont aucun effet sur la production enzymatique estimée à ($p \geq 60,7\%$) (0,143), ($p \geq 66,4\%$) (0,223) respectivement. L'activité la plus élevée (8,263 U/mL) a été trouvée dans l'essai 24, où tous les composants significatifs du milieu (déchets orange, pH, NaCl, taille de l'inoculum) étaient présents et à leurs niveaux les plus élevés, tandis que les essais 10 et 11 présentaient l'activité la plus faible de 0,533 et 0,318 U/mL respectivement. Cela pourrait être lié à l'absence de variables significatives malgré la présence de l'inducteur (amidon) dans l'essai 10.

L'effet des déchets d'orange sur la production de protéines et de la biomasse est positif ($p \geq 100\%$). La variation du pH de 5 à 9 conduit à un effet positif ($p \geq 100\%$) sur la production de biomasse. Au contraire, son effet sur la production protéique est négatif ($p \geq 23,7\%$). Le NaCl ne montre aucun effet sur la production de protéines alors que son effet sur la biomasse est clairement positif ($p \geq 100\%$). La taille de l'inoculum ne montre aucun effet sur la production de protéines et de biomasse. L'addition d'amidon stimule la synthèse protéique et a un effet positif sur la production de biomasse ($p \geq 96,9\%$), ($p \geq 100\%$) respectivement. En ce qui concerne la présence de CaCl_2 , l'effet sur la production protéique n'est pas significatif, alors qu'il a un effet positif sur la production de biomasse ($p \geq 100\%$).

Considérant les résultats obtenus et après exclusion des facteurs non significatifs du modèle ($P > 0,1$) les équations (3), (4), (5) polynomiales réduites peuvent s'écrire comme suit :

7.1.1. Production de l' α -amylase :

$$Y = 2,454 + 2,090 X1 + 1,112 X6 + 0,722 X8 + 1,297 X9 + 0,014 \quad (3)$$

Où **X1**: Déchet d'orange, **X6**: NaCl, **X8**: Taux d'inoculum, **X9**: pH.

7.1.2. Production des protéines :

$$Y = 2,562 + 2,188 X1 + 0,554 X2 + 0,431 X21 + 0,519 X23 + 0,061 \quad (4)$$

Où **X1**: Déchet d'orange, **X2**: amidon, **X21**: extrait de viande, **X23** : Nitrate de sodium.

7.1.3. Production de la biomasse :

$$Y = 9,518 + 7,923 X1 + 6,203 X2 + 1,690 X4 + 2,214 X5 + 4,220 X6 + 1,070 X9 + 0,431 X13 + 1,294 X20 + 1,064 X21 + 2,266 X22 + 2,180 X23 + 0,024 \quad (5)$$

Où **X1**: Déchet d'orange, **X2**: amidon, **X4**: Solution saline, **X5**: CaCl₂, **X6**: NaCl, **X9**: pH, **X13**: extrait de levure, **X20**: Sulfate d'ammonium, **X21**: extrait de viande, **X22**: phosphate d'ammonium, **X23**: Nitrate de sodium.

Lors de notre étude, on a analysé minutieusement le processus statistique de la production d' α -amylase par *Streptomyces* sp. (20r), du point de vue de la recherche d'une composition de milieu de culture efficace à faible coût, afin de soutenir simultanément la croissance de *Streptomyces* sp. et induire la production d' α -amylase.

Les sources de carbone (déchet d'orange, amidon, glycérol, tween 80) jouent un rôle important pour la production enzymatique. Elles ont été introduites dans le milieu de culture sous forme d'inducteurs d' α -amylase. Nos données ont démontré qu'il existe un impact profond imposé par la source de carbone sur la production d' α -amylase de *Streptomyces* sp. (20r). L'analyse révèle que les déchets d'orange comme seule source de carbone, sont le meilleur inducteur d' α -amylase comparable à d'autres sources de carbone synthétique, résultant en des augmentations de 85,17% de la production enzymatique. Le traitement des déchets d'orange est un moyen efficace de mettre en évidence le potentiel élevé de ce résidu sous-utilisé. La biomasse restante après extraction est principalement constituée de lignocellulose, une excellente source de sucre qui favorise la croissance des micro-organismes capables de générer d'autres produits de grande valeur.

Les déchets d'orange agro-industriels semblent être un substrat riche qui pourrait fournir simultanément à la bactérie tous les éléments nécessaires au cours de la croissance bactérienne et de l'induction enzymatique. Cette découverte allège considérablement le coût du milieu de production d' α -amylase. Conformément à nos résultats, les déchets d'orange

étaient le meilleur inducteur de l' α -amylase d'A. *Nidulans* sous fermentation solide (Shahera *et al.*, 2002). Il a aussi été démontré que le zeste d'agrumes pouvait induire une activité élevée de l' α -amylase (Mohamed *et al.*, 2010). Demir *et al.*, (2012) et Embaby *et al.*, (2014) ont rapporté que la production d'une autre enzyme polygalacturonase à partir de *Bacillus licheniformis* SHG10 et *Aspergillus sojae* M3 respectivement, a été testée sur la peau d'orange sous fermentation submergée. L'utilisation de déchets d'orange n'a cependant pas été testée pour la production d' α -amylase par *Streptomyces* sp.

Dans la présente étude, *Streptomyces* sp. (20r) a montré un effet positif, lorsque les déchets orange sont utilisés comme substrat, suivi de l'amidon ; qui n'a aucun effet sur la production d' α -amylase (0,223), mais il a augmenté légèrement la production de 9,08%, sans l'induire de manière significative. Notre résultat est en désaccord avec celui de Narayana et Vijayalakshmi, (2008) qui ont rapporté que l'amidon était le meilleur substrat, montrant une activité enzymatique maximale. Cependant, en accord avec nos résultats, Singh *et al.*, (2011) ont démontré que le D-inositol et le D-sorbitol, se sont avérés être les meilleurs inducteurs pour la production d' α -amylase, suivis par l'amidon.

La synthèse de l' α -amylase nécessite la présence d'amidon, un substrat enzymatique, en raison de son effet inductible (Tani *et al.*, 2000 ; Ray, 2001), et son rôle dans la stabilisation de l'enzyme (Santamaria *et al.*, 1999 ; Aguilar *et al.*, 2000). Cependant, la production d' α -amylase par notre souche était constitutive puisque la biosynthèse de l'enzyme a eu lieu non seulement en présence d'amidon, mais aussi par d'autres sources de carbone dont le déchet d'orange qui a été le meilleur substrat pour la production enzymatique (Rukhaiyar et Srivastava, 1995 ; Mamo et Gessesse, 1999).

Les pH testés (5-9) du milieu initial entraînent des augmentations significatives de 52,85% dans la production d' α -amylase. Ces résultats indiquent clairement la nature alcaline de l'enzyme de la souche 20r. Ce résultat est conforme avec celui de Chakraborty *et al.*, (2009) et Syed *et al.*, (2009) qui ont rapporté que l'enzyme présentait une activité optimale à pH 9,0 de *Streptomyces* sp. D1., et *Streptomyces gulbargensis* respectivement. Notre résultat est en désaccord avec Gangadharan *et al.*, (2008), qui ont trouvé que la synthèse de l'amylase extracellulaire n'est pas affectée par le pH du milieu. En fait, la recherche devrait être axée sur l'isolement d'une amylase alcaline à partir des microbes, car il existe une potentialité énorme des enzymes alcalines dans l'industrie des détergents (Kondepudi et Chandra, 2008).

Les microorganismes haloalcalophiles requièrent non seulement un pH alcalin, mais aussi une forte concentration en sel pour la croissance et la production d'enzymes (Margesin

et Schinner, 2001). Dans notre étude, l'ajout de 6,5% (1,11 M) de chlorure de sodium augmente la production de 45,31%. Les bactéries modérément halophiles qui poussent de façon optimale dans des milieux contenant 3 à 15% de NaCl (Margesin et Schinner, 2001), peuvent être une source d'amylases halophiles. L'activité enzymatique sur une gamme de concentrations de sel (0-4 M) a été observée dans les amylases halophiles de *N. halobia* (Onishi et Sonada, 1979), *Halomonas meridiana* (Coronado *et al.*, 2000), *Bacillus dipsosauri* (Deutch, 2002), *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 (Prakash *et al.*, 2009) et *Halobacterium halobium* (Good et Hartman, 1970). Par conséquent, ils peuvent être utilisés dans de nombreux processus industriels difficiles où des solutions contenant une concentration élevée en sel inhibent de nombreuses conversions enzymatiques (Ventosa et Nieto, 1995).

L'analyse statistique a montré que la taille de l'inoculum est parmi les facteurs les plus importants affectant la production d' α -amylase ; il affecte positivement la production d'enzymes en l'augmentant de 29,42%. Abou-Elala *et al.*, (2009) ont prouvé dans leurs recherches que la taille de l'inoculum était la plus importante des variables affectant la production d'enzymes chez *Nocardiaopsis aegyptia*. La grande importance de la taille de l'inoculum sur la production de l' α -amylase a déjà été rapportée. La taille de l'inoculum a été reconnue comme étant le paramètre le plus important de la production de l' α -amylase par *A. oryzae* (Kammoun *et al.*, 2008). De même, Mulimani *et al.*, (2000) ont rapporté que le volume d'inoculum par gramme de substrat était parmi les paramètres les plus efficaces pour stimuler la production d'amylase par *Gibberella fujikuroi*. D'autre part Gangadharan *et al.*, (2007) démontrent que les intervalles testées d'inoculum n'ont pas entraîné de variation significative de la production d' α -amylase par *Bacillus amyloliquefaciens*.

De nombreux ions métalliques influencent souvent l'activité de l'amylase (De Azeredo *et al.*, 2004 ; Zhu *et al.*, 2007). La plupart des α -amylases sont connues pour être une métalloenzyme calcique (Gupta *et al.*, 2003). Les ions Ca^{2+} et Cl^- sont d'une importance structurale et fonctionnelle pour les amylases. Les ions Ca^{2+} sont connus pour rendre l'amylase résistante à l'attaque protéolytique (Stein *et al.*, 1964), en plus ils sont nécessaires pour le maintien la conformation spatiale de l' α -amylase, jouant ainsi un rôle important dans la stabilité des enzymes (Chessa *et al.*, 1999 ; Pandey *et al.*, 2000, Viswanathan *et al.*, 2001).

Dans cette étude, l'addition de Ca^{2+} n'a eu aucun effet sur l'activité enzymatique, pour autant, l'ion Ca^{+2} n'a montré aucune activité inhibitrice sur le potentiel de la production de l' α -amylase par le microorganisme. Ceci montre clairement que l'amylase provenant de la souche *Streptomyces* sp. (20r) est calcium indépendante. L'amylase indépendante du Ca^{2+} mérite

d'être prise en considération pour la liquéfaction de l'amidon, en particulier dans la fabrication du sirop de fructose (Tonkova, 2006). Un résultat similaire a également été observé avec l' α -amylase de *B. thermooleovrans* (Malhotra *et al.*, 2000), *Streptomyces* MIUG 4 Alga (Cotârlet, 2013), *Streptomyces* sp. ML12 (Sivakumar *et al.*, 2012). Contrairement à Zhu *et al.*, (2007) qui ont démontré que *Streptomyces* sp, suggérant sa nature dépendant du calcium. *Bacillus* sp. L'ANT-6 a également montré une activité accrue en présence d'ions Ca^{2+} (Burhan *et al.*, 2003). Aussi, l'amylase de la bactérie *Alteromonas haloplanctis* a recours à l'ion Cl^- pour avoir une activité catalytique maximale (Feller *et al.*, 1996). Pour ces amylases, l'élimination de l'ion Cl^- conduit non seulement à une diminution significative de leur activité mais aussi à un décalage de leur optimum de pH (Wakim *et al.*, 1969 ; Feller *et al.*, 1996).

Selon la littérature, la source d'azote organique, comme la caséine, la liqueur de maïs et l'extrait de levure ont un avantage sur les sources inorganiques, car ils apportent des oligo-éléments et des ions qui pourraient améliorer la production de l'enzyme (Chakraborty *et al.*, 2012). Dans notre étude, le modèle expérimental de Plackett-Burman a montré que parmi les sources d'azote organique et inorganique, aucune n'a joué un rôle sur la production d'enzymes par rapport aux autres paramètres sélectionnés. Toutes les sources d'azote ont exercées un effet négatif sur la production d' α -amylase, alors que la caséine, l'extrait de levure et le sulfate d'ammonium ; n'ont eu aucun effet (0,535, 0,343, 0,133) respectivement. Ces résultats peuvent s'expliquer, par le fait que les déchets d'orange fournissent une source d'azote, suffisante à la croissance bactérienne et, par conséquent, à la production enzymatique (souci *et al.*, 1994).

D'autre part, il est probablement dû à la quantité excessive de sources d'azote, qui peut inhiber la production d'enzyme lorsque la concentration dépasse une valeur critique (Alam *et al.*, 1989 ; Pedersen et Nielsen, 2000). Cette diminution peut également être provoquée par l'addition simultanée de deux sources d'azote complexes (Mctigue *et al.*, 1994). Selon l'analyse des résultats, nous pouvons conclure que les microorganismes nécessitent un faible taux d'azote pour produire des enzymes car l'azote peut être un facteur limitant (Baig *et al.*, 1984 ; Mctigue *et al.*, 1994 ; Pedersen et Nielsen, 2000). Ce qui est en désaccord avec Chakraborty *et al.*, (2012) qui suggèrent que la présence de toutes les sources d'azote, organiques et inorganiques, favorisait la croissance et la production d'amylase dans la souche A3 de *Streptomyces*.

Lors de notre étude, on a constaté qu'une dummy avait un effet significatif avec une probabilité de ($p \geq 90\%$). Les effets des variables dummies doivent être égaux à Zéro. Les valeurs trouvées peuvent être expliquées par le fait que dans les matrices d'expérience de Plackett-Burman vue l'ordre élevé du fractionnement, les effets simples sont confondus avec des interactions d'ordre deux et plus. Donc La dummy significative peut être confondue avec une interaction à effet significatif, ou bien elle est due vraiment à des erreurs lors des mesures ou des dosages effectués.

Tableau 21 : Matrice du plan composite centré de Box et Wilson à quatre facteurs, avec l'activité amylolytique de la souche *Streptomyces* sp. (20r) comme réponse.

N° d'essai	X1 (déchet d'orange)	X2 (NaCl)	X3 (Inoculum)	X4 (pH)	Activité Amylasique (U/mL)		Biomasse (g/L)	Protéines (g/L)
					Observée	Prédite		
points factoriels								
1	-1	-1	-1	-1	5,581	6,448	20,140	2,490
2	1	-1	-1	-1	5,473	6,892	31,840	3,510
3	-1	1	-1	-1	5,513	6,880	23,460	2,270
4	1	1	-1	-1	6,944	8,373	33,540	3,349
5	-1	-1	1	-1	5,184	7,303	21,740	1,910
6	1	-1	1	-1	6,772	8,024	35,820	3,343
7	-1	1	1	-1	5,184	6,064	24,640	2,296
8	1	1	1	-1	6,332	7,834	38,800	3,480
9	-1	-1	-1	1	5,614	5,799	25,720	2,643
10	1	-1	-1	1	6,487	7,323	36,480	3,686
11	-1	1	-1	1	6,041	6,504	23,460	2,353
12	1	1	-1	1	9,509	9,078	43,800	3,606
13	-1	-1	1	1	5,299	5,585	21,120	2,594
14	1	-1	1	1	7,067	7,387	38,280	3,528
15	-1	1	1	1	4,352	4,620	21,160	2,505
16	1	1	1	1	6,623	7,471	37,940	3,702
Points étoiles								
17	-2	0	0	0	3,071	1,555	10,320	1,484
18	2	0	0	0	6,735	4,849	25,340	3,985
19	0	-2	0	0	10,483	8,543	24,880	2,610
20	0	2	0	0	10,521	9,059	28,560	2,658
21	0	0	-2	0	10,929	9,563	29,860	3,011
22	0	0	2	0	10,847	8,811	28,480	2,722
23	0	0	0	-2	10,929	7,213	24,320	2,722
24	0	0	0	2	5,886	6,200	52,300	3,207
Points centraux								
25	0	0	0	0	12,757	11,424	40,900	3,114
26	0	0	0	0	10,945	11,424	39,800	2,750
27	0	0	0	0	11,408	11,424	39,200	2,949
28	0	0	0	0	10,586	11,424	27,420	2,842

7.2. Détermination des optima

Le plan composite centré (CCD) de Box et Wilson (1951) combiné à la méthodologie de surface de réponse (RSM) a été appliqué pour déterminer les niveaux optimaux des quatre variables sélectionnées par le plan de Plackett et Burman. Un total de 28 essais avec une combinaison différente de concentration de déchets d'orange (X1), de NaCl (X2), de taille d'inoculum (X3) et de pH (X4) ont été consignés dans le (tableau 21). Les réponses observées et prédites des 28 expériences sont également présentées dans le (tableau 21).

Afin d'évaluer la relation entre variables dépendantes et indépendantes, et de déterminer la production optimale d' α -amylase correspondante aux niveaux optimaux des facteurs, une analyse de régression multiple est appliquée sur les données expérimentales (tableau 22), ce qui nous a permis d'écrire le modèle polynomial de second degré proposé dans l'équation (6).

$$Y = 11,424 + 0,824 X_1 + 0,129 X_2 - 0,188 X_3 - 0,253 X_4 - 2,056 X_1^2 - 0,656 X_2^2 - 0,560 X_3^2 - 1,180 X_4^2 + 0,262 X_1X_2 + 0,0694 X_1X_3 + 0,270 X_1X_4 - 0,418 X_2X_3 + 0,0684 X_2X_4 - 0,267 X_3X_4 \quad (6)$$

Où Y est la réponse prédite de l'activité amylolytique (U/mL) et X1, X2, X3, X4 sont les valeurs codées indiquant la concentration du déchet d'orange, la concentration de NaCl, la taille de l'inoculum et le pH, respectivement.

D'après le tableau 22, seuls les termes quadratiques (X_i^2) des différents facteurs et le facteur X1 présentent des effets significatifs sur la production d' α -amylase, ce qui est confirmé par l'analyse de la variance (ANOVA) (tableau 23). Cette dernière donne pour le test de FISHER (F) concernant le modèle quadratique une valeur de 7,0253. La probabilité attachée à cette valeur si la production d' α -amylase n'était pas liée à l'ensemble des termes quadratique des quatre régresseurs, est si faible 0,003066 % que la production leurs est liée.

Une seconde analyse de régression multiple (tableau 24) a été appliquée sur les données expérimentales, en ignorant les termes dont les effets ne sont pas significatifs. Ce qui a donné une seconde équation polynomiale du second degré (7), pour expliquer la production d' α -amylase par *Streptomyces* sp. (20r) :

$$Y = 11,424 + 0,824 X_1 - 2,056 X_1^2 - 0,656 X_2^2 - 0,560 X_3^2 - 1,180 X_4^2 \quad (7)$$

Les valeurs du coefficient de détermination (R^2) fournissent une mesure de la variation des valeurs de réponse observée pouvant être expliquée par les facteurs expérimentaux et leurs interactions. Par conséquent, l'ajustement du modèle a été vérifié par R^2 , qui a été évalué

à 0,7258, indiquant que 73% de la variation de la réponse pourrait être expliquée par le modèle. Selon Vimal *et al.*, (2015), le coefficient de détermination est une mesure globale pour la qualité du modèle. Le R^2 prédit concorde avec le R^2 ajusté indiquant un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites pour la production enzymatique (Bari *et al.*, 2009).

L'analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle réduit (tableau 25) confirme les résultats de R^2 et le Test F de Fisher avec une valeur très faible, ce qui indique que le modèle est très significatif (tableau 25) et adéquat pour la production de l'enzyme chez *Streptomyces* sp. (20r).

L'erreur résiduelle dans l'analyse de régression est la somme de deux erreurs : une erreur pure due à l'incohérence des données expérimentales et le manque d'ajustement (lack of fit) des données du modèle polynomial. L'erreur pure dépend de l'écart entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites de la réponse. Le test du manque d'ajustement, mesure l'échec du modèle, il représente les points exclus de la régression (Rajagopalan et Krishnan, 2009). Le $-F$ du manque d'ajustement (3,4209) avec une probabilité égale à 0,169 est non significatif (tableau 25), ce qui renforce la confiance dans le modèle et, par conséquent, reflète sa qualité, ce qui suggère que les données expérimentales obtenues ont été ajustées avec précision par le modèle.

Il est important de savoir si le degré du modèle ajusté est correct. L'ANOVA fournit des outils statistiques pour évaluer les hypothèses. Dans ce contexte, l'acceptation ou le rejet de l'hypothèse nulle dicte le niveau de signification de chaque facteur (Walpole *et al.*, 2007). L'absence de test d'adéquation établit les hypothèses suivantes: H_0 : Il n'y a pas de manque d'ajustement linéaire, de sorte que le modèle correspond bien aux données. H_1 : Il y a un manque d'ajustement linéaire, donc le modèle ne correspond pas aux données (Tiznado *et al.*, 2012).

La signification de chaque coefficient a été déterminée par les valeurs- t de Student et leurs probabilités qui sont énumérées dans le (tableau 22 et 24). Les valeurs- P ont été utilisées pour vérifier la signification de chacun des coefficients, qui à leur tour sont nécessaires pour comprendre les interactions mutuelles entre les variables. Plus l'amplitude de la valeur du test- t est grande et plus la valeur de P tend vers 0 ($P < 0,1$) indique la signification du coefficient correspondant, ainsi les variables ayant des coefficients négligeables ont été omises (Karthikeyan *et al.*, 1996). La valeur P du modèle, selon l'ANOVA, était de (0,000), ceci indique que le modèle construit était significatif et que les variables inclus dans ce modèle avaient un effet important sur la production d' α -amylase. On peut voir à partir du degré de signification que

seulement cinq des quatorze termes du modèle ont montré un effet significatif sur la production d' α -amylase (tableau 22). Les valeurs- p pour les termes significatifs étaient de 0,000 et 0,012 pour les effets quadratiques de X1 et X4, suivi de l'effet linéaire de X1 avec une probabilité de 0,065 et finalement les effets quadratiques de X2 et X3 avec des valeurs de 0,133 et 0,194 respectivement, ce qui signifie qu'ils peuvent agir comme des facteurs limitant, et une faible variation de leur valeur va modifier le taux de production enzymatique.

L'interaction entre (concentration des déchets d'orange et la taille de l'inoculum), (NaCl et pH) a montré les effets négatifs les plus élevés. La valeur de probabilité du coefficient de l'effet de l'interaction de (X1 X3) et (X2 X4) a été très élevée 0,892 et 0,893, respectivement (tableau 22), ce qui indique que seulement 10,8% et 10,7% du modèle a été affecté par ces interactions de variables par conséquent, cela n'a pas affecté de manière significative le rendement en α -amylase.

Les déchets d'orange ont été introduits dans le milieu de fermentation comme seuls inducteurs de l' α -amylase. Nos données démontrent qu'il existe un profond impact des effets linéaires et quadratiques (X1, X1²) imposés par la source de carbone sur la production d' α -amylase à partir de *Streptomyces* sp. (20r). Le résultat actuel est en désaccord avec celui de Demir *et al.*, (2012) ; Embaby *et al.*, (2014), qui ont rapportés que l'effet linéaire et quadratique des déchets d'écorces d'orange se révélait être des termes insignifiants sur la production d'enzymes.

Parmi les paramètres physico-chimiques, le pH du milieu joue un rôle important notamment, dans les changements morphologiques du microorganisme et les caractéristiques de leur métabolisme, et donc, pour la biosynthèse de métabolites. Notre étude démontre que le rendement enzymatique a été affecté de manière significative par la forme quadratique du pH (X4²) dans une gamme allant de 7 à 11. Nos données sont en accord avec Kar et Ray (2008), qui ont rapporté que pour la production de l' α -amylase de *Streptomyces erumpens* MTCC 7317, l'effet quadratique du pH était significatif.

Les microorganismes haloalkalophiles nécessitent non seulement un pH alcalin, mais aussi un fort taux de sel pour la croissance et la production d'enzymes (Margesin et Schinner, 2001). Il était évident d'après les résultats que l'effet quadratique du chlorure de sodium (X2²) était significatif pour la production d' α -amylase. Sivakumar *et al.*, (2012) rapportent un résultat similaire de la production d' α -amylase par *Streptomyces* sp. ML12.

La faible taille de l'inoculum peut nécessiter plus de temps pour la multiplication microbienne et l'utilisation du substrat pour produire le métabolite désiré. D'autre part, un inoculum élevé conduirait à la prolifération rapide de la biomasse microbienne. Ainsi, un équilibre entre la biomasse proliférante et l'utilisation du substrat devrait produire une activité maximale (Ramachandran *et al.*, 2004). Dans notre cas, la forme quadratique de la taille de l'inoculum (X_3^2) dans un intervalle de 5 à 15% d'inoculum s'est révélée significative sur le rendement de l' α -amylase.

Tableau 22 : Effets estimés des variables et coefficient de régression de la production de l' α -amylase par la souche *Streptomyces*. Sp (20r)

Variables	effets	Coefficients de régression	Valeur-t	Valeur-P
Constante	11,424	11,424	11,3957	0,000
X1	1,647	0,824	2,013	0,065
X2	0,258	0,129	0,315	0,758
X3	-0,376	-0,188	-0,460	0,653
X4	-0,506	-0,253	-0,619	0,547
X1²	-4,111	-2,056	-5,022	0,000
X2²	-1,311	-0,656	-1,602	0,133
X3²	-1,119	-0,560	-1,367	0,194
X4²	-2,359	-1,180	-2,882	0,012
X1 X2	0,525	0,262	0,523	0,610
X1 X3	0,139	0,069	0,139	0,892
X1 X4	0,540	0,270	0,539	0,599
X2 X3	-0,835	-0,418	-0,833	0,419
X2 X4	0,137	0,068	0,137	0,893
X3 X4	-0,534	-0,267	-0,532	0,603

$R^2 = 0,72588$; R^2 ajusté = 0,43067.

Tableau 23 : Analyse de la variance pour l'activité amylolytique du plan composite centré.

Modèle	dl	SC	MC	Valeur-F	Valeur-P
Linéaire	4	19,068	4,7669	1,1858	0,362480
Interaction carré	6	6,351	1,0586	0,2633	0,944496
Erreur résiduelle	13	52,259	4,0199		
Lack of fit	10	49,550	4,9550	5,4876	0,093958
Erreur pure	3	2,709	0,9029		
X1	1	16,280	16,280	5,277	0,033
X2	1	0,399	0,399	0,129	0,722
X3	1	0,848	0,848	0,275	0,605
X4	1	1,538	1,538	0,498	0,488
X1²	1	101,405	101,405	32,873	0,0000
X2²	1	10,321	10,321	3,345	0,083
X3²	1	7,507	7,507	2,433	0,135
X4²	1	33,384	33,384	10,822	0,003
Erreur	19	58,61	3,084		

SC: somme des carrés; dl: degré de liberté; MC: moyenne des carrés; $R^2 = 0,73$; R^2 ajusté = 0,56312.

Tableau 24 : Effets estimés des variables et coefficient de régression de la production de l' α -amylase du modèle réduit

Variables	effets	Coefficients de régression	Valeur-t	Valeur-P
Constante	11,424	11,424	13,6768	0,000
X1	1,647	0,824	2,415	0,024
X1 ²	-4,111	-2,056	-6,028	0,000
X2 ²	-1,311	-0,656	-1,923	0,067
X3 ²	-1,119	-0,560	-1,640	0,115
X4 ²	-2,359	-1,180	-3,459	0,002

$R^2 = 0,67794$; R^2 ajusté = 0,60475.

Tableau 25: Analyse de la variance pour l'activité amylolytique du plan composite centré du modèle réduit

Modèle	SC	dl	MC	Valeur-F	Valeur-P
X1	16,2806	1	16,2806	18,0306	0,023927
X1 ²	101,4050	1	101,4050	112,3050	0,001795
X2 ²	10,3212	1	10,3212	11,4306	0,043062
X3 ²	7,5071	1	7,5071	8,3140	0,063353
X4 ²	33,3840	1	33,3840	36,9724	0,008931
Lack of fit	58,6884	19	3,0889	3,4209	0,169586
Erreure Pure	2,7088	3	0,9029		
Total SC	190,6417	27			

$R^2 = 0,67794$; R^2 ajusté = 0,60475.

7.3. Graphiques de Pareto

Le diagramme de Pareto (figure 28) permet de représenter graphiquement les résultats de l'analyse du plan. Ils ont été confirmés par ce dernier qui illustre l'ordre de signification des variables affectant la production d' α -amylase dans la conception composite centrée.

Les effets qui apparaissent les plus significatifs, sont ceux du facteur déchet d'orange ainsi que les effets quadratiques des quatre facteurs (déchets orange, NaCl, taille d'inoculum et pH) sur la production de l' α -amylase par la souche *Streptomyces* sp. (20r).

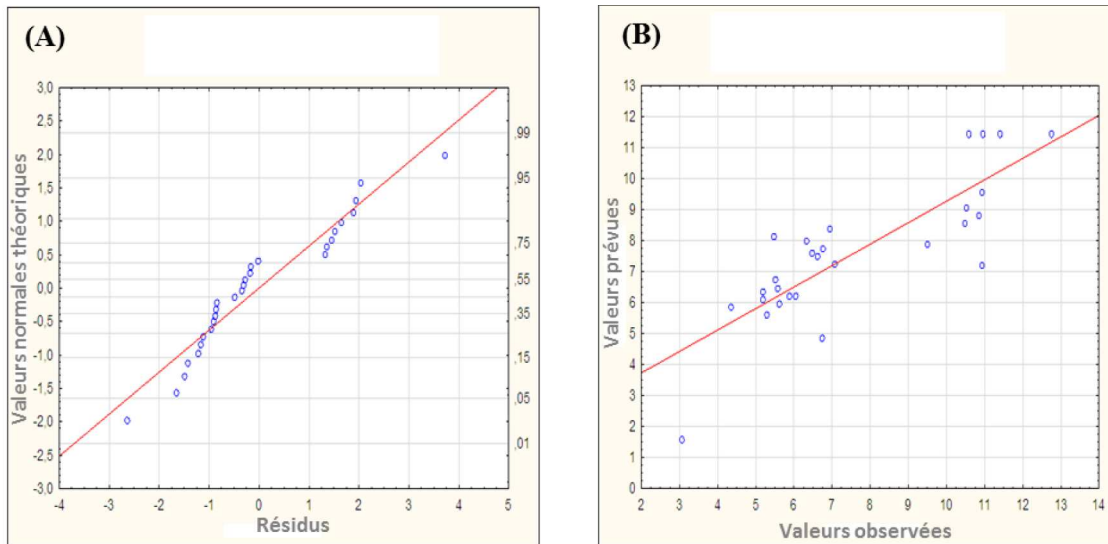


Figure 29 : (A) Le graphique de probabilité normal des résidus. (B) Le graphique de parité de la distribution des valeurs expérimentales par rapport aux valeurs prédites de l' α -amylase.

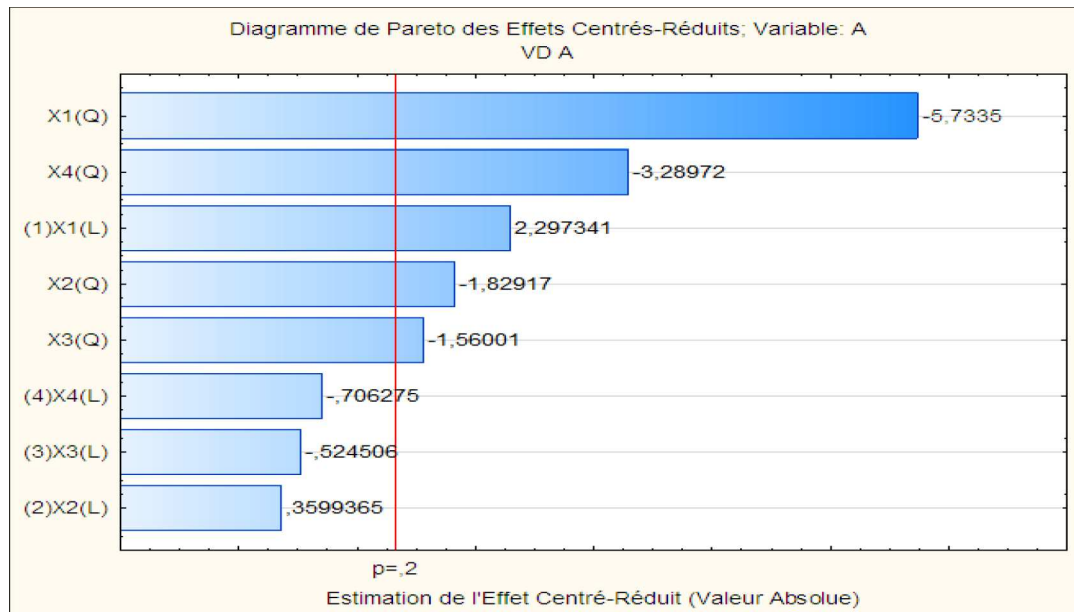


Figure 28 : Représentation du graphique de Pareto des effets des différents facteurs sur la production de l' α -amylase par *Streptomyces* sp. (20r)

7.4. Graphique de parité

Il est nécessaire de vérifier le modèle ajusté pour s'assurer qu'il fournit une approximation adéquate du système réel.

La figure 29 A, montre le diagramme de probabilité normal des résidus, qui est un outil de diagnostic important pour détecter et expliquer les écarts systématiques par rapport aux hypothèses. Les résidus ont été tracés par rapport aux valeurs normales attendues du modèle. Le tracé de probabilité normal des résidus montre les points proches d'une ligne diagonale ; par conséquent, les erreurs sont normalement distribuées et sont indépendantes les unes des autres, et les variances d'erreur sont homogènes. Cela indique que le modèle était bien adapté aux résultats expérimentaux. Comme les résidus du modèle ajusté sont normalement distribués, toutes les hypothèses majeures du modèle ont été validées.

La figure 29 B présente un graphique des valeurs prédites par rapport aux valeurs expérimentales de la réponse, montrant une corrélation satisfaisante entre les valeurs expérimentales et prédites. Les points se regroupent autour de la ligne diagonale indiquant le bon ajustement du modèle, puisque la déviation entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites étaient moindre.

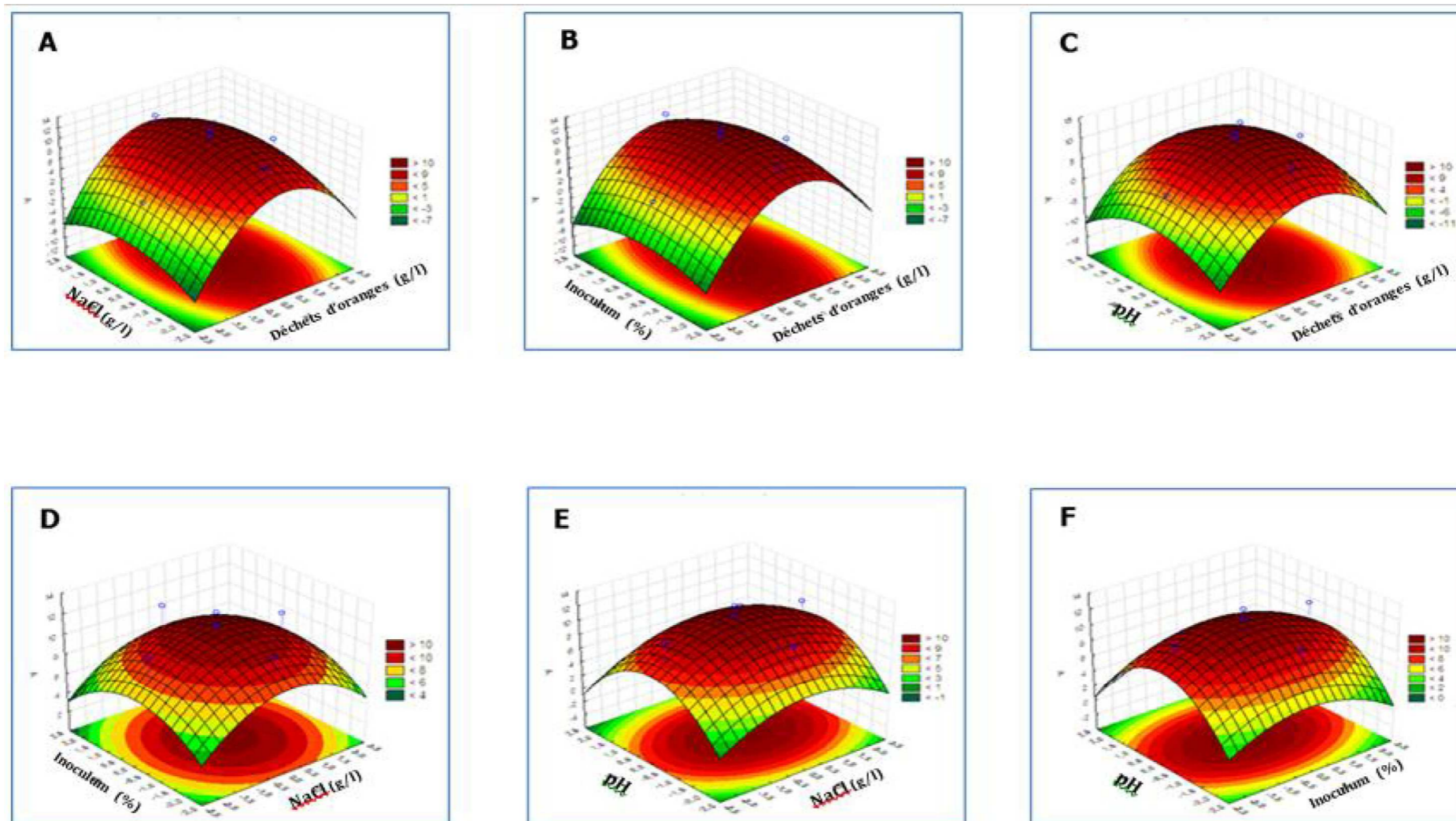


Figure 30 : Tracé des surfaces de réponse de l'activité amylolytique de la souche *Streptomyces* sp. (20r)

7.5. Tracé des surfaces de réponse (RSM)

Les courbes de surface de réponse tridimensionnelles et les courbes de contour correspondantes ont été tracées pour déterminer le niveau optimal de chaque variable (concentration de déchets orange, NaCl, taille d'inoculum et pH) pour lesquels la réponse a été maximisée et l'effet de leurs interactions sur la réponse (activité d' α -amylase) (figure 30).

Généralement, les surfaces de réponse sont basées sur le modèle, en maintenant deux variables indépendantes constantes à leur niveau central, en faisant varier les deux autres variables indépendantes dans le domaine. Par conséquent, six surfaces de réponse ont été obtenues en considérant toutes les combinaisons possibles. La forme des courbes de surface de contour correspondantes indique que les interactions réciproques entre les variables indépendantes sont significatives, par conséquent, les interactions entre deux facteurs pourraient apparaître comme un effet antagoniste ou comme un effet synergique

Les surfaces de réponse obtenues étaient de nature concave, suggérant qu'il y avait des conditions de fonctionnement optimales bien définies. La figure 30.D montre l'effet de l'interaction de la taille de l'inoculum et du chlorure de sodium sur la production d' α -amylase. La production maximale d' α -amylase a été obtenue au niveau intermédiaire de chaque facteur à un niveau moyen constant de l'autre facteur. L'augmentation supplémentaire de ces facteurs au-dessus du niveau intermédiaire, ou décroissante en dessous, a montré une diminution progressive du rendement. La forme de la courbe de surface de réponse montre une interaction modérée entre ces variables testées.

La figure 30. (A, .B, .C, .E. et F), représente les interactions entre les quatre facteurs: concentration de déchets d'orange, NaCl, taille de l'inoculum et pH. Les diagrammes de surface du contour montrent que l'activité enzymatique varie significativement lorsque la concentration des déchets d'oranges et le pH et augmentent jusqu'à atteindre leur valeur maximale, confirmant ainsi son influence majeure sur la production d' α -amylase alors que les effets de NaCl et d'inoculum semblent faibles. Suggérant que toutes les interactions entre ces paramètres étaient assez indépendantes les unes des autres.

7.6. Validation du modèle expérimental

Les optima des facteurs utilisés sont obtenus par le calcul des dérivées partielles de l'équation (6), ce qui permet de déterminer les coordonnées codées optimales qui sont ensuite convertis en valeurs réelles traduisant les valeurs optimales des quatre facteurs retenus (tableau 26).

Tableau 26 : Coordonnées codées des optima des facteurs étudiés et leurs valeurs réelles

	X1(déchet d'orange)	X2 (NaCl)	X3(inoculum)	X4 (pH)
valeurs codées optimales	0,206	0,207	-0,220	-0,053
valeurs réelles optimales	16,03%	6,60%	9,45%	8,95

Afin de déterminer la précision du modèle et de confirmé les résultats d'optimisation, l'expérience a été réalisée dans les conditions optimales de la culture prédites par le modèle : une concentration du déchet d'orange de 16,03 % et 6,60 % de NaCl, une taille d'inoculum de 9,45 % et un pH de 8,95. Lors de ces conditions, la valeur optimale de production de l' α -amylase par *Streptomyces* sp. (20r) a atteint 12,19 U/mL. Ce qui est en étroit accord avec la valeur prédite par le modèle statistique, qui évalue l'activité amylolytique à 11,55 U/mL.

8. Cinétique de production d'alpha-amylases par *Streptomyces* sp. (20r)

La cinétique de croissance et de production de l' α -amylase par *Streptomyces* sp. (20r), sur milieu optimisé à base de déchets d'orange est montrée dans la (figure 31.A).

La plupart des espèces d'actinomycètes ont une croissance lente, mais d'après la figure 31.A, la phase de latence paraît relativement courte, ceci est probablement dû au fait que l'ensemencement du milieu provient d'une pré-culture de 4 jours. Cet inoculum a permis aux bactéries de mieux s'adapter à leur nouveau milieu.

L'activité enzymatique a commencé au début de la phase exponentielle et a montré une augmentation rapide à partir de 72 h, après quoi, il y a eu une augmentation drastique jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance, où elle a atteint un pic au 5ème jour. Cependant, on remarque une diminution rapide de l'activité de l' α -amylase au début de la phase stationnaire. Cela peut s'expliquer par un taux élevé de biomasse, ce qui conduit à une diminution de la production enzymatique, notamment en raison de la forte accumulation de substances toxiques, de la réduction de l'oxygène dissous, et de l'épuisement des nutriments (Rahman *et al.* 2005). Le pic observé de l'activité enzymatique, au 11ème jour, pourrait

correspondre à l'autolyse rapide des bactéries, ce qui conduit à la libération de sucre qui se trouvait à l'intérieur de cette dernières. Aussi l'augmentation de la période d'incubation pourrait induire des changements de conformation dans la structure 3D de l'enzyme affectant ainsi l'affinité avec son substrat (Singh *et al.*, 2014). Cela, indique clairement que l'activité de l' α -amylase dépend de la phase de croissance et de son rôle prédominant dans le métabolisme primaire. Des rapports similaires sur la production d'amylase par les actinomycètes ont été rapportés (Chakraborty *et al.*, 2009 ; Acharyabhatta *et al.*, 2013). En revanche, *Streptomyces* sp. MSC702 a montré une production maximale d' α -amylase en début de phase exponentielle de croissance avec une diminution drastique de la production d'enzyme en fin de la phase de croissance ou en début de la phase stationnaire. Dans ce cas, la production d' α -amylase par la souche *Streptomyces* sp. MSC702 était indépendante de la phase de croissance (Singh *et al.*, 2012).

La courbe de la production protéique est assez concomitante à la courbe de la production enzymatique. Concernant la consommation des sucres, le fait qu'il y'a un déclin drastique dans le taux de sucre, synonyme d'appauvrissement du milieu de culture, et qui est contraire à la production enzymatique (figure 31.B ; 31.C).

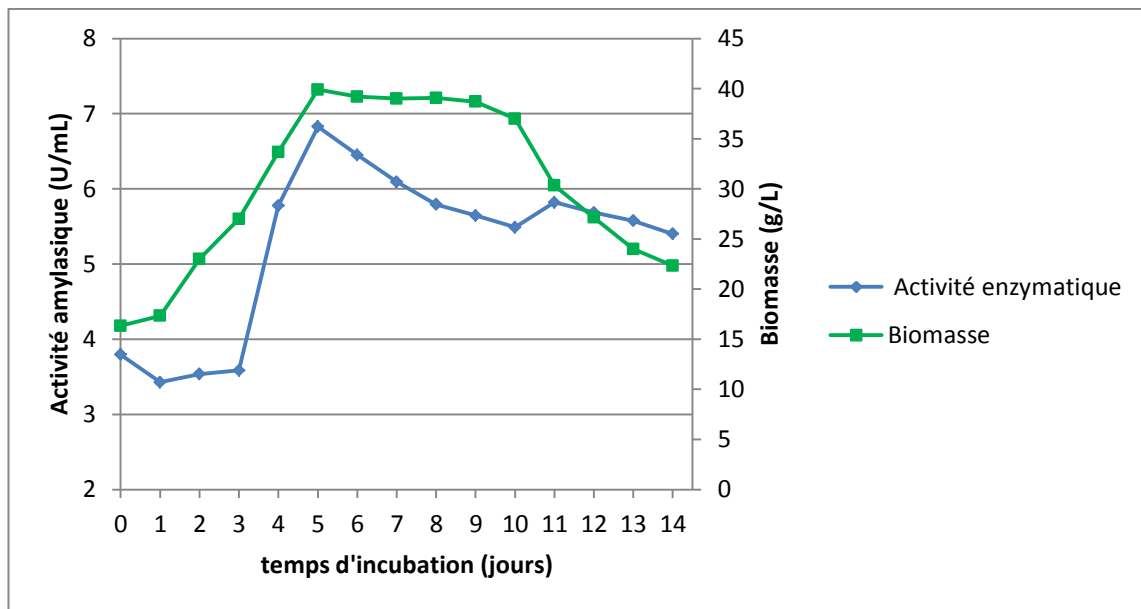


Figure 31. A : Cinétique de croissance et de production de l'α-amylase par *Streptomyces* sp. (20r)

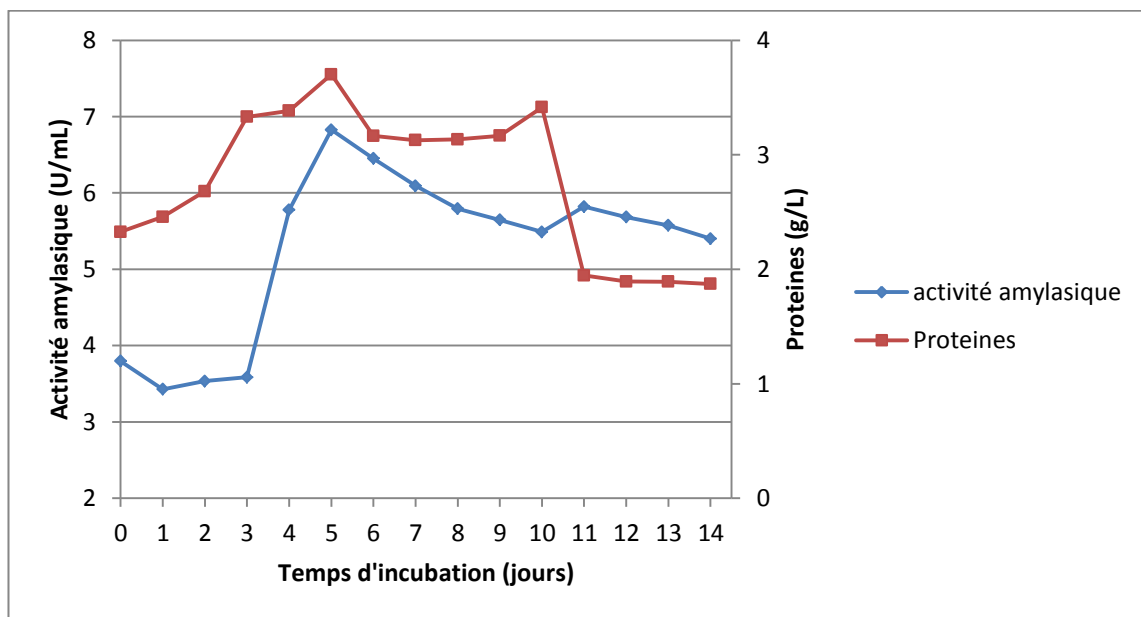


Figure 31. B : Cinétique de production protéique et amylasique par *Streptomyces* sp. (20r)

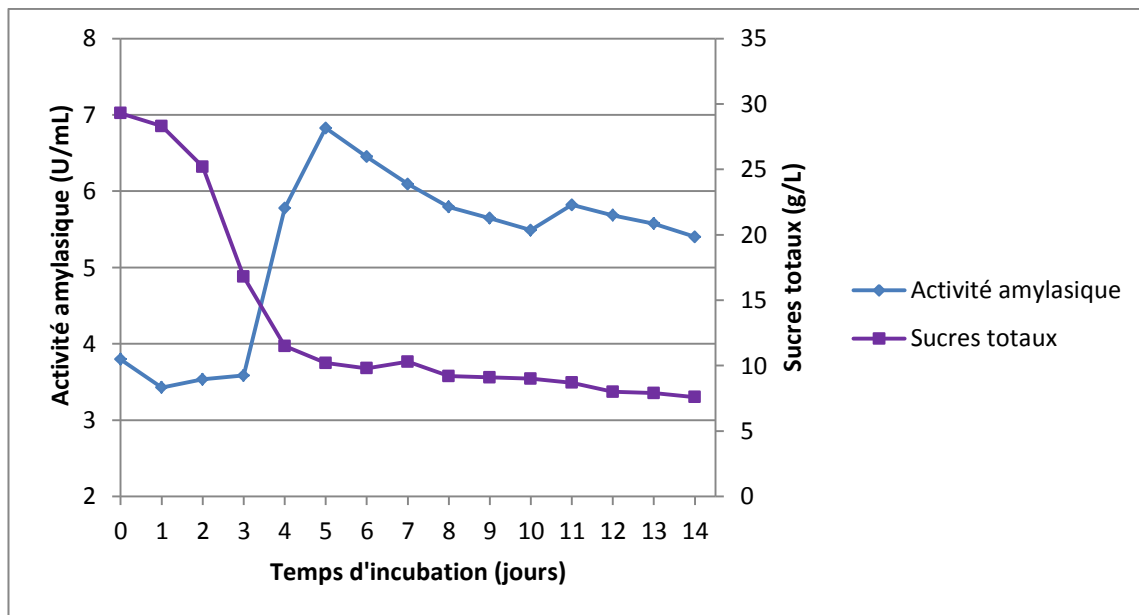


Figure 31. C : Cinétique de consommation de sucres totaux et de production de l' α -amylase par *Streptomyces* sp. (20r).

9. Purification préliminaire de l' α -amylase

La précipitation au sulfate d'ammonium est une méthode pratique, non dénaturante pour la séparation et la concentration des protéines (Scopes, 1994 ; Rosenberg, 2005). Elle est traditionnellement utilisée dans la précipitation des amylases (Chakraborty *et al.*, 2009). Dans notre étude, nous avons utilisé une saturation de 70%. Cependant, une grande quantité d'amylase est perdue après ce stade. La réduction de la teneur en protéines à ce stade est due aux propriétés hydrophobes de la protéine et des fractions de glucose ou de lipide qui étaient liées à la protéine (Andronopoulou et Vorgias, 2004). Le culot formé durant la précipitation est par la suite soumis à une dialyse, afin de prévenir l'inhibition de l'enzyme par les sels d'ammonium (Liu, 2016). La dialyse est généralement utilisée pour éliminer le sulfate d'ammonium résiduel et concentrer la protéine (Liu, 2016). A ce stade, L'activité spécifique est passée de 2,042 à 29,166 U/mg avec un rendement de 30,2%.

Le profil d'élution chromatographique de l'extrait enzymatique sur gel filtration G75 (figure 32) indique deux fractions protéiques, un premier pic qui correspond au relargage des protéines par exclusion dans un volume mort de la colonne (10 mL). Et le deuxième pic, représente la fraction active après élution dans le domaine de fractionnement de la colonne 3-80 kDa, ce qui confirme nos résultats du clonage où on a pu identifier une α -amylase 67 d'une taille de 60 kDa.

L'éluion d'une partie de la fraction active dans le volume mort de la colonne Sephadex G75, suggère la présence de macromolécules, dont la taille est probablement supérieure à 80 kDa (domaine de fractionnement de la colonne G75 : 3-80kDa). Car une activité amylolytique a été détectée dans la première fraction (P1) qui a été exclue dans ce volume mort; elle présente une activité amylolytique spécifique de 20,113U/mg, avec un facteur de purification de 9,849, et un rendement de 7,64%. Dans notre étude, c'est l' α -amylase 65 d'une taille de 100 KDa.

Les résultats de la procédure de cette purification préliminaire sont présentés dans le (tableau 27). Ils nous montre que les deux étapes de purification adoptées ont permis l'obtention de l'enzyme avec un degré de pureté d'environ 44 fois que celle existante dans le surnageant brut. Le rendement de purification est de 8,52%. L'activité spécifique de l' α -amylase purifiée est de l'ordre de 89,727 U/mg de protéines. Ce qui concorde avec les travaux de Shafiei *et al.*, (2010), qui ont utilisés en partie une colonne gel filtration Sephacryl S-200 pour la purification d'une α -amylase halophile de *Nesterenkonia* sp., et qui ont obtenu un rendement de 6,4 % et un degré de purification de l'ordre de 10,8 inférieur au notre qui est égal à 44.

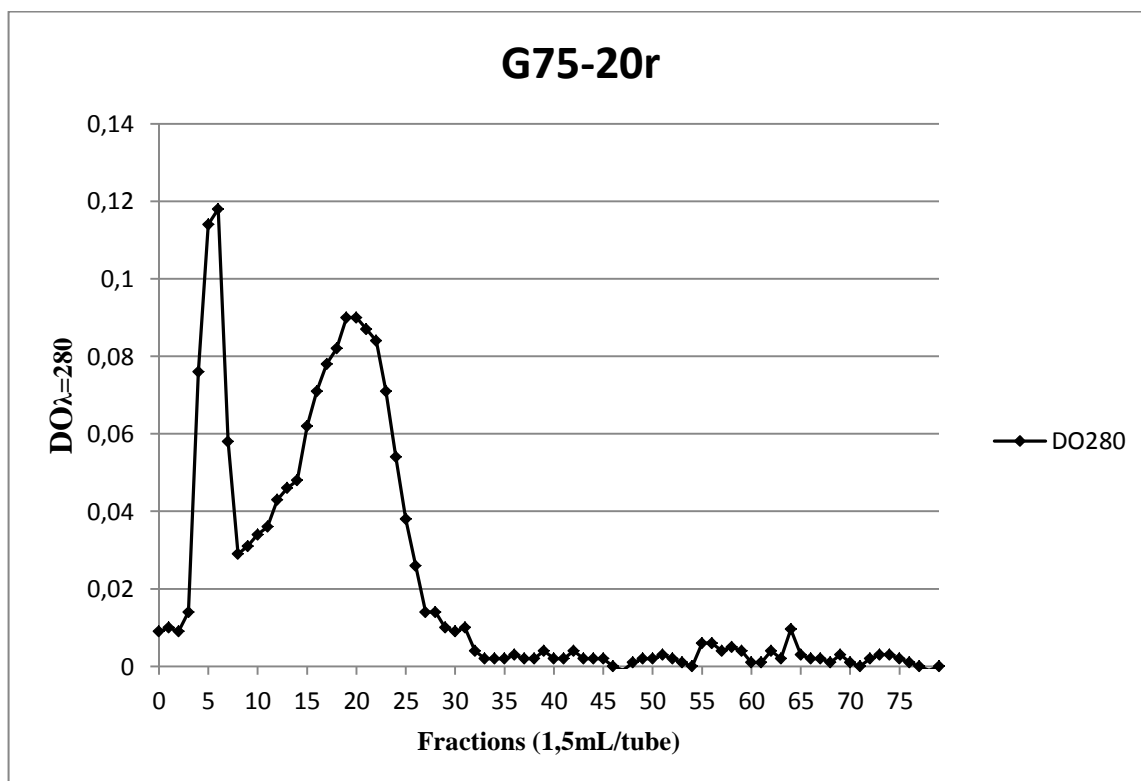


Figure 32 : Profil chromatographique de l' α -amylase de la souche *Streptomyces* sp. (20r) purifiée sur colonne gel filtration G-75

Tableau 27 : Purification de l' α -amylase produite par *Streptomyces* sp. (20r)

Etapes de purification	Volume (mL)	Protéines (mg/mL)	Activité enzymatique (U/mL)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	60	5,674	11,589	2,042	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	7	0,12	3,5	29,166	14,283	30,2
G-75 fraction 1	3	0,044	0,885	20,113	9,849	7,64
G-75 fraction 2	3	0,011	0,987	89,727	43,941	8,52

10. Caractérisation partielle de l'enzyme purifiée

10.1. Activité en fonction de la température

L'activité enzymatique de l' α -amylase extracellulaire tamponnée à pH 5, à partir de *Streptomyces* sp. (20r), a été mesurée à diverses températures pendant 30 min. Les résultats ont révélé que l' α -amylase présentait un niveau d'activité appréciable dans un large intervalle de température compris entre (37-100 °C). L' α -amylase de *Streptomyces* sp. (20r) a montré une activité maximale (activité $\geq 90,78\%$) entre 37 et 75 °C, ces activités pourraient être attribuées à la grande flexibilité moléculaire de la protéine thermophile dans des conditions mésophiles (Dobara *et al.*, 2011).

La cinétique de température de l' α -amylase suggérait que l'activité enzymatique augmentait régulièrement jusqu'à une température optimale de 85 °C puis diminuait fortement comme indiqué dans la (figure 33). Des niveaux d'activité de 63,32% étaient encore détectés à 100 °C. La fonctionnalité de l'enzyme à des températures élevées améliore la solubilité de l'amidon, diminue la viscosité, limite les contaminants microbiens et réduit le temps de réaction (Thippeswamy *et al.*, 2006).

Nos résultats sont en désaccord avec ceux de Bano *et al.*, (2011), qui ont rapporté une inactivation complète de l' α -amylase à 80 °C. Il a également été rapporté que la température optimale pour l'activité d' α -amylase de *Streptomyces* sp. MSC702 était de 55 °C. Chakraborty *et al.*, (2009) ont indiqué une diminution drastique de l'activité amylolytique à 90 °C avec une activité optimale à 50 °C de *Streptomyces* sp. D1. Une activité optimale à 45 °C pour l' α -amylase de *S. gulbargensis* (Syed *et al.*, 2009).

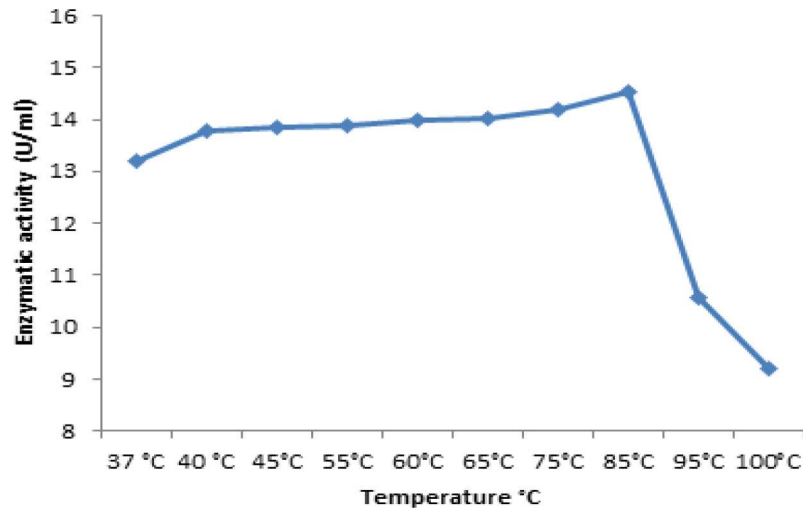


Figure 33: Effet de la température sur l'activité de l'α-amylase

10.2. Activité en fonction du pH

L'effet de la variation du pH sur l'activité de l'α-amylase par cette souche thermophile a été observé (figure 34). L'enzyme était active à la fois au pH acide et alcalin, elle tolère une large gamme de pH (2,2 -10,6) à 40 °C en présence d'amidon comme substrat. L'enzyme a pu présenter une très bonne performance dans le tampon phosphate et glycine-NaOH dans la gamme de pH (7-10,6) et atteint son point optimal à pH alcalin 8,8, il corrobore avec nos résultats d'optimisation du deuxième plan (optimum de pH = 8,95).

En revanche, Vihinen et Mäntsälä, (1989) et Pandey *et al.*, (2000) ont rapporté que les amylases provenant de la plupart des bactéries et des champignons ont un pH optimal dans un intervalle acide à neutre. Des niveaux significatifs d'activité (activité $\geq 86,79\%$) ont été détectés dans le tampon Glycine-HCl et acétate de sodium dans l'intervalle de pH (2,2-5,2).

L'exigence d'un pH alcalin pour l'accomplissement de l'activité optimale des amylases bactériennes caractérise les applications potentielles de cette enzyme dans les industries du détergent et du textile (Kiran et Chandra, 2008). Le résultat actuel est en désaccord avec celui d'Acharyabhatta *et al.*, (2013) et Singh *et al.*, (2014). Ammar *et al.*, (2002) ; Singh *et al.*, (2014) qui ont rapporté que les α-amylases de *Streptomyces* sp. ont une activité à des valeurs de pH inférieures. Cependant, conformément à nos conclusions, Syed *et al.*, (2009) ; Embaby *et al.*, (2014) ont démontré que l'activité optimale était confinée dans l'intervalle neutre à alcalin.

Les deux caractéristique de notre α-amylase concernant le pH optimal et la température, impliquent un indice sur la large gamme de pH et de degrés de température dans lesquels l'α-amylase pourrait fonctionner efficacement (Acharyabhatta *et al.*, 2013) Ainsi, l'α-

amylase aurait de vastes applications industrielles prometteuses où chaque combinaison choisie de pH et de température est un facteur crucial pour garantir le succès d'une certaine application industrielle.

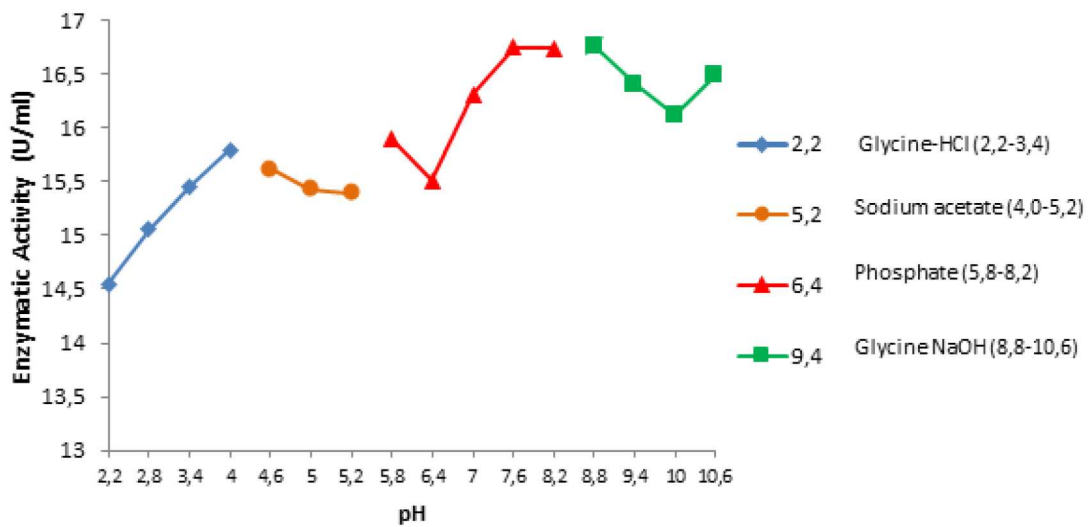


Figure 34 : Effet du pH sur l'activité de l' α -amylase

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était d'identifier, de cloner et de surexprimer des gènes afin de mettre en évidence leurs potentialités fonctionnelles d'une activité amylasique à partir d'une nouvelle souche de *Streptomyces* sp. 20r isolée d'un biotope Algérien, les marais salant ; et par la suite, d'optimiser leur production enzymatique sur milieu à base de déchets d'orange.

En vue de produire cette enzyme, nous avons opté pour une agro-ressource de faible coût. La production enzymatique a été réalisée sur déchets d'orange sous SmF. Nos travaux ont comporté plusieurs volets :

- ✓ Sélection de la meilleure souche actinomycétale productrice d'alpha-amylase et identification de l'activité amylasique de la souche *Streptomyces* sp. 20r.
- ✓ Le criblage, le clonage et l'expression des gènes codant pour des α -amylases chez *Escherichia coli*.
- ✓ L'optimisation de la production de l'activité amylasique sous SmF en utilisant les déchets d'orange comme milieu de culture.
- ✓ La purification et la caractérisation partielle d'une α -amylase.

Les principales raisons de l'augmentation continue des ventes mondiales d'enzymes microbiennes sont dues à l'augmentation de la demande et de la consommation. Parmi les enzymes industrielles majeures qui trouvent des applications dans les domaines de la boulangerie, de l'alcool, des détergents et des industries textiles, les amylases. Ceux-ci sont produits par une variété de microorganismes, qui clivent au hasard des liaisons α -1,4-glycosidiques dans l'amidon conduisant à la formation de dextrans limites. Les α -amylases provenant de différentes sources microbiennes révèlent une grande diversité biochimique et sont susceptibles de manipulation génétique, ils conviennent donc à des applications spécifiques (Asoodeh *et al.*, 2010).

Pour cela, dans le premier volet de nos travaux, et dans un premier temps, une nouvelle souche de *Streptomyces* sp. (20r) a été choisie parmi quatorze actinomycètes en raison de son activité amylasique et de ses bonnes caractéristiques de croissance et de sporulation. Par la suite, nous avons tenté d'identifier, de cloner et de surexprimer le gène codant pour cette enzyme à partir de cette souche. Un séquençage génomique de *Streptomyces* sp. 20r a été réalisé par la technologie Illumina HiSeq 2000. Les résultats de l'annotation structurale et

fonctionnelle ont permis d'identifier et de prédire la fonction de six ORFs en tant que GH et plus précisément en ayant une activité amylasique appartenant à la famille GH13 en possédant une triade catalytique formée d'un acide glutamique (Glu) et de deux acides aspartique (Asp). Les séquences des gènes orthologues putatives positifs possèdent des domaines conservés (CBM) qui nous ont permis de retenir deux gènes pour la suite des travaux codant pour des α -amylases: les Nodes 67 et 65 de 537 aa et 960 aa respectivement. Ces deux gènes ont été par la suite clonés dans le vecteur pET28a (+), puis exprimés chez *Escherichia coli*.

De plus, nous avons essayé de surexprimer les deux protéines recombinantes chez deux types de bactéries d'expression d'*E. coli*. Nous avons conclu que la production de ces protéines mature dans ces organismes conduit à la formation de corps d'inclusion, et ceci malgré une optimisation de quelques paramètres d'expression et d'extraction, à l'exception des dernières conditions de culture bactérienne permettant de surexprimer une partie de ces protéines recombinantes sous forme soluble. Les meilleures conditions ont donc été fixées comme suit : une culture dans le milieu LB, utilisant les souches d'*E. coli* BL21 (DE3), et Rosetta 2 pLysS (DE3), est dans un premier temps réalisée à 37 °C jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne une valeur de 0,6, la culture est ensuite incubée pendant 4 h à 30 °C en présence de 0,1 mM d'IPTG final, pour induire la production de la protéine. Le tampon de lyse cellulaire utilisé pour l'extraction est le suivant: 25 mM Tris pH 8, 200 mM KCl, 10% de glycérol, 0,1% et 1% de triton X-100.

Les déchets d'agrumes sont abondamment générés, les méthodes d'élimination utilisées aujourd'hui restent insatisfaisantes. La production d' α -amylase sur les résidus agro-industriels sous SmF, y compris les déchets d'orange, représente une source lignocellulosique alternative pour la production enzymatique, ainsi que pour des applications biotechnologiques. Il y a eu très peu de rapports sur la production d' α -amylases sous SmF en utilisant des résidus agro-industriels comme sources de carbone par une souche actinomycétale. Nos résultats suggèrent que l'utilisation économique des résidus agro-industriels pour une production rentable d' α -amylase est possible. Des recherches en perspective montrant que c'est une option pratique et économique, notamment des applications à grande échelle sont susceptibles d'être disponibles. Cependant, des efforts supplémentaires sont encore nécessaires dans les domaines suivants. (a) Une meilleure connaissance des constituants chimiques du déchet d'orange, dans le but de produire davantage de molécules à grande valeur ajoutée (b) Le développement de souches

microbiennes plus efficace pour convertir la peau d'orange en produits de haute valeur en utilisant la mutagenèse conventionnelle ou l'ingénierie métabolique. c) L'étude des étapes de traitement du déchet d'orange, dans lesquelles les résidus obtenus en une seule étape seront utilisés selon la définition d'une installation de bioraffinerie.

Dans un second volet, la production d' α -amylase par fermentation en milieu liquide (SmF) sur déchet d'orange a été optimisée sur la base des résultats d'un plan d'expérience de type Plackett-Burman qui permet d'identifier les facteurs qui ont un effet significatif sur la production enzymatique, suivie du plan de Box-Wilson basé sur les composites centrés (CCD) combiné à la méthodologie de la surface de réponse (RSM) à quatre variables incluant 16,03% de déchets d'orange, 6,60% de NaCl, 9,45% d'inoculum et un pH 8,95. Les conditions optimales établies ont permis d'atteindre un niveau de production amyliques de 12,19 U/mL, ce qui a été confirmé avec la valeur prédite par le modèle quadratique (11,55 U/mL), confirmant ainsi la validité du modèle. L' α -amylase a été par la suite purifiée et caractérisée partiellement. Elle présentait une activité optimale à 85°C et à pH 8,8. Cette étude nous a démontré que cette α -amylase possède des propriétés uniques, rendant cette enzyme précieuse à l'échelle industrielle.

Cependant d'autres travaux, peuvent être réalisés pour pouvoir solutionner le problème de la surexpression protéique. Pour cela, une suggestion de solutions permettant de contrôler la fuite du promoteur et éviter la formation des corps d'inclusions a été proposée.

a- La protéine est produite mais est toxique (fuite du promoteur)

- ✓ On peut utiliser des inhibiteurs de l'ARN polymérase. L'ARN polymérase T7 est inhibée par le lysozyme. Cette stratégie est utilisée lorsque le gène d'intérêt est placé en aval d'un promoteur reconnu par une polymérase exogène, produite par la cellule. Si on introduit le gène codant pour le lysozyme sur un plasmide, la coproduction de lysozyme du phage T7 qui inhibera le peu d'ARN polymérase T7 produite en l'absence d'induction (Studier, 1991). Par contre, en présence d'induction, l'inhibiteur sera en trop faible quantité pour l'inhiber comparativement à l'ARN polymérase T7 qui est surproduite.
- ✓ On peut ajouter l'ARN polymérase au moment de la production. Dans certains cas la protéine à exprimer est toxique pour la bactérie. Or tous les promoteurs inductibles ont

une activité basale, même faible, si bien que la protéine est produite en faible quantité en l'absence d'induction (on dit que le promoteur fuit). Si la protéine est très toxique, on peut utiliser une autre stratégie pour produire l'ARN polymérase T7 en utilisant un phage M13 la produisant. On fait pousser les bactéries puis, avant de produire, on infecte les bactéries par le virus. Le virus produit l'ARN polymérase T7 puis le gène d'intérêt est transcrit.

- ✓ On peut rajouter d'autres éléments pour éteindre la transcription du gène, on peut en particulier adopter une stratégie antisens. Dans cette stratégie, on clone un gène à proximité d'un promoteur fort d'*E. coli* de telle sorte que c'est l'antisens qui est produit. Cet antisens inhibe la traduction du gène pendant la croissance de la cellule. L'ajout de rifampicine dans le milieu arrête la synthèse de l'antisens lorsque le gène d'intérêt est en aval d'un promoteur de l'ARN polymérase T7. Pour la même raison, la transcription du gène de résistance doit se faire dans l'autre sens de transcription du gène d'intérêt. Ainsi lorsqu'il n'y a pas d'arrêt de transcription ou lorsque l'arrêt n'est pas total, le gène d'intérêt n'est pas lui-même transcrit en l'absence d'induction. On aura un effet d'antisens, le transcrit initié au niveau du gène de résistance s'hybridera avec les quelques transcrits du gène d'intérêt présent en l'absence d'induction.
- ✓ Les séquences permettant l'inversion est un des moyens de contrôler l'expression du gène. La stratégie est de le cloner à l'envers puis à le retourner au dernier moment lorsque la culture arrive à la phase stationnaire. Les recombinases sont présentes dans la bactérie et leur expression est régulée. Suite à l'induction, elles tournent le gène d'intérêt qui est traduit (Sektas *et al.*, 2001).
- ✓ Pour avoir un bon contrôle de l'expression, on peut utiliser des promoteurs inductibles par exemple par les métaux lourds, un choc thermique ou une hormone stéroïdienne. Toutefois tous ces systèmes fuient, il y a toujours une expression faible en absence d'induction. De plus les inducteurs sont souvent toxiques et l'induction n'est généralement pas spécifique.

b- La protéine est surexprimée mais est mal repliée (corps d'inclusion)

- ✓ Utilisation de stabilisants. L'addition de sucres non métabolisables par la bactérie (saccharose, raffinose ou sorbitol) permet souvent de diminuer le pourcentage de protéine insoluble. Ce résultat est attribué à l'effet stabilisateur des sucres sur la conformation des protéines.
- ✓ L'agrégation peut être observée lorsqu'une protéine est mise en solution avec un tampon non adapté qui provoque son agrégation lente. Dans ce cas, on peut utiliser l'urée dans le tampon dénaturant, car c'est un puissant chaotrope, il permet de dénaturer et de solubiliser les corps d'inclusion.
- ✓ Faire sécréter la protéine dans le milieu extérieur ou dans le périplasme chez *E. coli*. Le cytoplasme des bactéries est un milieu réducteur dans lequel les ponts disulfures ne peuvent pas se former. Par contre le périplasme est un milieu oxydant.
- ✓ Expression des gènes d'intérêt en fusion avec un partenaire protéique fortement soluble (Kapust et Waugh, 1999). Les partenaires les plus souvent utilisés pour l'expression chez *E. coli* sont la glutathion-S transférase (GST), la maltosebinding protein et la thioredoxin (Chatterjee et Esposito, 2005).

Nous envisageons donc en perspective en plus des quelques solutions précédentes, de réaliser une optimisation à partir des deux souches recombinées, une purification et une caractérisation des deux protéines recombinantes, n'ayant pu être entamées et poursuivies dans le temps imparti pour nos travaux, ainsi que de définir l'effet des ions métalliques et des différents substrats sur les deux protéines, et enfin de déterminer la structure 3D par cristallographie des rayons X.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abou-Elela, G. M., El-Sersy, N. A., & Wefky. (2009). Statistical optimization of cold adapted α -amylase production by free and immobilized cells of *Nocardiopsis aegyptia*. *J Appl Sci Res*, 5(3), 286–292.
- Académie des technologies. (2010). Biotechnologie et environnement. Éditions Le Manuscrit.
- Acharyabhata, A., Kandula, S. K., & Terli, R. (2013). Taxonomy and Polyphasic Characterization of Alkaline Amylase Producing Marine Actinomycete *Streptomyces rochei* BTSS 1001. *Int J Microbiol*, 1–8.
- Adrio, J. L., & Demain, A. (2005). Microbial Cells and Enzymes-A Century of Progress., In : In J. L. Barredo (Éd.), *Methods Biotechnol. Microb. Enzym. Biotransformations* (p. 1–27). Totowa, NJ, USA: Humana Press.
- Afnor. (1986). In : *Les dossiers de la normalisation* (Vol. 2, p. 8297–4827).
- Agger, T., Spohr, A. B., & Nielsen, J. (2001). Alpha amylase production in high cell density submerged cultivation of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55(1), 81–84.
- Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., & Guyot, J. (2000). Purification and characterization of an extra cellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 1801 (T), an amylolytique lactic acid bacterium. *Enz Microbial Technol*, 27(6), 406–413.
- Ahmed, S. A., Al_Domany, R. A., El_Shayeb, N. M. A., Radwan, H. H., & Saleh, S. (2008). Optimization, Immobilization of Extracellular Alkaline Protease and Characterization of Its Enzymatic Properties. *Res J Agr Biol Sci*, 4, 434–446.
- Ahmetagic, A., & Pemberton, J. (2010). Stable high level expression of the violacein indolocarbazole anti-tumour gene cluster and the *Streptomyces lividansamyA* gene in *E. coli* K12. *Plasmid*, 63, 79–85.
- Ait Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., & Klenk, H.-P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80.
- Alam, S., Hong, J., & Weigand, W. (1989). Effect of yeast extract on α -amylase synthesis by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnol Bioeng*, 33, 780–785.

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, *215*(3), 403–10.
- Ambujom, S. (2001). Studies on composition and stability of a large membered bacterial consortium degrading phenol. *Microbiol Res*, *156*(4), 293-301.
- 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.
- Ammar, Y. B., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., & Minamiura, N. (2002). New action pattern of a maltose-forming alpha-amylase from *Streptomyces* sp. and its possible application in bakery. *J Biochem Mol Biol*, *35*(6), 568-575.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., & Manogaran, G. P. (2016). “An introduction to actinobacteria,” in *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications*, eds D. Dhanasekaran and Y. Jiang (Rijeka: Intech), 3–37.
- Andronopoulou, E., & Vorgias, C. E. (2004). Multiple components and induction mechanism of the chitinolytic system of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, *65*, 694–702.
- Angel Siles L´opez, J., Li, Q., & Thompson. (2010). Biorefinery of waste orange peel, *Crit Rev Biotechnol*, *30*(1), 63–69.
- Antranikian. (1992). *degradation of starch*, In : *Microbial Degradation of Natural Products*. (AWinkelmann, Éd.). Germany: Weinheim.
- Ara, I., Bukhari, N. A., Mohamed Aref, N., Shinwari, M., & Bakir, M. (2012). Antiviral activities of streptomycetes against tobacco mosaic virus (TMV) in *Datura* plant: Evaluation of different organic compounds in their metabolites. *Afr J Biotechnol*, *11*(8), 2130-2138.
- Aretz, W., Koller, K. P., & Riess, G. (1989). Proteolytic enzymes from recombinant *Streptomyces lividans* TK24. *FEMS Microbiology Letters*, *53*(1-2), 31-35.
- Arunkumar, P., Thanalakshmi, M., Kumar, P., & Premkumar. (2013). *Micrococcus luteus* mediated dual mode synthesis of gold nanoparticles: involvement of extra cellular alpha-amylase and cell wall teichuronic acid. *Colloids Surf.B Biointerfaces*, *103*, 517–522.

Ashokkumar, B., Kayalvizhi, N., & Gunasekaran, P. (2011). Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 37, 331–338.

Asoodeh, A., Chamani, J., & Lagzian, M. (2010). A novel thermostable, acidophilic alpha-amylase from a new thermophilic « *Bacillus sp. Ferdowsicus* » isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. *Int J Biol Macromol*, 46(3), 289-297.

Azizi, M. H., & Rajabzadeh, R. E. (2003). *Effect of mono-diglyceride and lecithin on dough rheological characteristics and quality of flat bread. Lebensm.-Wiss* (Vol. 36).

B

Babu, K., & Satyanarayana, T. (1993). Parametric optimization of extracellular α -amylase by thermophilic *Bacillus coagulans*. *Folia Microbiologica*, 38, 77–80.

Baig, M. A., Pazlarova, J., & Votruba, J. (1984). Kinetics of α -amylase production in a batch and fed -batch culture of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiologica (Praha)*, 29(5), 359–364.

Balkan, B., & Ertan, F. (2007). Production of α -Amylase from *Penicillium chrysogenum* Under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Product. *Food Technol. Biotechnol*, 45, 439–442.

Balu, A. M., Budarin, V., Shuttleworth, P. S., Pfaltzgraff, L. A., Waldron, K., Clark, J., & Luque, R. (2012). Valorization of orange peel residues: waste to biochemicals and nanoporous materials. *Chem Sus Chem*, 5(9), 1694–1697.

Bandlish, R. K., Michael Hess, J., Epting, K. L., Vieille, C., & Kelly, R. M. (2002). Glucose-to-fructose conversion at high temperatures with xylose (glucose) isomerases from *Streptomyces murinus* and two hyperthermophilic *Thermotoga* species. *Biotechnol Bioeng*, 80(2), 185-194.

Bano, S., Qader, S. A., Aman, A., Syed, M. N., & Azhar, A. (2011). Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Pharm Sci Tech*, 12, 255–61.

- Bari, M. N., Alam, M. Z., & Muyibi, S. A. (2009). Improvement of production of citric acid from oil palm empty fruit bunches: optimization of media by statistical experimental designs. *Bioresour Technol*, *100*, 3113–3120.
- Bayoumi, R. A., Yassin, H. M., Swelim, M. A., & Abdel-All, E. (2008). Production of Bacterial Pectinase(s) from Agro-Industrial Wastes Under Solid State Fermentation Conditions. *J Appl Sci Res*, *4*(12), 1708–1721.
- Ben Ammar, Y., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., & Minamiura, N. (2002). New action pattern of a maltose-forming alpha-amylase from *Streptomyces sp.* and its possible application in bakery. *J Biochem Mol Biol*, *35*, 568–75.
- Bendl, B. J., Mackey, D., Al-Saati, F., Sheth, K. V., Ofole, S. N., & Bailey, T. M. (1987). Mycetoma in Saudi Arabia. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *90*(2), 51-59.
- Bennett, S. (2004). Solexa Ltd. *Pharmacogenomics*, *5*(4), 433–438.
- Benson, D. R., & Silvester, W. B. (1993). Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev*, *57*(2), 293.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., & James, K. D. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*A3(2). *Nature*, *417*(6885), 141–7.
- Bergey, D. H. (1989). In : Williams & Wilkins (Éd.), *Bergey's manual of systematic bacteriology (Volume 4 : Actinomycetes (1^{re} éd.)*. Baltimore, MD, USA.
- Bergey, D. H. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology (Volume 3 : The Firmicutes)* (2nd edition edn). Williams & Wilkins.
- Bergey, D. H. (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Volume. In *The Actinobacteria* edn (5^e, 2^e éd.). Williams & Wilkins.
- Bernfeld, P., & Kaplan, N. (1955). α and β amylases. In: Colowick S.P. In : *Methods in enzymology* (Vol. 1). Academic Press.
- Bertheau, Y., Kotoujansky A., Coste C, Colenoa, A., & Mouranche, A. (1985). Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hymolyses et de dépolymérisation. In : *Hydrolyses et dépolymérase enzymes, d'intérêt industriel* (p. 47–108).
- Bhatnagar, I., & Kim, S.-K. (2010). Marine Antitumor Drugs: Status, Shortfalls and Strategies. *Marine Drugs*, *8*(10), 2702-2720.

- Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z., Dodson, G. G., Jensen, V. J., & Woldike, H. F. (1990). Calcium binding in alpha-amylases: an X-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*, 29, 6244–6249.
- Bolam, D. N., Ciruela, A., & McQueen-Mason, S. (1998). *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem*, 775–781.
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Bioch J*, 382(3), 769–781.
- Boraston, A. B., McLean, B.W., Kormos, J.M., Alam, M., Gilkes, N.R., Haynes, C.A., *et al.*, (1999). *Carbohydrate-binding modules: diversity of structure and function*, p. 202-211. In H. J. Gilbert, G. J. Davies, B. Henrissat, and B. Svensson (ed.), *Recent advances in carbohydrate bioengineering*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom
- Bouchek-Mechiche, K., Gardan, L., Normand, P., & Jouan, B. (2000). DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *Int J Sys Evol Microbiol*, 50 Pt 1, 91-99.
- Box, G. E. ., & Wilson, K. (1951). On the experimental attainment of optimum condition. *Royal Stat Soc. (Ser B)*, 13, 1–45.
- Boyaci, I.(2005). A new approach of determination of enzyme kinetic constants using response surface methodology. *Biochem Eng J*, 25, 55–62.
- Brayer, G. D., Luo, Y., & Withers, S. G. (1995). The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci*, 4, 1730–1742.
- Breyer, W., & Matthews, B. W. (2001). A structural basis for processivity. *Protein Sci*, 10–1699.
- Broedel, S. E., Papciak, S. M., & Jones, W. (2001). The selection of optimum media formulations for improved expression of recombinant proteins. In : *E. coli. Technical Bull*, Vol. 2, p. 1–6.
- Brzozowski, A., & Davies, G. J. (1997). Structure of the *Aspergillus oryzae*-amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, 10837–10845.
- Bull, A. T., & Stach, J. E. M. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in Microbiology*, 15(11), 491-499.

Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., & Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38(10), 1397–1403.

C

Carlier, L. (2006). *Production de domaines recombinants PRODH en vue de l'analyse structurale et Caractérisation de la région 51-160 de la protéine KIN17 humaine par RMN et Modélisation Moléculaire. Thèse, université de Rouen.*

Chakraborty, S., Khopade, A., Kokare, C., Mahadik, K., & Chopade, B. (2009). Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces sp.* D1. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 58(1–4), 17–23.

Chakraborty, S., Raut, G., Khopade, A., Mahadik, K., & Kokare, C. (2012). Study on calcium ion independent α -amylase from haloalkaliphilic marine *Streptomyces* strain A3. *Indian J Biotechnol*, 11, 427–437.

Chater, K. F. (1993). Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Ann Rev Microbiol*, 47, 685–713.

Chater, K. F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000, Research*, 5.

Chatterjee, D. K., & Esposito, D. (2006). Enhanced soluble protein expression using two new fusion tags. *Protein Expression and Purification*, 46(1), 122–129.

Chatterton, J.-R., Vogelsong, K.-M., Lu, Y., Ellman, A.-B., & Hvidgens. (1996). Salivary α -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol J*, 16(4), 344–348.

Chen, C. W. (1996). Complications and implications of linear bacterial chromosomes. *Trends Genet*, 12, 192–196.

Chessa, J. P., Feller, G., & Gerday, C. (1999). Purification and characterization of the heat-labile α -amylase secreted by the psychrophilic bacterium TAC 240B. *Can J Microbiol*, 45(6), 452–457.

Chi, Z., Chi, Z., Liu, G., Wang, F., Ju, L., & Zhang, T. (2009). *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 27(4), 423–431.

- Ciferri, O. (1999). Microbial Degradation of Paintings. *Appl Environ Microbiol*, 65(3), 879-885.
- Coronado, M. J., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A., & Nieto, J. (2000). Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol Lett*, 183, 67–71.
- Cotârlet, M. (2013). Medium optimization for the production of cold active β -Amylase by psychrotrophic *Streptomyces* MIUG 4 Alga Using Response Surface Methodology. *Microbiol*, 82(2), 147–154.
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., & Henrissat, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol*, 328, 307–317.
- Crabb, W. D., & Mitchinson, C. (1997). Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *TIBTECH*, 15, 349–352.
- Crueger, W., & Crueger, A. (2000). Substrates for industrial fermentation, In W. Crueger & A. Crueger (Éd.), *Biotechnol. A Textb. Ind. Microbiol.* Panima Publisher Corporation, New Delhi.
- Cundell, D., & Piechoski, M. (2016). Potentially novel Actinobacteria derived antibiotics from unique microenvironments. In: *Antimicrobials Synthetic and Natural Compounds*. (Dhanasekaran, Éd.). 83-98: CRC Press.
- Cuskin, F., Flint, J. E., Gloster, T. M., Morland, C., Baslé, A., Henrissat, B., & Coutinho, P. (2012). How Nature Can Exploit Nonspecific Catalytic and Carbohydrate Binding Modules to Create Enzymatic Specificity. *PNAS*, 109, 51, 20889–94.

D

- Dabirmanesh, B., Daneshjou, S., Sepahi, A. A., Ranjbar, B., Khavari-Nejad, R. A., Gill, P., *et al.*, (2011). Effect of ionic liquids on the structure, stability and activity of two related α -amylases. *Intl J Biol Macromolecules*, 48(1), 93–97.
- Das, S., Ward, L. R., & Burke, C. (2010). Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 305(1), 32-41.
- Davies, G. J., Brzozowski, A. M., Dauter, Z., Rasmussen, M. D., Borchert, T. V., & Wilson, K. S. (2005). Structure of a *Bacillus halmapalus* family 13 α -amylase, BHA, in complex with an acarbose-derived nonasaccharide at 2.1 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 61, 190–193.

- Davies, G. J., Wilson, K. S., & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 321(2), 557–559.
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853–859.
- De Azeredo, L. A. ., Freire, D. M. ., Soares, R. M. ., Leite, S. G. F., & Coelho, R. R. (2004). Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces sp* isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme Microb Technol*, 34, 354–358.
- De Azeredo, L. A., Castilho, L. R., Leite, S. G., Coelho, R. R., & Freire, D. (2003). Protease Production by *Streptomyces sp*. Isolated from Brazilian Cerrado Soil: Optimization of Culture Medium Employing. Statistical Experimental Design, *Appl Biochem Biotechnol*, 105(108), 749–755.
- Demir, H., Gogus, N., Tari, C.D., & Heerd Lahore, M.F. (2012). Optimization of the process parameters for the utilization of orange peel to produce polygalacturonase by solid-state fermentation from an *Aspergillus sojae* mutant strain. *Turk J Biol*, 36,394–404.
- DeMoraes, L. M. P., Astolfi-Filho, S., & Ulhao, C. J. (1999). Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol*, 15, 561–564.
- Deutch, C. (2002). Characterization of a salt-tolerant extracellular a-amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Lett Appl Microbiol*, 35, 78–84.
- Dey, S., & Agarwal, S. O. (1999). Characterization of a thermostable alpha-amylase from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD12. *Indian J Biochem Biophys*, 36(3), 150-157.
- Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., & Panneerselvam, A. (2010). Herbicidal agents from actinomycetes against selected crop plants and weeds. *Nat Prod Res*, 24(6), 521-529.
- Dickmanns, A., Ballschmiter, M., Liebl, W., & Ficner, R. (2006). Structure of the novel alpha-amylase *AmyC* from *Thermotoga maritima*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 62(3), 262–70.
- Diekmann, S. (2000). Reviews in molecular biotechnology. *Rev Mol Biotechnol*, 74(2), 63.
- Diels, L., De Smet, M., Hooyberghs, L., & Corbisier, P. (1999). Heavy metals bioremediation of soil. *Mol Biotechnol*, 12(2), 149-158.

- Dieng, M. T., Niang, S. O., Diop, B., & Ndiaye, B. (2005). [Actinomycetomas in Senegal: study of 90 cases]. *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique (1990)*, 98(1), 18-20.
- Divne, C., Stahlberg, J., Teeri, T. T., & Jones, T. A. (1998). High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50Å° long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J Mol Biol*, (275), 309–325.
- Dobara, M. I. A., El-Sayed, A. K., El-Falla, A. A., & Omar, N. (2011). Production and Partial Characterization of High Molecular Weight Extracellular alpha-amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* Isolated from Egyptian Soil. *Polish J Microbiol*, 60, 65–71.
- Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., *et al.*, (2002). Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J Biotechnol*, 99(3), 187-198.
- Donato, P., Lo Passo, C., La Cono, V., Albertano, P. & Urzi, C. (2000). Biodiversity of *Streptomyces* strains isolated from Roman hypogea, pp. 88-89. In: protection and conservation of the cultural heritage of the Mediterranean cities (Eds. E. Galan, P. Aparicio, A. Miras). Lectures, short papers and enlarged abstracts of the 5th International Symposium on the Conservation of Monuments in the Mediterranean basin. Seville.
- Douglas, C. (2001). *Design and analysis experimentsn* (5^e éd.). Arizona, USA: Wiley.
- Dubois, M., Gills K., A., Hamilton J., K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem*, 28, 350.
- Dunne, E. F., Burman, W. J., & Wilson, M. L. (1998). Streptomyces pneumonia in a patient with human immunodeficiency virus infection: case report and review of the literature on invasive streptomyces infections. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 27(1), 93-96.
- Dworkin Martin, Falkow Stanly, Rosenberg Eugene, Schleifer Karl-Henz et StackebrandyErko, The Prokaryotes, 3ème edition, Volume 3, A Handbook on the Biology of Bacteria : Archea. Bacteria :Firmicutes, Actinomycetes, *edition Springer*, USA.

E

- Eijsink, V. G. H., Vaaje-Kolstad, G., Vårum, K. M., & Horn, S. (2008). Towards new enzymes for biofuels lessons from chitinase. *Research Trends Biotechnol*, 26, 228–35.

- El-Barawy, Mokhtar, E., Nahed, M., Department, M., Hassan, A., Abdel Azim, E.-B., & Evaluation. (2011). Evaluation of Biological Compounds of Streptomyces Species for Control of some Fungal Diseases of biological compounds of Streptomyces species for control of some fungal diseases (Vol. 7).
- El-Helow, E. R., Abdel-Fattah, Y. R., & Ghanem, K. (2000). Application of the response surface methodology for optimizing the activity of an *apr E*-driven gene expression system in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, *54*, 515–520.
- Elibol, M. (2004). Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor*A3(2) with response surface methodology. *Process Biochem*, *39*, 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 sp.* *Process Biochem*, *38*, 615–620.
- Emampour, M., Noghabi, K. A., & Zahiri. (2015). Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cold-adapted α -amylase with multiple extremozyme characteristics. *J Mol Catal BEnzym*, *111*, 79–86.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., & von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, *300*, 1005–1016.
- Embaby, A. M., Masoud, A. A., Marey, H. S., Shaban, N. Z., & Ghonaim, T. (2014). Raw agro-industrial orange peel waste as a low cost effective inducer for alkaline polygalacturonase production from *Bacillus licheniformis* SHG10. *SpringerPlus*, *3*, 327.

F

- FAOSTAT-FAO, *Statistical Database*. (2005).
- Feller, G., Bussy, O., Houssier, C., & Gerday, C. (1996). Structural and functional aspects of chloride binding to *Alteromonas haloplanctis* α -amylase. *J Biol Chem*, *271*(39), 23836–23841.

- Fischer, G., Holl, A. C., Volff, J. N., Vandewiele, D., Decaris, B., & Leblond, P. (1998). Replication of the linear chromosomal DNA from the centrally located orie of *Streptomyces ambofaeiens* revealed by *PFGE* gene dosage analysis. *Res Microbiol*, *49*, 203–210.
- Fonseca, M. J. V., & Said, S. (1994). The pectinase produced by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectin or orange pulp pellets as inducers. *Appl Microbiol Biotechnol.*, *42*, 32–35.
- Fukusumi, S., Kamizono, A., & Horinouchi, S. (1988). Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable amylase gene from an anaerobic thermophile, *Dictyoglomus thermophilum*. *Eur J Biochem*, *174*(1), 15–21.

G

- Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M., Sukumaran, R.K., & Pandey, A. (2008). Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresour. Technol*, *99*, 4597–602.
- García-Aparicio, M., Trollope, K., Tyhoda, L., Diedericks, D., & Görgens, J. (2011). Evaluation of triticale bran as raw material for bioethanol production. *Fuel*, *90*, 1638–1644.
- Gasmi, M., & Kitouni, M. (2017). Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology. *Ann Microbiol*, *67*, 175–183.
- Georgiou, G., & Valax, P. (1999). Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods Enzymol*, *309*, 48–58.
- Giacopuzzi, E., Bresciani, R., Schauer, R., & Monti, E. (2012). New insights on the sialidase protein family revealed by a phylogenetic analysis in metazoa. *PLoS One*, *7*, 44193.
- Gilkes, N. R., Warren, R. A., Miller, R. C. J., & Kilburn, D. G. (1988). Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *J Biol Chem*, *263*, 10401–10407.
- Good, W. M., & Hartman, P. (1970). Properties of amylase from *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol*, *104*, 601–613.
- Goris, J., De Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J., Falsen, E., Quensen, J. F., Vandamme, P. (2004). Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int J Sys Evol Microbiol*, *54*(5), 1677-1681.

- Gouet, P., Robert, X., & Courcelle, E. (2003). ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, (Vol. 31, No. 13).
- Goyer, C., & Beaulieu, C. (1997). Host Range of Streptomycete Strains Causing Common Scab. *Plant Disease*, 81(8), 901-904.
- Grupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem*, 38, 1599–616.
- Guillén, D., Sánchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2010). Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85(5), 1241–1249.
- Guillén, D., Santiago, M., Linares, L., Perez, R., Morlon, J., Ruiz, B., *et al.* (2007). Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly arranged domains. *Appl Environ Microbiol*, 73, 3833–3837.
- Gverzdys, T., & Nodwell, JR. (2016). Biosynthetic genes for the tetrodecamycin antibiotics. *J Bacteriol*, 198(14), 1965–1973.

H

- Hagedorn, C. (1976). Influences of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. *Appl Environ Microbiol*, 32(3), 368–375.
- Hagihara, H., Igarashi, K., Hayashi, Y., Endo, K., Ikawa-Kitayama, K., Ozaki, K., *et al.*, (2001). Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. *Appl Environ Microbiol*, 67, 1744–1750.
- Hamid, M. E. (2011). Variable antibiotic susceptibility patterns among *Streptomyces* species causing actinomycetoma in man and animals. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 10, 24.
- Haq, I., Ashraf, H., Qadeer, M. A., & Iqbal, J. (2003). Production of α -amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresource Technol*, 87, 57–61.
- Hart, H. E., Parish, M. E., Burns, J. K., & Wicker, L. (1991). Orange finisher pulp as substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. *J Food Sci*, 56(2), 480–483.

- Hashemi, M., Razavi, S. H., Shojaosadati, S. A., & Mousavi, S. M. (2011). The potential of brewer's spent grain to improve the production of α -amylase by *Bacillus sp.* KR-8104 in submerged fermentation system. *New Biotechnol*, 28, 165–172.
- Hashimoto, H. (2006). Recent structural studies of carbohydrate-binding modules. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2954–2967.
- Hawker, L. E., & Linton, A. H. (1971). *Microorganisms, Function, Form and Environment*. London, UK: Edward Arnold Ltd.
- Heck, J. X., De Barros, S., & Ayub, M. (2005). Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid state cultivation. *Enzyme Microb Technol*, 37, 417–423.
- Hendriksen, H.V.; Pedersen, S.; & Bisgard-Frantzen, H. (1999). A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. Patent Application, WO 99/35325.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem J*, 280, 309–316.
- Henrissat, B., & Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 293(3), 781–788.
- Henrissat, B., & Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 316, 695–696.
- Henrissat, B., Coutinho, P. M., & Davies, G. J. (2001). A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 47, 55–72.
- Hernández, M. S., Rodríguez, M. R., Guerra, N. P., & Rosés, R. P. (2006). Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *J Food Engin*, 73(1), 93–100.
- Holt, J. G., & Krieg. (1994). NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9^e éd.). Baltimore.
- Hopwood, D. A. (1985). *Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual*. Norwich: John Innes Foundation.
- Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev: MMBR*, 63(4), 735-750.

Hoshiko, S., Makabe, O., Nojiri, C., Katsumata, K., Satoh, E., & Nagaoka, K. (1987). Molecular cloning and characterization of the *Streptomyces hygrosopicus* alpha-amylase gene. *J Bacteriol*, 169(3), 1029-1036.

I

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., *et al.*, (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol*, 21, 526–531.

Imamura, H., Fushinobu, S., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Jeon, B. S., Wakagi, T. an. M., & H. (2003). Crystal structures of 4-alpha-glucanotransferase from *Thermococcus litoralis* and its complex with an inhibitor. *J Biol Chem*, 278(21), 19378–86.

Imbert, L. (2012). *Mémoire de thèse, Développement d'outils chimiométriques pour l'étude des traitements anti leishmaniens.*

Industrial Enzymes Market by Type (*Carbohydrases, Proteases, Non-starch Polysaccharides & Others*), Application (*Food & Beverage, Cleaning Agents, Animal Feed & Others*), Brands & by Region - *Global Trends and Forecasts to 2020.*

J

Janecek, S. (1997). α -Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog Biophys Mol Biol*, 67, 67–97.

Janeček, Š. (2002). A motif of a microbial starch-binding domain found in human genethonin. *Bioinformatics*, 18(11), 1534-7.

Janeček, Š., Svensson B, & Henrissat B. (1997). Domain evolution in the α -amylase family. *J Mol Evol*, 45, 322–331.

Janeček, Š., Svensson B., & MacGregor EA. (2011). Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals. *Enz Microbial Technol*. 49(5):429-40.

- Janecek, Š., & Kuchtová A. (2012). silico identification of catalytic residues and domain fold of the family GH119 sharing the catalytic machinery with the α -amylase family GH57. *FEBS Lett*, 586, 3360–3366.
- Jensen, P. R., & Mincer TJ., Williams PG, Fenical W. (2005). Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *A Van Leeuw*, 87(1), 43–48.
- Jensen, P. R., Dwight, R. Y., & Fenical, W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 57(4), 1102–1108.
- Jensen, P. R., Moore, B. S., & Fenical, W. (2015). The Marine Actinomycete Genus *Salinispora*: A Model Organism for Secondary Metabolite Discovery. *Nat Prod Rep*, 32, 738–751.
- Jensen, P. R., Williams, P. G., Oh, D. C., Zeigler, L., & Fenical, W. (2007). Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. *Appl Environ Microbiol*, 73(4), 1146–1152.
- 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 (beta/alpha) 8-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J. Protein Chem*, 12, 791–805.
- Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Sierks, M. R., & Svensson B. (1991). Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem J*. 280, 51–55.
- Jiang, C., & Xu, L. (1993). *Actinomycete Diversity in Unusual Habitats*, 4:47–57.
- Johansen, J. E., & Binnerup, S. J. (2002). Contribution of Cytophaga-like Bacteria to the Potential of Turnover of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus by Bacteria in the Rhizosphere of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Microbial Ecology*, 43(3), 298–306.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2006). Solid state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbruecki*. *Process Biochem*, 41, 759–763.
- Jurado Alameda, E., Bravo Rodríguez, V., Altmajer Vaz, D., & de Cassia Siqueira Curto Valle, R. (2011). Effectiveness of starch removal in a Bath-Substrate-Flow (BSF) device using surfactants and α -amylase. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 647–653.

K

- Kalakoutskii, L. V., & Agre, N. S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol Rev*, 40(2), 469–524.
- Kammoun, R., Naili, B., & Bejar, S. (2008). Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Biores Technol*, 99, 5602–5609.
- Kansoh, A. L., & Nagieb, Z. A. (2004). Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85(2), 103-114.
- Kapust, R. B., & Waugh, D. S. (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*, 8, 1668–1674.
- Kar, S., & Ray, R. (2007). Partial characterization and optimization of extracellular thermostable Ca^{2+} inhibited α -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317. *J Sci Ind Res*, 67, 58–64.
- Kar, S., & Ray, R. (2008). Statistical optimization of alpha-amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC7317 cells in calcium alginate beads using response surface methodology. *Polish J Microbiol*, 57(1), 49–57.
- Kar, S., Ray, R. C., & Mohapatra, U. (2008). Alpha-amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 in solid state fermentation using response surface methodology. *Microbiol*, 57(4), 289–296.
- Karimi, M., & Biria, D. (2016). The synergetic effect of starch and alpha amylase on the biodegradation of n-alkanes. *Chemosphere*, 152, 166–172.
- Karthikeyan, R. S., Karthikeyan, R. S., Rakshit, S. K., & Baradarajan, A. (1996). Optimization of batch fermentation conditions for dextran production. *Bioprocess Eng*, 15(5), 247–51.
- Kelly, R. M., Dijkhuizen, L., & Leemhuis, H. (2009). Starch and α -glucan acting enzymes, modulating their properties by directed evolution. *J Biotechnol*, 140, 184–193.
- Khan, M. R., & Williams, S. T. (1975). Studies on the ecology of actinomycetes. *Soil—VIII: Distribution and Characteristics of Acidophilic Actinomycetes*, 7(6), 345–348.

- Khemakhem, B., Ali, M. B., Aghajari, N., Juy, M., Haser, R., & Bejar, S. (2009). Engineering of the α -amylase from *Geobacillus stearothermophilus* US100 for detergent incorporation. *Biotechnol Bioeng*, 1(102), 380–9.
- Kieser, T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F, and Hopwood D. A. (2000). Practical Streptomyces Genetics : P 1-613, The John Innes Foundation. Norwich, UK.
- Kikani, B. A., Shukla, R. J., & Singh, S. (2010). Biocatalytic Potential Of Thermophilic Bacteria And Actinomycetes. In :*Current Research, Technology And Education Topics In Applied Microbiology And Microbial. Biotechnology*.2. 1000-1007.
- Kiran, K. K., & Chandra, T . (2008). Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkali-tolerant alpha-amylase by a moderately halophilic Bacillus sp. Strain TSCVKK. *Appl Microbiol Biotechnol*, 77, 1023–31.
- Kirchhoff, E. (2005). *Souci-Fachmann-Kraut: Food Composition and Nutrition Tables* (7^e éd.). Medpharm Scientific Publishers: Stuttgart.
- Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioia, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., et al., (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale*, 15(1), 45–51.
- Klokke, A. H., Swamidasan, G., Anguli, R., & Verghese, A. (1968). The causal agents of mycetoma in South India. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 62(4), 509-516.
- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Faiz, O., & Belduz, A. O. (2010). Cloning, expression and characterization of highly thermo- and pH-stable maltogenic amylase from a thermophilic bacterium *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4. *Process Biochemistry*, 45(6), 821–828.
- Koneman, E. W. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Konsula, Z., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hydrolysis of starches by the action of α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Proc Biochem*, 39, 1745–1749.
- Kozdrój, J., & van Elsas, J. D. (2001). Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J Microbiol Methods*, 43(3), 197-212.
- Kristjansson, J. K. (1989). Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. *Trends in Biotechnology*, 7(12), 349-353.

- Kulkarni-Almeida, A. A., Brahma, M. K., Padmanabhan, P., Mishra, P. D., Parab, R. R., Gaikwad, N. V., Mahajan, G. B. (2011). Fermentation, Isolation, Structure, and antidiabetic activity of NFAT-133 produced by *Streptomyces* strain PM0324667. *AMB Express*, 1(1), 42.
- Kumar, D.V., Bharti, A., Gusain, O., & Bisht, G. (2010). An improved method for isolation of genomic DNA from filamentous actinomycetes. *Journal of Sci. Engg. & Tech. Mgt.*, 2: 10-13.
- Kundu, S., Sahu, M. K., Sivakumar, K., & Kannan, L. (2006). Isolation and characterization of extracellular enzymes producing actinomycetes from the alimentary canal of estuarine fishes. *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci*, 8, 811–815.
- Kuriki, T., & Imanaka, T. (1999). Concept of the alpha-amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J Biosci Bioeng*, 87, 557–565.
- Kurtboke, D. I. (2012). Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93(5), 1843–1852.
- Kutzner, H. J. (1981). *The family Streptomycetaceae*, The Prokaryotics (vol II), Mortimer P. Starr, Heinz Stolp, Hans G. Trüper, Albert Balows, Hans G. Schlegel, Springer-verslag, p. 2029-2058.
- L**
- Labeda, D. (1987). Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Dev Ind Microbiol*, 28, 115–121.
- Labeda, D. P., & Lyons, A. J. (1992). DNA relatedness among strains of the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoea* (Person and Martin 1940) Waksman and Henrici 1948. *Appl Environ Microbiol*, 58(2), 532-535.
- Labeda, D. P., Lechevalier, M. P., & Testa, R. T. (1997). *Streptomyces stramineus* sp. nov., a New Species of the Verticillate Streptomycetes. *Int J Sys Evol Microbiol*, 47(3), 747-753.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–683.
- Lallai, A., & Mura, G. (2004). Biodegradation of 2-chlorophenol in forest soil: effect of inoculation with aerobic sewage sludge. *Environ Toxicol Chem*, 23(2), 325-330.

- Lambert, D. H., & Loria, R. (1989). *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *Int J Sys Evol Microbiol*, 39(4), 393-396.
- Lammertyn, E., Desmyter, S., Schacht, S., Van Mellaert, L., & Anne, J. (1998). Influence of charge variation in the *Streptomyces venezuelae* alpha-amylase signal peptide on heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 49, 424–430.
- Lanoot Benjamin, (2004). *Improved taxonomy of the genus Streptomyces. Doctoral thesis, Ghent University: 23, 279, Belgium.*
- Larpent, J. P., & Larpent-Gourgaud, M. (1990). *Mémento technique de Microbiologie. Technique et Documentation*. Lavoisier.
- Larpent, J.-P., & Sanglier, J.-J. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques*. Paris: Masson.
- Lealem, F., & Gashe, B. (1994). Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). *J Appl Bacteriol*, 77, 348–352.
- Lechevalier, H. A., & Lechevalier, M. P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. *The Prokaryotes*, 2, 1915–1922.
- Lecoq, R. (1965). *Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles*. Paris: Doin.
- Levin, L., Forchiassin, F., & Viale, A. (2005). Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process Biochem*, 40, 1381–1387.
- Li, W., Lanoot, B., Zhang, Y., Vancanneyt, M., Swings, J., & Liu, Z. (2002). *Streptomyces scopiformis* sp. nov., a novel streptomycete with fastigate spore chains. *Int J Sys Evol Microbiol*, 52(5), 1629-1633.
- Lin, C.-W., Wu, C.-H., Tran, D.-T., Shih, M.-C., Li, W.-H., & Wu, C.-F. (2011). Mixed culture fermentation from lignocellulosic materials using thermophilic lignocellulose-degrading anaerobes. *Process Biochemistry*, 46, 489–493.
- Liu, B., Wu, H., & Pan, S. (2016). *Saccharopolyspora subtropica* sp. nov., a thermophilic actinomycete isolated from soil of a sugar cane field. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66, 1990–1995.
- Liu, B.-L., & Tzeng, Y.-M. (1998). Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess Eng*, 18, 413–418.

- Liu, Q. P., Sulzenbacher, G., Yuan, H., Bennett, E. P., Pietz, G., Saunders, K., *et al.*, (2007). Bacterial glycosidases for the production of universal red blood cells. *Nature Biotechnol*, 25, 454–464.
- Lombard, V., Hemalatha Golaconda, R., Drula, E., Coutinho Pedro, M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(490), 95.
- Lonsane, B. K., & Ramesh, M. (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.
- Loria, R., Coombs, J., Yoshida, M., Kers, J., & Bukhalid, R. (2003). A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiol Mol Plant Pathol*, 62(2), 65-72.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193–265.

M

- Macgragor, E. A., Janecek, S., & Svensson, B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1546, 1–20.
- Macgregor, E. A., Jespersen, H. M., & Svensson, B. (1996). A circularly permuted alphaamylase-type alpha/beta-barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett*, 378, 263–266.
- MacGregor. (1988). Alpha-amylase structure and activity. *J Protein Chem*, 7, 399–415.
- Mahe, A., Develoux, M., Lienhardt, C., Keita, S., & Bobin, P. (1996). Mycetomas in Mali: causative agents and geographic distribution. *Am J Trop Med Hyg*, 54(1), 77-79.
- Maktouf, S. (2013). *Activités amylase et lichenase d'une nouvelle souche de Bacillus Production sur milieu solide et caractérisation. Thèse, université de Toulouse.*
- Maldonado, L. A., Stach, J. E., Pathom-aree, W., Ward, A. C., Bull, A. T., & Goodfellow, M. (2005). Diversity of cultivable Actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *A Van Leeuwenhoek*, 87(1), 8–11.

- Malhotra, R., Noorvez, S. M., & Satyanarayana, T. (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium independent alpha amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett Appl Microbiol*, *31*, 378–384.
- Malumba, P., Sebastien, J., & Claude, D. (2011). Structure de l'amidon de maïs et principaux phénomènes impliqués dans sa modification thermique. *Biotechnol Agron Soc Environ*, *15*(2), 315–326.
- Mamo, G., & Gessesse, A. (1999). Effect of cultivation conditions on growth and α -amylase production by thermophilic *Bacillus* sp. *Lett Appl Microbiol*, *29*, 61–65.
- Manteca, A., Fernández, M., & Sánchez, J. (2005). A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology (Reading, England)*, *151* (Pt11), 3689-3697.
- Manteca, A., Mäder, U., Connolly, B. A., & Sanchez, J. (2006). A proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* programmed cell death. *Proteomics*, *6*(22), 6008-6022.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. *Springer-Verlag*, *1*(5), 73–83.
- Martín, M. A., Fernández, R., Serrano, A., & Siles, J. (2013). Semi-continuous anaerobic co-digestion of orange peel waste and residual glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Waste Manage*, *33*(7), 1633–1639.
- Martin, M. A., Siles, J. A., Chica, A. F., & Martin, A. (2010). Biomethanization of orange peel waste. *Biores Technol*, *101*, 8993–8999.
- Martín, M. C., Manteca, A., Castillo, M. L., Vázquez, F., & Méndez, F. J. (2004). *Streptomyces albus* isolated from a human actinomycetoma and characterized by molecular techniques. *J Clin Microbiol*, *42*(12), 5957-5960.
- Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W., & Kakudo, M. (1984). Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase. *J Biochem*, *95*, 697–702.
- Mctigue, M. A., Kelly, C. T., Fogarty, W. M., & Doyle, E. (1994). Production studies on the alkaline amylases of three alkalophilic *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, *16*(6), 569–574.

- Medema, M. H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., van den Berg, M., Müller, U., Heijne, W., & Takano, E. (2010). The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol Evol*, 2, 212-224.
- Melo, E., Aires-Barro, M., & Cabra, IJ.(2001). Reverse micelles and protein biotechnology. *Biotechnol Ann Rev*, 7, 87–129.
- Mengoni, A., Barabesi, C., Gonnelli, C., Galardi, F., Gabbrielli, R., & Bazzicalupo, M. (2001). Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 10(8), 1909-1916.
- Merouane, F. (2016). *Extraction, purification et caractérisation des lectines produites par la souche Micromonospora aurantiaca GF44c, et tests biologiques ; Thèse de Doctorat, université des frères Mentouri, constantine.*
- Miguélez, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (1999). Hyphal Death during Colony Development in *Streptomyces antibioticus* : Morphological Evidence for the Existence of a Process of Cell Deletion in a Multicellular Prokaryote. *J Cell Biol*, 145(3), 515–525.
- Miguélez, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (2000). Streptomycetes: a new model to study cell death. International Microbiology : The Official. *J Spanish Soc Microbiol*, 3(3), 153–8.
- Mittra, J., Tait, J., & Wield, D. (2011). From maturity to value-added innovation: lessons from the pharmaceutical and agro-biotechnology industries. *Trends in Biotechnology*, 29(3), 105–109.
- Miyajima, K., Tanaka, F., Takeuchi, T., & Kuninaga, S. (1998). *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *Int J Sys Bacteriol*, 48 (2), 495-502.
- Mohamed, S. A., Drees, E. A., and Fahmy, A. ,& El-Badry, M. O. (2010). Biochemical Properties of α -Amylase from Peel of *Citrus sinensis* cv. *Abosora*. *Appl Biochem Biotechnol*, 160, 2054–2065.
- Montgomery, D.(1991). *Design and analysis of experiments*. New York, USA: Wiley.
- Morosoli, R., & Dupont, C. (1999). Secretion of xylanase A2 in *Streptomyces lividans*: dependence on signal peptides length, number and composition.FEMS. *Microbiol Lett*, 179, 437–445.
- Mulimani, V. H., Patil, G. N., & Ramalingam, A. (2000). α -Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses. *Biochem Educat*, 28, 161–163.

N

- 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*, 535–539.
- Nakajima, R., Imanaka, T., & Aiba, S. (1986). Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Appl Microbiol Biotechnol*, *23*, 355–360.
- Naomichi, N., & Nagai, S. (1981). Single cell protein production from mandarin orange peel. *Eur J App Microbiol Biotechnol*, *11*, 156–160.
- Naouel, G., & Combellas, J. (1999). Livexeight supplements growing cattle offered maize meal or citrus pulp as supplements to diets based on poultry litter and restricted grazing of low quality pastures. *Livestock Research for Rural Development*, *11*(1).
- Narayana, K. J. P., & Vijayalakshmi, M. (2008). Production of extracellular α -amylase by *Streptomyces albidoflavus*. *Asian J Biochem*, *3*, 194–197.
- Natsume, M., Komiya, M., Koyanagi, F., Tashiro, N., Kawaide, H., & Abe, H. (2005). Phytotoxin produced by *Streptomyces sp.* causing potato russet scab in Japan. *J Gen Plant Pathol*, *71*(5), 364–369.
- Negi, S., & Banerjee, R. (2009). Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food Research International*, *42*(4), 443–448.
- Nguyen, J., Francou, F., Virolle, M. J., & Guérineau, M. (1997). Amylase and chitinase genes in *Streptomyces lividans* are regulated by reg1, a pleiotropic regulatory gene. *J Bacteriol*, *179*(20), 6383–6390.
- Nielsen, J. E., & Borchert., T. (2000). Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochim Biophys Acta*, *1543*, 253–274.
- Nigam, P., & Singh, D. (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enz Microb Technol*, *17*, 770–778.

O

- Okahashi, N., Nakata, M., Terao, Y., Isoda, R., Sakurai, A., Sumitomo, T., *et al.*, (2011). Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, *50*, 148–154.
- Olano, C., Méndez, C., & Salas, J. A. (2009). Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. *Marine Drugs*, *7*(2), 210-248.
- Onishi, H., & Sonada, K. (1979). Purification and some properties of an extracellular amylase from moderate halophile, *Micrococcus halobius*. *Appl Environ Microbiol*, *38*, 616–20.
- Ortseifen, V., Winkler, A., Albersmeier, A., Wendler, S., Pühler, A., & Kalinowski, J. (2015). Complete genome sequence of the actinobacterium *Streptomyces glaucescens* GLA.O (DSM 40922) consisting of a linear chromosome and one linear plasmid. *J Biotechnol*, *194*, 81–83.
- Oskay, M. (2009). Comparison of *Streptomyces* diversity between agricultural and non-agricultural soils by using various culture media. *Sci Res Essay*, *4*(10), 997-1005.
- 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. *Biocatal Agric Biotechnol*, *4*, 685–693.

P

- Pandey, A., Nigam, P., Soccol C., R., Soccol V., T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*, *31*, 135–52.
- Parada, J., & Aguilera J., M. (2012). Effect of native crystalline structure of isolated potato starch on gelatinization behavior and consequently on glycemic response. *Food Research International*, *45*, 238–243.
- Parekh, S., Vinci, V. A., & Strobel, R. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, *54*, 287–301.
- Park, D. H., Kim, J. S., Kwon, S. W., Wilson, C., Yu, Y. M., Hur, J. H., & Lim, C. K. (2003). *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. *Int J Sys Evol Microbiol*, *53*(6), 2049-2054.

- Pedersen, H., & Nielsen, J. (2000). The influence of nitrogen sources on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Appl Microbiol Technol*, 53(3), 278–281.
- Pimentel-Elardo, S. M., Kozytska, S., Bugni, T. S., Ireland, C. M., Moll, H., & Hentschel, U. (2010). Anti-Parasitic Compounds from *Streptomyces* sp. Strains Isolated from Mediterranean Sponges. *Marine Drugs*, 8(2), 373-380.
- Plackett, R. L., & Burman, J.(1946). design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33, 305–325.
- Poorna, C. A., & Prema, P. (2007). Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Bioresour Technol*, 98, 485–490.
- Prajapati, V. S., Kamlesh C., & Patel, U. B. T. (2015). A statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 under solid-state fermentation. *Biotech*, 5(2), 211–220.
- 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 Biochem*, 44, 210–215.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2003). *Microbiologie (Chapitre 25 : Les actinomycètes)*. D. Boek (Éd.), (p. 506–517).
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2007). *Microbiologie (Chapitre 24)*, Second french edition (5th american edition translation).D. Boek (Éd.),

R

- Rahman, R. N. Z. A., Geok, L. P., Basri, M., & Salleh, A. (2005). Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K. *Bioresour Technol*, 96, 429–36.
- Rajagopalan, G., & Krishnan, C. (2009). Optimization of agro-residual medium for α -amylase production from a hyper-producing *Bacillus subtilis* KCC103 in submerged fermentation. *J Chem Technol Biotechnol*, 29(84), 618–25.

- Rajan, S. S., Yang, X., Collart, F., Yip, V. L., Withers, S. G., Varrot, A., *et al.*, (2004). Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD⁺/Mn²⁺ - dependent phospho-alpha-glucosidase from *Bacillus subtilis*. *Structure*, *12*, 1619–1629.
- Ramachandran, S., Patel, A. K., Nampoothiri, K. M., Chandran, S., Szakacs, G., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2004). α -Amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Braz. Arch Biol Technol*, *47*, 309–317.
- Ramachandran, S., Patel, A. K., Nampoothiri, K. M., Francis, F., Nagy, V., & Szakacs, G. (2004). Coconut oil cake—a potential raw material for the production of alpha-amylase. *Bioresour Technol*, *93*(2), 169–74.
- 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 Crystallogr D Biol Crystallogr*, *52*, 435–446.
- Ramesh, S., & Mathivanan, N. (2009). Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(12), 2103-2111.
- Rao, J. L. M., & Satyanarayana, T. (2003). Statistical optimization of a high maltose-forming, hyperthermostable and Ca²⁺ independent response surface methodology production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology. *J Appl Microbiol*, *95*, 712–718.
- Ray, R. (2001). Production of α -amylase xylanase by an alkalophilic strain of *Penicillium griseoroseum* RR-99. *Acta Microbiologica Polonica*, *50*(3–4), 305–309.
- Rintala, H., Hyvärinen, A., Paulin, L., & Nevalainen, A. (2004). Detection of streptomycetes in house dust—comparison of culture and PCR methods. *Indoor Air*, *14*(2), 112-119.
- Rintala, H., Nevalainen, A., & Suutari, M. (2002). Diversity of streptomycetes in water-damaged building materials based on 16S rDNA sequences. *Lett Appl Microbiol*, *34*(6), 439-443.
- Rivas, B., Torrado, A., Torre, P., Converti, A., & Domínguez, J. (2008). Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Chem*, *56*(7), 2380–2387.
- Rosenberg, I. M. (2005). *Protein Analysis and Purification*. Boston: Birkhäuser.

- 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. *Biochem Eng J*, 77(220–230).
- Roy, J.K., Borah A., Charu L.M., & Mukherjee A.K. (2013). Cloning and overexpression of raw starch digesting α -amylase gene from *Bacillus subtilis* strain AS01a in *Escherichia coli* and application of the purified recombinant α -amylase (AmyBS-I) in raw starch digestion and baking industry. *J Mol Catal B, Enzymatic*, 97, 118–129.
- Rukhaiyar, R., & Srivastava, S. (1995). Effect of various carbon substrates on α -amylase production from *Bacillus* species. *World J Microbiol Biotechnol*, 10, 76–82.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., *et al.*, (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann Microbiol*, 53(4), 349-410.

S

- Saci, A. (2012). *Production d'alpha-amylase par Streptomyces sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Thèse de Magister, université des frères Mentouri, constantine.*
- Saffroy Sophie (2006), *Etude du Métabolisme Carboné chez Streptomyces pristinaespiralis, Thèse Doctorat, Institut Polytechnique de Lorraine, France, P 6-14.*
- Sahnoun, M., Kriaa, M., Elgharbi, F., Ayadi, D., Bejar, S., & Kammoun, R., (2015). *Aspergillus oryzae S2 α -amylase production under solid state fermentation: optimization of culture conditions. Int. J. Biol. Macromol. 75, 73–80.*
- Saintpierre, D. (2001). *Identification de souches originales d'actinomycetes isolées de sols ultramafiqes de Nouvelle-Calédonie. Caractérisation chimique de quelques antibiotiques produits. PhD thesis. Institut National Polytechnique de Toulouse, France.*
- Sakiyama, F., Nitta, Y., Isoda, Y., & Toda, H. (1989). Identification of glutamic acid 186 affinity-labeled by 2,3-epoxypropyl alpha-D-glucoopyranoside in soybean beta-amylase. *J Biochem*, 105(4), 573–576.
- Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Santamaria, R. I., Del Rio, G., Saab, G., Rodriguez, M. E., Soberon, X., & Lopez-Marguia, A. (1999). Alcoholysis reactions from starch with α -amylases. *FEBS Letters*, *452*(3), 346–350.
- Santos, É. R., Santos Teles, Z.N., Campos, N.M., Jacinto, S.D.A., Bispo, A.S.R., & Nascimento, R. (2012). Production of α -Amylase from *Streptomyces sp.* SLBA-08 Strain Using Agro-Industrial By-Products. *Braz Arch Biol Technol*, *55*(5), 793–800.
- Saqib, A.A.N., Hassan, M., Khan, N.F., & Baig, S. (2010). Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). *Process Biochemistry*, *45*, 641–646.
- Sarcabal, P., Remaud-Simeon, M., Willemot, R., Potocki de Montalk, G., Svensson, B., & Monsan, P. (2000). Identification of key amino acid residues in *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. *FEBS Lett*, *474*, 33–37.
- Scopes, R. K. (1994). *Protein Purification*. New York, New York, NY: Springer.
- Sektas, M., Hasan, N., & Szybalski, W. (2001). Expression plasmid with a very tight two-step control: Int/att-mediated gene inversion with respect to the stationary promoter. *Gene*, *267*(2), 213–220.
- Shafiei, M., Ziaee, A.-A., & Amoozegar, M. (2010). Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic α -amylase from a moderately halophilic bacterium, *Nesterenkonia sp.* strain F. *Process Biochemistry*, *45*, 694–699.
- Shafique, S., Bajwa, R., & Shafique, S. (2009). Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha amylase activity. *Pak J Bot*, *41*(2), 897–905.
- Shahera, H., Attyia, A., & Ashour, S. (2002). Biodegradation of agro-industrial orange waste under solid state fermentation and natural environmental conditions. *Egyptian Journal of Biology*, *4*, 23–30.
- Sharma, A., & Satyanarayana, T. (2012). Cloning and expression of acid stable, high maltose forming, Ca^{2+} independent α -amylase from an acidophile *Bacillus acidicola* and its applicability in starch hydrolysis. *Extremophiles*, *16*, 515–522.
- Sharma, A., & Satyanarayana, T. (2013). Structural and biochemical features of acidic α -amylase of *Bacillus acidicola*. *Int J Biol Macromol*, *61*, 416–423.

- Shinde, U., & Inouye, M. (2000). Intramolecular chaperones: Polypeptide extensions that modulate protein folding. *Semin Cell Dev Biol*, 11, 35–44.
- Shirling, E., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 16(3):313-340.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., *et al.* (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 539.
- Siles, J.A., & Thompson, L. Q. (2010). Biorefinery of waste orange peel. *Crit Rev Biotechnol*, 30(1), 63–69.
- Singh, R., Kapoor V. & Kumar V. (2011). Influence of carbon and nitrogen sources on the α -amylase production by a newly isolated thermotolerant *Streptomyces* sp. MSC702 (MTCC 10772). *Asian J Biotechnol.*, 3, 540-553.
- Singh, R., Kapoor, V., & Kumar, V. (2012). Production of thermostable, Ca^{+2} -independent, maltose producing α -amylase by *Streptomyces* sp. MSC702 (MTCC 10772) in submerged fermentation using agro-residues as sole carbon source. *Ann Microbiol*, 62, 1003–1012.
- 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 Res*, 2014, 1-8.
- Sithranga Boopathy, N., & Kathiresan, K. (2010). Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview [Research article].
- Sivakumar, K., Karuppiyah, V., Sethubathi, G., Thangaradjou, T., & Kannan, L. (2012). Response surface methodology for the optimization of α -amylase production by *Streptomyces* sp. ML12 using agricultural byproducts. *Biologia (Bratisl)*. *SP Versita*, 1(67), 32–40.
- Sivakumar, K., Sahu, M. K., Thangaradjou, T., & Kannan, L. (2007). Review on actinobacteria in India. *Indian J Microbiol*, 47, 186–196.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006). α -amylases from microbial sources—an over view on recent developments. *Food Technol. Biotechnol*, 44–173.
- Smaoui Slim (2010), *Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés, thèse de doctorat, Université de Toulouse : 1-187, France.*

- Solanki, R., Khanna, M., & Lal, R. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J Microbiol*, 48(4), 410-431.
- Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., & Rajnisz, A. (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Cent Eur J Biol*, 7(3), 373-390.
- Solis-pereira, S., Ernesto, F. T., Gustavo, V. G., & Mariano, G. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus nigerin* submerged and solid state Fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol.*39,36–41.
- Souci, S.W., Fachmann, W., & Kraut, H. (1994). *Food composition and nutrition tables* (5^e éd.). CRC Press, Stuttgart: Medpharm Scientific Publ.
- Stackebrandt, E., & Woese, C. R. (1981). Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms. *Current microbiology*, 5, 197–202.
- Stam, M. (2006). *Mémoire de thèse, Evolution et prédiction des activités des glycoside hydrolases*.
- Stam, M. R., Danchin, E. G. J., Rancurel, C., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2006). Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins. *Protein Eng Des Sel*, 19, 555–562.
- Stein, E.A., Hsiu, J., & Fischer, E.H. (1964). Alpha-amylases as calcium-metalloenzymes. I. Preparation of calcium-free apo-amylases by chelation and electro dialysis. *Biochemistry*3:56–61.
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol*, 219(1), 37–44.
- Sudo, S., Ishikawa, T., Takayasu-Sakamoto, Y., Sato, K., & Oba, T. (1993). Characteristics of acid-stable α - amylase production by submerged culture of *Aspergillus kawachii*. *J Ferm Bioeng*, 76, 105–110.
- Sujatha, P., Bapi Raju, K. V. V. S. N., & Ramana, T. (2005). Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res*, 160(2), 119-126.
- Sun, Z., Lu, W., Liu, P., Wang, H., Huang, Y., & Zhao, Y. (2015). Isolation and characterization of a proteinaceous α -amylase inhibitor AAI-CC5 from *Streptomyces sp.* CC5, and its gene cloning and expression. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107, 345–356.

Syed, D. G., Agasar, D., & Pandey, A. (2009). Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 189–194.

T

Takeda, Y., Hizukuri, S., Takeda, C., & Suzuki, A. (1987). Structures of branched molecules of amyloses of various origins, and molar fractions of branched and unbranched molecules. *Carbohydrate Research*, 165(1), 139–145.

Tang, Y.-J., Zhang, W., Liu, R.-S., Zhu, L.-W., & Zhong, J.-J. (2011). Scale-up study on the fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for the hyperproduction of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides. *Process Biochemistry*, 46, 404–408.

Tani, S., Kawaguchi, T., Kato, M., Kobayashi, T., & Tsukagoshi, N. (2000). A novel nuclear factor, SREB, binds to a cis-acting element, SER, required for inducible expression of the *Aspergillus oryzae* α -amylase A gene in *A. nidulans*. *Molecular and General Genetics*, 263(2), 232–238.

Tatsinkou, F.B., Tavea, F., & Ndjouenkeu, R. (2005). Full Length Research Paper - Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *Afr J Biotechnol*, 4(1),14-18.

Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M., & Sasaki, K. (2003). Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochem*, 38, 1327–1340.

Terwisscha van Scheltinga, A.C., Armand, S., Kalk, K.H., Isogai, A., Henrissat, B., & Dijkstra, B.W. (1995). Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry*, 34(48):15619–15623.

Thaxter, R. (1892). Potato scab. *Conn Agric Exp Stn Rep* 1891, 153-160.

Thippeswamy, S., Girigowda, K., & Mulimani, V. (2006). Isolation and identification of alpha-amylase producing *Bacillus* sp. from dhal industry waste. *Indian J Biochem Biophys*, 43.

- Thomson, C. J., Power, E., Ruebsamen-Waigmann, H., & Labischinski, H. (2004). Antibacterial research and development in the 21st Century-an industry perspective of the challenges. *Curr Opin Microbiol*, 7(5), 445–50.
- Thykaer, J., & Nielsen, J. (2003). Metabolic engineering of beta-lactam production. *Metab Eng*, 5(1), 56-69.
- Tiznado, O., Everardo, J., García, M. R., Camargo, W. C., Juan Andrés, L. B., & Inzunza, G. E. (2012). Effect of Size of the Step in the Response Surface Methodology using Nonlinear Test Functions. *Int J Mech Aerospace*, (6), 1091–6.
- Tokuoka, M., Sawamura, N., Kobayashi, K., & Mizunov, A. (2010). Simple metabolite extraction method for metabolic profiling of the solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng*, 110, 665–669.
- Tomme, P., Van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., Van Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., *et al.*, (1988). Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *Eur J Biochem*, 170, 575–581.
- Tomme, P., Warren, R.A., Miller, R.C., Jr., Kilburn, D.G. & Gilkes, N.R. (1995) in *Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides* (Saddler, J.N. & Penner, M., eds.), Cellulose-binding domains: classification and properties. pp. 142-163, American Chemical Society, Washington.
- Tonkova, A. (2006). Microbial starch converting enzymes of the α -amylase family. In R. C. Ray & O. P. Wards (Éd.), *Microbial Biotechnology in Horticulture Vol.I* (p. 421–472). Enfield, New Hampshire, USA: Science Publishers.
- Totsuka, A., Nong, V.H., Kadokawa, H, Kim, C.S., Itoh, Y., & Fukazawa, C. (1994). Residues essential for catalytic activity of soybean beta-amylase. *Eur J Biochem*. 221(2), 649–654.
- Trujillo, M. E., & Goodfellow, M. (2003). Numerical phenetic classification of clinically significant aerobic sporoactinomycetes and related organisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 84(1), 39-68.

U

Uitdehaag, J. C. M., Mosi, R., & Kalk, K. H. (1999). X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyl transferase elucidate catalysis in the alphaamylase family. *Nat Struct Biol*, 6(5), 432–436.

Uma Maheswar Rao, J. L., & Satyanarayana, T. (2007). Improving production of hyperthermostable and high maltose-forming α -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its applications. *Bioresource Technology*, 98(2), 345–352.

V

Van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J Biotechnol*, 94(2), 137–155.

Van Keulen, G., Jonkers, H. M., Claessen, D., Dijkhuizen, L., & Westen, H. A. B. (2003). Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 185(4), 1455–1458.

Varel, V., & Kreikemeier, K. (1994). Response to Various Amounts of *Aspergillus oryzae* fermentation Extract on Ruminant Metabolism in Cattle. *J Dairy Sci*, 77, 3081–3086.

Ventosa, A., & Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol*, 11(1), 85–94.

Vigal, T., Martin, J. F., & Gil, J. A. (1994). Expression of the *Streptomyces griseus* alpha-amylase gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 118(3), 259–263.

Vihinen, M., & Mantsiila, P. (1989). Microbial Amylolytic Enzyme. *Crit Rev Bioch Mol Biol*, 24(4), 329–418.

Virolle, M. J., & Bibb, M. J. (1988). Cloning, characterization and regulation of an alpha-amylase gene from *Streptomyces limosus*. *Mol Microbiol*, 2(2), 197–208.

Virolle, M.-J., Long, C. M., Shing, C., & Bibb, M. J. (1988). Cloning, characterisation and regulation of an α -amylase gene from *Streptomyces venezuelae*. *Gene*, 74(2), 321–334.

Viswanathan, P., & Surlikar, N. (2001). Production of α -amylase with *Aspergillus flavus* on amaranthus grains by solid-state fermentation. *J Basic Microbiol*, 41(1), 57–64.

- Vujaklija, D., Schröder, W., Abramić, M., Zou, P., Lescić, I., Franke, P., & Pigac, J. (2002). A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. *Arch Microbiol*, *178*(2), 124-130.
- Vukelić, B., Ritonja, A., Renko, M., Pokorny, M., & Vitale, L. (1992). Extracellular alpha-amylase from *Streptomyces rimosus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, *37*(2), 202-204.

W

- Wakim, J., Robinson, M., & Thoma, J. A. (1969). The active site of porcine pancreatic α -amylase : factors contributing to catalysis. *Carbohydrate Research*, *10*, 487–503.
- Waksman, S.A., & Henrici, A.T. (1943). The Nomenclature and classification of the actinomycetes. *J,Bacteriol*, *46*, 337–341.
- Walpole, R., Myers, R., Myers, S., & Ye, K. (2007). *Probability and Statistics for engineers and scientist*.(8th edition Prentice H, Éd.).Upper Saddle River.
- Wang, S. L., Yen, Y. H., Shih, I. L., Changc, A. C., Changa, W. T., Wu, W. C., & Chai, Y. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151.*Enzyme Microb. Technol*, *33*, 917–925.
- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., & Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Arch Microbiol*, *176*(5), 386-390.
- Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A., & Wohlleben, W. (2003). Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *Journal of Biotechnology*, *106*(2-3), 221-232.
- Weuster-Botz, D. (2000). Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search. *J Biosci Bioeng*, *90*, 473–83.
- Williams, S.T., Vickers, J.C. & Goodfellow, M. (1985).Application of new theoretical concepts to the identification of streptomycetes. In: Computer-assisted bacterial systematics. M. Goodfellow, D. Jones and F.G. Priest (Eds), Academic Press, London.
- Wirth, S., & Ulrich, A. (2002). Cellulose-degrading potentials and phylogenetic classification of carboxymethyl-cellulose decomposing bacteria isolated from soil. *Sys Appl Microbiol*, *25*(4), 584-591.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51, 221–271.

Wolfenden, R. (1999). Conformational aspects of inhibitor design: enzyme-substrate interactions in the transition state. *Bioorg Med Chem*, 7, 647–652.

X

Xu, L. H., Tiang, Y. Q., Zhang, Y. F., Zhao, L. X., & Jiang, C. L. (1998). *Streptomyces thermogriseus*, a new species of the genus *Streptomyces* from soil, lake and hot-spring. *Int J Sys Bacteriol*, 48(4), 1089-1093.

Y

Yamaguchi, R., Inoue, Y., Tokunaga, H., Ishibashi, M., Arakawa, T., & Sumitani, J. (2012). Halophilic characterization of starch-binding domain from *Kocuriavarians* alpha-amylase. *Int J Biol Macromol*, 50, 95-102.

Yikmis, M., & Steinbüchel, A. (2012). Historical and Recent Achievements in the Field of Microbial Degradation of Natural and Synthetic Rubber. *Appl Environ Microbiol*, 78(13), 4543-4551.

Yin, X. H., Gagnat, J., Gerbaud, C., Guerineau, M., & Virolle, M. J. (1997). Cloning and characterization of a new alpha-amylase gene from *Streptomyces lividans* TK24. *Gene*, 197(37–45).

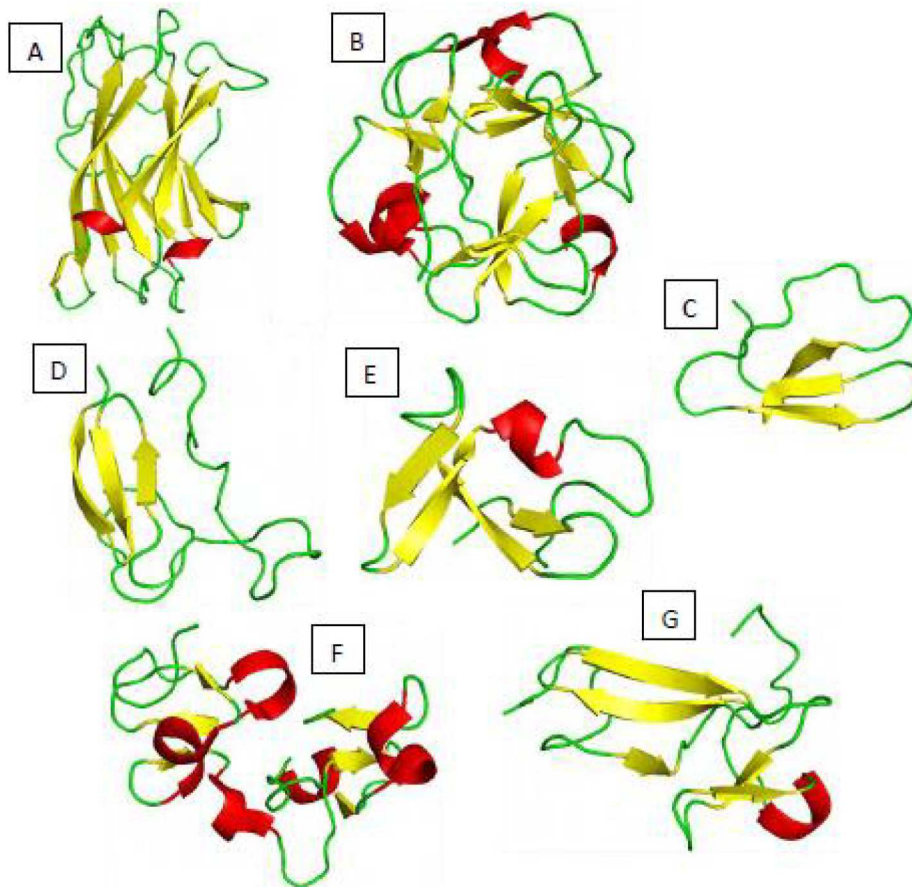
Z

Zangirolami, T. C., Carlsen, M., Nielsen, J., & Jorgensen, S. (2002). Growth and enzyme production during continuous cultures of high amylase producing variant of *A. oryzae*. *Braz J Chem*, 19(1), 55–67.

Zhang, Q., Li, W.-J., Cui, X.-L., Li, M.-G., Xu, L.-H., & Jiang, C.-L. (2003). *Streptomyces yunnanensis* sp. nov., a mesophile from soils in Yunnan, China. *Int J Sys Evol Microbiol*, 53(1), 217-221.

- 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. *Int J Syst Evol Microbiol*, *59*, 589–608.
- Zhu, W., Dongmei, C., Gugue, C., Qian, P., & Ping, S. (2007). Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049. *Enzyme Microbiol Technol*, *40*, 1592–1597.
- Zivorad, R. (2004). *Design of Experiments in Chemical Engineering*. WILEY-VCH. Weinheim.
- Zona, R., Chnag-Pi-Hin, F., & O'donohue, M. J. (2004). Bioinformatics of the glycoside hydrolase family 57 and identification of catalytic residues in amylopullulanase from *Thermococcus hydrothermalis*. *Eur J Biochem*, *271*, 2863–2872.

ANNEXES

Annexe 01**Classification structurale des repliements des CBM (Boraston *et al.*, 2004)**

Différents repliements de CBM : sandwich β : repliement 1 des CBM (**A**), trèfle β : repliement 2 des CBM (**B**), noeud cystéine : repliement 3 des CBM (**C**), unique : repliement 4 des CBM (**D**), repliement OB : repliement 5 des CBM (**E**), repliement hévéine : repliement 6 des CBM (**F**) et unique contenant des repliement hévéine : repliement 7 des CBM (**G**).

Les structures illustrant les repliements caractéristiques des CBM sont les structures **A**) d'un CBM se fixant à la cellulose de *Ruminiclostridium thermocellum* appartenant à la famille CBM3 (code pdb 1NBC), **B**) d'un CBM se fixant au xylane de *Streptomyces lividans* appartenant à la famille CBM13 (code pdb 1MC9), **C**) d'un CBM se fixant à la cellulose de *Trichoderma reesei* appartenant à la famille CBM1 (code pdb 1CBH), **D**) d'un CBM se fixant à la chitine de *Dickeya dadantii* appartenant à la famille CBM5 (code pdb 1AIW), **E**) d'un CBM se fixant à la cellulose de *Cellvibrio japonicus* appartenant à la famille CBM10 (code pdb 1E8R), **F**) d'un CBM se fixant à la chitine de *Urtica dioica* appartenant à la famille CBM18 (code pdb 1EN2) et **G**) d'un CBM se fixant à la chitine de *Tachypleus tridentatus* appartenant à la famille CBM14 (code pdb 1DCQ). Les hélices α sont représentées en rouge, les brins β en jaune et les boucles en vert.

Annexe 02**Solution de Lugol**

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

Milieu GN

Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2.5g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7

Milieu ISP₂

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
D-Glucose	4g
Agar	20g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,3

Milieu Bennett

D-Glucose anhydre.....	10g
Casaminoacide	2g
Extrait de levure	1g
Extrait de viande.....	1g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,3

ANNEXE 03

Extraction de l'ADN génomique :

Le Kit utilisé pour l'extraction de l'ADN est le kit GenElute Bacterial Genomic DNA Kit Protocol (Sigma-Aldrich)

L'extraction de l'ADN génomique des grams positifs est réalisée selon les étapes suivantes:

1- La récolte de cellules bactériennes:

La culture est centrifugée à 12000-16000×g pendant 2mn.

2- La digestion de la paroi cellulaire:

Après élimination du surnageant, 1g de culot bactérien est récupéré dans un tube de collection puis resuspendu dans 200µL d'une solution de lysozyme. Le tube est incubé à 37°C/30mn. 20µL de RNase sont ajoutés, puis incubés pendant 2mn à température ambiante.

3-La lyse cellulaire:

20µL de proteinase K et 200µL d'une solution de lyse C sont ajoutés à la suspension cellulaire, cette dernière est vortexée puis incubée à 55°C/10mn.

4-Préparation de la colonne:

500µL de solution de préparation de colonne sont ajoutés à chaque colonne de liaison. Une centrifugation est réalisée à $\geq 12000\times g$ pendant 1mn. Le surnageant est éliminé.

5- Fixation de l'ADN a la colonne:

200µL d'éthanol sont ajoutés au lysat cellulaire. Le tube est inversé énergiquement afin d'obtenir un mélange homogène.

Le mélange d'éthanol est transféré dans une colonne de liaison. Une centrifugation est réalisée à $\geq 6500\times g$ pendant 1min.

6- Lavage de la colonne:

La colonne est transférée vers un nouveau tube de collection. 500µL de solution de lavage sont ajoutés à la colonne. Une centrifugation est réalisée à $\geq 6500\times g$ pendant 1min.

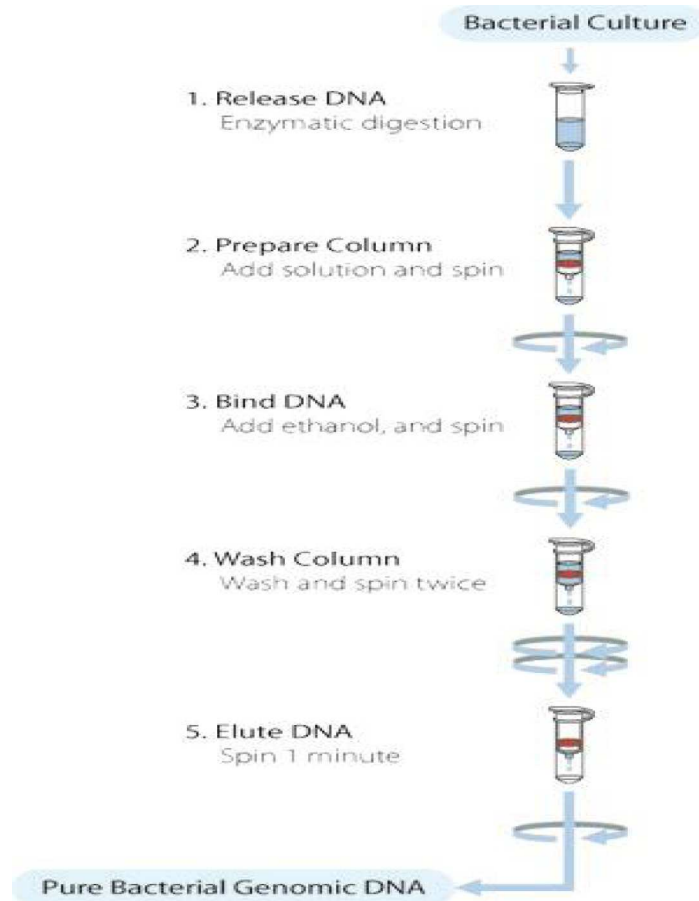
7- La répétition du lavage de la colonne:

La colonne est transférée vers un nouveau tube de collection. 500µL de solution de lavage concentrée sont ajoutés à la colonne. Une centrifugation est réalisée à $\geq 12000\times g$ pendant 3min pour faire sécher la colonne.

8- Elution de l'ADN génomique:

La colonne est transférée vers un nouveau tube de collection. 200µL de solution d'éluion sont ajoutés au milieu de la membrane, la colonne est incubée pendant 5mn à température ambiante. Une centrifugation est réalisée à $\geq 6500\times g$ pendant 1min.

La quantité de l'ADN est mesurée par la lecture de l'absorbance à 260nm à l'aide du spectrophotomètre Nano Drop. Le Filtrat contenant l'ADN est conservé au congélateur à -20°C.



Annexe 05**1- Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)****Tampon de charge 5X**

Tris-HCl pH 6,8.....	62,5mM
SDS.....	2%
Glycérol	20%
B-mercaptoéthanol	50mM
Bleu de bromophénol	0,1%
Eau distillée	10mL

Tampon de migration 10X

Tris-HCl	250mM
Glycine	1.92M
SDS	1%
pH= 8,3	

Solution de coloration

Méthanol	120mL
Acide acétique glaciale	5mL
Coomassie Brilliant Blue R-250.....	0.02g
Eau distillée	50mL

Solution de décoloration

Méthanol	125mL
Acide acétique glaciale	50mL
Eau distillée	500mL

2- Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose 1%**Solution de révélation des bandes d'ADN**

NaCl 0.1M	50mL
Gel Red 10.000X.....	10µL

Tampon TBE

Tris borate	90mM
EDTA	2mM
Eau distillée	1000mL
PH= 8.2	

ANNEXE 06

Purification des produits PCR sur gel :

1- La bande d'intérêt contenant le fragment d'ADN, est excisée du gel en utilisant un scalpel propre, en la fractionnant en petits cubes. Cette dernière est placée dans un tube eppendorf de 1,5 ml pré-pesé. Le poids de la tranche du gel est noté après la pesée.

2- Un volume (v/p) 1:1 du tampon de liaison est ajouté à la tranche de gel.

3- le mélange est incubé à 50-60°C pendant 10 min pour favoriser la dissolution du gel. Le tube est mélangé par inversion toutes les quelques minutes pour faciliter le processus de fusion. Ce dernier est vortexé avant qu'il soit déposé sur la colonne.

NB : Le tampon de liaison contient un indicateur de pH, la solution reste jaune si le pH est optimal pour l'adsorption sur la colonne ($\text{pH} \leq 7.5$). Par contre, lorsque le pH est trop élevé, la solution vire au violet ou orange. Dans ce cas, le pH doit être corrigé en ajoutant 10 μL d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2.

4- 800 μL de la solution de gel solubilisée seront transférés de l'étape précédente vers la colonne de purification GeneJET. Une centrifugation à >12000 g pendant 1min est effectuée. Le surnageant est éliminé et la colonne est remise dans le même tube de collection.

5- 700 μL de tampon de lavage (dilué avec l'éthanol) sont ajoutés à la colonne de purification. Une centrifugation à >12000 g pendant 1min. Le surnageant est éliminé, remettre la colonne de purification dans le nouveau tube de collection.

6- Centrifugez la colonne de purification vide pendant 1 min supplémentaire pour éliminer complètement tout tampon de lavage résiduel.

7- La colonne de purification est Transférée à un tube de microcentrifuge propre de 1,5mL. 50 μL de tampon d'élution sont ajoutés au centre de la membrane de la colonne de purification puis centrifuger pendant 1 min. L'ADN purifié est stocké à -20°C.

Toutes les manipulations sont réalisées à température ambiante. Cette procédure permet de purifier environ 75% de l'ADN présent dans le gel pour des fragments de petites taille, et environ 50% pour les fragments de plus grande taille ($\geq 1,000\text{pb}$).

ANNEXE 07

Purification des produits PCR :

1- Fixation de l'ADN sur la membrane de la colonne :

Un volume (v/v) 1:1 du tampon de liaison est ajouté au produit de PCR. Bien mélanger. Il faut Vérifier la couleur de la solution. Une couleur jaune indique un pH optimal pour l'ADN lié à la membrane. Si la couleur de la solution est orange ou violette, 10 µL d'une solution d'acétate de sodium 3M, pH5.2 seront ajoutés puis homogénéisé. La couleur du mélange devient jaune.

Jusqu'à 800µL de la solution seront transférés de l'étape précédente vers la colonne de purification GeneJET. Une centrifugation à >12000 g pendant 30 à 60'S est effectuée. Le surnageant est éliminé.

2- Lavage de la colonne :

700 µL de tampon de lavage (dilué avec l'éthanol) sont ajoutés à la colonne de purification. Une centrifugation à >12000 g pendant 30 à 60'S. Le surnageant est éliminé, remettre la colonne de purification dans le nouveau tube de collection.

Centrifugez la colonne de purification vide pendant 1 min supplémentaire pour éliminer complètement tout tampon de lavage résiduel.

3- Elution de l'ADN :

La colonne de purification est Transférée à un tube de microcentrifuge propre de 1,5 mL. 50 µL de tampon d'éluion sont ajoutés au centre de la membrane de la colonne de purification puis centrifuger pendant 1min. La quantité de l'ADN est mesurée par la lecture de l'absorbance à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre Nano Drop. L'ADN purifié est stocké à -20°C.

ANNEXE 08

Extraction et Purification de l'ADN plasmidique :

Nb: Toutes les manipulations seront réalisées à température ambiante.

1- Une culture bactérienne de 12h est centrifugée à >6800 g pendant 3 min à température ambiante (15-25°C).

2- Le culot bactérien est resuspendu dans 250 μ L de Tampon de lyse P1 (additionné avec le réactif Lyse blue et une solution de RNase A), puis il est transféré dans un tube de microcentrifuge.

3- 250 μ L de Tampon de lyse P2 sont ajoutés, on mélange bien en inversant le tube 4-6 fois jusqu'à ce que la solution devient visqueuse signe que l'ADN est libéré.

4- 350 μ L de Tampon de neutralisation N3 sont ajoutés, on mélange immédiatement et vigoureusement en inversant le tube 4-6 fois jusqu'à ce que la solution devient blanchâtre, ce sont les protéines qui précipitent.

5- Une centrifugation est réalisée pendant 10 min à 17.900 g.

6- Le surnageant est transféré sur la colonne QIAprep spin. Une centrifugation à 17.900 g pendant 30 à 60'S est effectuée. Le surnageant est éliminé.

7- La colonne est lavée avec l'ajout de 750 μ L de tampon PE. Une centrifugation est réalisée. Le surnageant est éliminé. La colonne est transférée dans un autre tube de collection.

8- Une centrifugation additionnelle de 1min est réalisée afin d'éliminer le tampon de lavage résiduel dont l'éthanol.

9- La colonne est placée dans un tube de microcentrifuge propre de 1,5mL. 50 μ L de tampon d'éluion EB (10mM Tris.Cl, pH 8.5) ou l'H₂O sont ajoutés au centre de la membrane de la colonne QIAprep spin, puis laisser reposer pendant 1min et centrifuger pendant 1min.

Annexe 09

1- Dosage des sucres totaux (Dubois *et al.*, 1956)

L'acide sulfurique concentré provoque à chaud la déshydratation des oses avec la formation d'hydroxy-méthyl furfural (cas d'un hexose) et d'un furfural (cas d'un pentose). Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des composés colorés dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en oses.

Réactifs

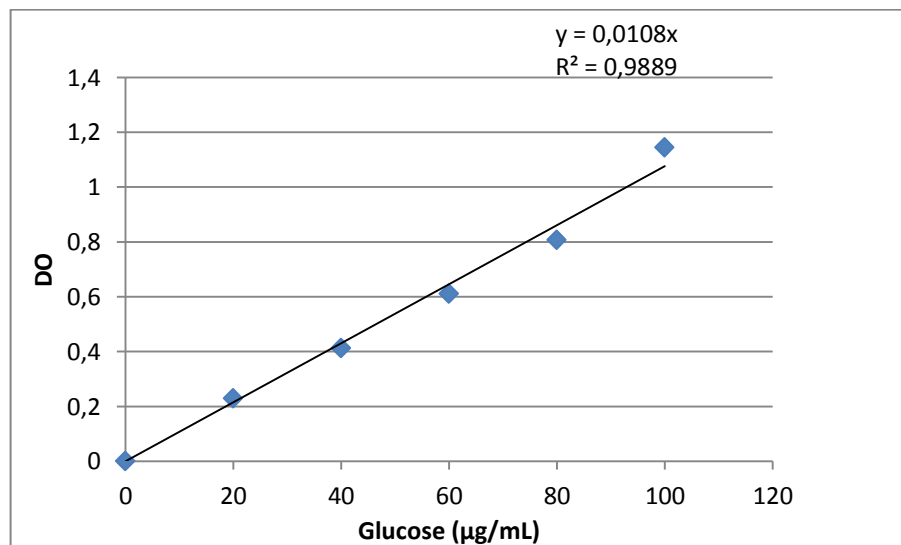
Phénol à 5% dans l'eau distillée.

Acide sulfurique concentré, $d = 1.84$

Protocole

1 ml d'échantillon, est ajouté à 1 ml de phénol à 5% et à 5 ml d'acide sulfurique concentré. Laisser reposer pendant 10 min à température ambiante, puis incuber à 30°C pendant 20 min. L'apparition du complexe jaune orange est suivie en mesurant la densité optique à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre par rapport à une gamme d'étalonnage établie avec une solution mère de 100 µg/ml de glucose.

Courbe étalon des sucres totaux



2- Dosage des protéines (Lowry *et al.*, 1951)

Cette méthode a pour principe le fait que le réactif de Folin-ciocalteu mis en présence d'une protéine est réduit en un complexe bleu. Elle est la résultante de deux réactions:

- Réaction de Biuret qui, en présence de sulfate de cuivre et en milieu alcalin, permet le dosage des liaisons peptidiques des protéines.
- Réaction du réactif de Folin sur la tyrosine, le tryptophane et dans une moindre mesure la cystine, la cystéine et l'histidine, qui entraînent une réduction par perte d'un à trois atomes

d'oxygène, et la fixation du cuivre par chélation faciliteront le transfert d'électrons vers ce réactif.

Réactifs

Solution A : Na₂CO₃ 2 % dans NaOH 0.1N.

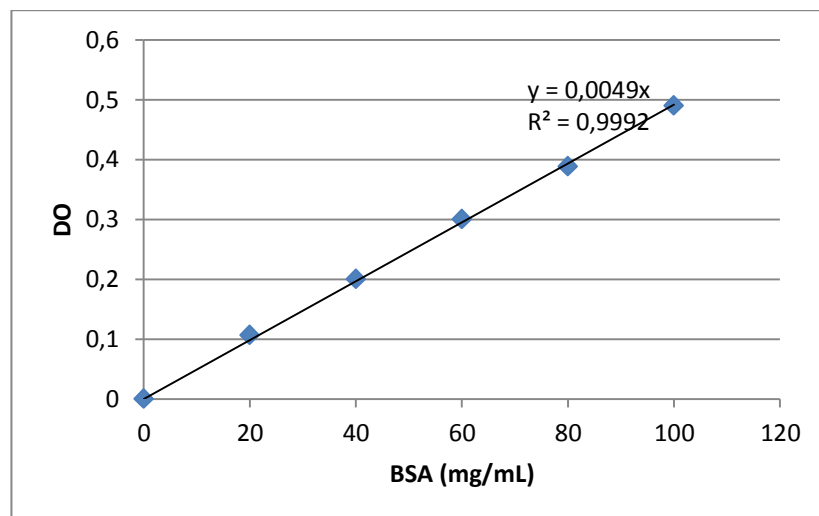
Solution B : CuSO₄, 5H₂O 1% dans l'eau distillée.

Solution C : Tartrate double de Na et K 2% dans l'eau distillée.

Solution M : 20 mL de la solution A+1 mL de la solution B+ 1mL de la solution C.

Solution E : Réactif de Folin-ciocalteu dilué au 1/10^{ème}.

Courbe étalon des protéines



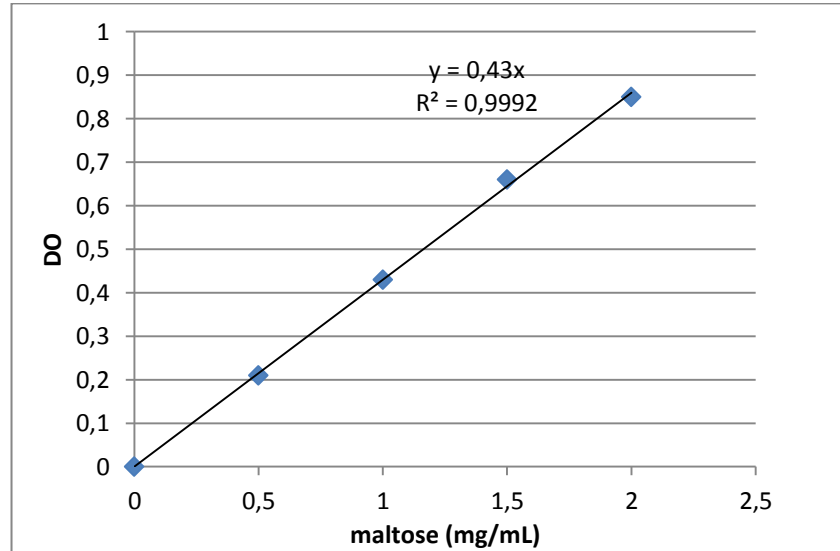
3- Dosage de l'activité enzymatique (Bernfeld, 1955)

L'activité de l' α -amylase est évaluée par l'hydrolyse de l'amidon par les extraits enzymatiques. L'amidon hydrolysé libère du maltose. L'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) est utilisé comme inhibiteur de l' α -amylase.

Réactif DNSA:

Dissoudre 1g de DNS dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée. Ajouter 30g tartrate double Na, K. Compléter à 100ml avec l'eau distillée, agité. Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière.

Courbe étalon Du maltose



4- Détermination de la matière sèche (Afnor, 1986)

Le taux de matière sèche exprimé en %, est donné par la formule suivante :

$$\% = (p_3 - p_1) \times 100 / p_2 - p_1$$

p1 : poids du creuset vide.

p2 : poids du creuset + la prise d'essai avant dessiccation

P3 : poids du creuset vide+ matière sèche après dessiccation

Matière sèche % = 100 – humidité %

5- Dosage des cendres et des minéraux (Afnor, 1986)

Le taux des cendres exprimé en %, est donné par la formule suivante :

$$\% = (p_3 - p_1) \times 100 / p_2 - p_1$$

p1 : poids du creuset vide.

p2 : poids du creuset + la prise d'essai avant incinération

P3 : poids du creuset vide+ matière sèche après incinération

La matière minérale = 100 - Les cendres %

6-Dosage de la matière azotée (Afnor, 1986)

Réactifs:

- Acide sulfurique concentré (d =1.84)
- Acide sulfurique 0.1 N
- Soude 0.1N
- Lessive de soude, à 33%
- Sélénium en poudre pur (catalyseur)
- Indicateur rouge de méthyle
- Papier pH ou papier tournesol
- Billes en verre ou pierre ponce

Matériels:

- Matras kjeldahl de 500ml
- Appareil à distiller
- Réchaud à gaz ou électrique
- Burette de 250 ml

Protocole:

Étape 1: minéralisation sulfurique

Introduire dans un matras Kjeldahl de 500 ml :

- 1 g d'échantillon
- 2 g de catalyseur (bien mettre en suspension l'échantillon au sein du catalyseur)
- 20 ml d'acide sulfurique concentré

Porter ensuite le matras sur une rampe chauffante, permettant l'aspiration des vapeurs sulfuriques. Prolonger le chauffage une demi- heure après décoloration complète, c'est-à-dire après que la solution soit devenue limpide. Laisser refroidir.

Étape 2: Alcalinisation distillation de l'ammoniaque

Verser dans le matras de Kjeldahl contenant le sulfate d'ammonium :

- 160 ml d'eau distillée
- 80 ml de lessive de soude à 33%

Ajouter quelques graines de pierre ponce pour régulariser l'ébullition. Pour le déplacement de l'ammoniaque, il faut ajouter la lessive de soude délicatement, une fois que l'appareil à distiller est prêt à fonctionner : Réfrigération assurée et extrémité de l'appareil plongeant dans un Erlen Meyer contenant 20 ml d'acide sulfurique 0.1N (l'extrémité de l'appareil doit être en contact avec le liquide). Vérifier la fin de la distillation en recevant quelques gouttes de distillat, soit sur un papier tournesol rouge, soit sur du papier pH.

Étape 3: Titrage

L'ammoniaque distillée, est reçu dans l'Erlen Meyer contenant l'acide sulfurique en excès (20 mL). On ajoute dans l'Erlen Meyer quelques gouttes de rouge de méthyle et on titre par la soude 0.1N l'acide sulfurique restant (proportion qui n'a pas réagi avec l'ammoniaque). Doser goutte à goutte avec la soude contenue dans la burette, jusqu'au virage au jaune pâle persistant.

Calculs:

Le pourcentage d'azote est déterminé selon la formule suivante :

$$N = 0.0014 \times V \times 100 / p$$

V : volume initial de l'acide sulfurique – volume de l'acide sulfurique restant qui n'a pas réagi avec l'ammoniaque

P : poids de l'échantillon

Le pourcentage d'azote par rapport à l'échantillon sec sera donc :

$$N = (0.0014 \times V \times 100) / p \times 100 / (100 - H)$$

H : l'humidité de l'échantillon.

Et pour obtenir une valeur appropriée du taux de protéines, il faut multiplier le taux d'azote par un coefficient déterminé expérimentalement, qui est égal à 6.25 dans notre échantillon.

7-Dosage de la matière grasse (Lecoq, 1965)

Réactifs:

- Acide chlorhydrique 1N
- Solution aqueuse de ferrocyanure de potassium à 10%
- Solution aqueuse d'acétate de zinc à 20%
- Sable purifié pour analyse
- Ether de pétrole
- Papier filtre

Matériels:

- Appareil de soxhlet
- Rotavapeur
- Réfrigérant
- Dessiccateur
- Ballon rode de 250ml

Protocole:

Peser 5 g de l'échantillon, ajouter 50 ml d'acide chlorhydrique et faire bouillir pendant 5mn puis laisser reposer. Si le liquide n'est pas clair, ajouter 1 ml de solution d'acétate de zinc à 20% et 1 ml de solution de ferrocyanure de potassium à 10%. Filtrer sur un filtre mouillé, contenant 5 g de sable purifié, puis sécher à l'étuve à 105°C. Extraire le papier filtre séché et résidu avec de l'éther de pétrole pendant 2 heures dans un soxhlet, dont le ballon aura été taré. Broyer le résidu et extraire de nouveau pendant 1 heure. Chasser par distillation sous vide sur un rotavapeur la totalité du solvant contenu dans le ballon, en condensant les vapeurs de solvant à l'aide d'un réfrigérant descendant. Sécher ensuite à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant.

Calculs:

Le poids des matières grasses totales est déterminé selon la formule suivante :

$$\mathbf{P = P1 - P2}$$

P : poids de la matière grasse contenue dans l'échantillon.

P1 : poids du ballon avant extraction

P2 : poids du ballon après extraction

Le taux de la matière grasse par rapport au produit sec sera donc :

$$\mathbf{P \times 100 / (100 - H)}$$

H : humidité du produit

Annexe 10**Tableau de précipitation au sulfate d'ammonium**

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

Annexe 11**Tampon TE**

Tris-Hcl (1M).....5mL
EDTA (0.5M).....1mM
Eau distillée500mL
PH= 8

Tampon Tris-HCl

Tris-HCl20mM
Nacl150mM
Eau distillée1000mL
PH= 7.5

Tampon Glycine-HCL

Glycine 0.2M25mL
HCl 0.2Mx mL
Eau distillée100mL

x (mL)	pH
22.0	2.2
16.2	2.4
12.1	2.6
8.4	2.8
5.7	3.0
4.1	3.2
3.2	3.4
2.5	3.6

Tampon Sodium acétate

Acide acétique0.1N

Acetate de sodium0.1N

acetic acid	sodium acetate	pH
185	15	3.6
176	24	3.8
164	36	4.0
147	53	4.2
126	74	4.4
102	98	4.6
80	120	4.8
59	141	5.0
42	158	5.2
29	171	5.4
19	181	5.6

Tampon phosphateNaH₂PO₄ (A).....0.2MNa₂HPO₄ (B).....0.2M

Mélanger les volumes appropriés de stock et ajouter un volume égal d'eau distillée pour faire une concentration finale de 0,1 M

A (ml)	B (ml)	pH
92.0	8.0	5.8
87.7	12.3	6.0
81.5	18.5	6.2
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
8.5	91.5	7.8
5.3	94.7	8.0

Tampon Glycine-NaOH

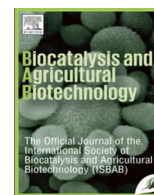
Glycine 0.2M25mL

NaOH 0.2Mx mL

Eau distillée100mL

x (mL)	pH
2.0	8.6
3.0	8.8
4.4	9.0
6.0	9.2
8.4	9.4
11.2	9.6
13.6	9.8
19.3	10.4
22.75	10.6

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE



Original Research Paper

Statistical optimization of cultural conditions of an halophilic alpha-amylase production by halophilic *Streptomyces* sp. grown on orange waste powder

Oussadi Mouna imen^{a,b}, Kitouni Mahmoud^{b,*}^a Laboratoire de Génie microbiologie et applications, Université Constantine 1, Campus ChaâbatErssas, 25000 Constantine, Algeria^b Laboratory of Applied Biology and Health, Faculty of Natural Sciences and Life, University Constantine 1, Ain El Bey street, 25000 Constantine, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2015

Received in revised form

23 July 2015

Accepted 21 August 2015

Available online 24 August 2015

Keywords:

Streptomyces sp.

α-amylase

Orange waste

Optimization media

Plackett–Burman design

Statistical optimization

Submerged fermentation (SmF)

ABSTRACT

A newly isolated strain from the water of the salt marsh of Ain Mlila in Algeria identified as *Streptomyces* sp. 20r was investigated for its potential to produce amylolytic enzymes. The production optimization of α-amylase using an agroindustrial residue (orange waste) as the sole carbon source was performed with statistical methodology based on Plackett–Burman experimental designs. Among the various parameters screened, the effects of various carbon and nitrogen sources were investigated. The production of the α-amylase, proteins and biomass was achieved using the statistical method of Plackett–Burman design at $N=24$, namely 24 experiments and 23 factors in which 19 are real ones and 4 dummy. The production medium is prepared using orange waste powder at 30 °C under agitation. Statistical analysis showed that the changes in substrate concentration (5–15%), NaCl (0–6.5%), inoculum size (5–10%) and pH (5–9) were positively affecting the production and giving the highest level of α-amylase activity corresponded to 8.26 U/mL in submerged fermentation after 5 days of cultivation.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

α-amylases is one of the most important enzymes in present day biotechnology, this enzymes are gaining more importance because their spectrum of application has widened in many fields such as clinical, medicinal pharmaceutical and analytical chemistry. Besides their use in starch saccharification they also find applications in food, baking, brewing, detergent, textile and paper industries (Agger et al., 2001). Amylases represent one of the three largest groups of industrial enzymes and account for approximately 25% of the total enzyme sales worldwide (Li and Yu, 2011). With the development of effective techniques large scale production of α-amylase becomes an attractive business (Zangirolami et al., 2002). Maximum enzyme production is one of the most important goals in biotechnological processes by optimizing the cultural conditions such as inoculum size, temperature, pH, agitation, aeration and dissolved oxygen etc.

α-amylases can be derived from several sources, including plants, animals and microorganisms. Microbial α-amylases have a broad spectrum of industrial applications as they are more stable than with plant and animal and they can be obtained cheaply

(Grupta et al., 2003), also the major advantage is the economical bulk production capacity and microbes are easy to manipulate to obtain enzymes of desired characteristics (Lonsane and Ramesh, 1990). Several microbial α-amylases are available commercially and they have almost completely replaced the chemical hydrolysis in over 75% of starch hydrolyzing processes due to many advantages, not least its highest yields (Tonkova, 2006). It has been found in several microorganisms like bacteria (Chakraborty et al., 2012), fungi (Djekrif-Dakhmouche et al., 2006) and actinobacteria (Sivakumar et al., 2012). Actinobacteria, specifically *Streptomyces*, are one of the most investigated groups because they constitute a potential source of biotechnologically interesting substances. α-amylases are widely distributed in the species of *Streptomyces* (Singh et al., 2011). Starch hydrolysis, catalyzed by α-amylase, is one of the most important large scale uses of Actinomycetes in terms of enzymatic processes. The fact that some enzymes have the particular capacity to convert starch into shorter polymers of glucose units has made α-amylase the subject of several studies in recent years for this kind of process. Production of α-amylase using synthetic media is very expensive and uneconomical. Those media therefore have to be replaced with more economically available agro-industrial residues to reduce the cost (Balkan and Ertan, 2007). For these reasons, certain agricultural, industrial and environmental wastes were investigated for their ability to induce α-amylase production. Designing an appropriate fermentation

* Corresponding author.

E-mail address: mahmoukitouni@yahoo.fr (K. Mahmoud).

medium is of crucial importance because the medium composition can significantly affect the product yield. For commodity products, the cost of the medium can substantially affect the overall economics of the process (Silva and Roberto, 2001).

In Algeria, orange-processing industry rejects hundreds of thousands of tons of waste per year, which cause serious environmental problems (Djekrif-Dakhmouche et al., 2006). The accumulation of large amounts of orange waste as well as environmental considerations and to avoid health hazards due to the unsatisfactory disposal methods require the necessity to find alternative solutions for the recovery of such wastes. Any waste could be considered as raw material as long as there is an option to develop methods for its valorization according to current environmental legislation, (Möller et al., 2001). High added value products can be produced using orange peel waste as a potentially valuable low cost resource (Rivas et al., 2008; Balu et al., 2012). According to Rivas et al. (2008) orange peel waste contains 16.9% soluble sugar, 9.21% cellulose, 10.5% hemi-cellulose and 42.5% pectin as the most important components. Among the different methods cited in the literature for the recovery of orange waste, their use in the production of enzyme is the most interesting (Siles and Thompson, 2010).

Submerged fermentation (SmF) has been traditionally used for the production of industrially important enzymes (Approximately 90%) because of the ease of handling and greater control of environmental factors such as temperature and pH. It is well established that extracellular enzyme production by microorganisms is greatly influenced by media components, especially carbon and nitrogen sources, minerals and physicochemical factors such as pH and inoculum density, thus the optimization of media components and cultural parameters is the primary task in a biological process. Experimental designs are excellent techniques for optimization of culture conditions to achieve optimal production (Djekrif-Dakhmouche et al., 2006; Cotârlet, 2013). It is well known that medium optimization is approached by either empirical or statistical methods, but the classic or empirical methods have several limitations toward complete optimization (Djekrif-Dakhmouche et al., 2006). The recent strategy is statistical optimization, which allows rapid screening for a number of factors and factor interactions, reflecting the role of each component. Statistical methods have been applied for the optimization of α -amylase (Dey et al., 2001; Abou-Elela et al., 2009; Cotârlet, 2013). A statistical approach has been employed in the present study for which a Plackett–Burman design is used for identifying significant variables influencing α -amylase production under SmF by *Streptomyces* sp.

2. Materials and methods

2.1. Selection of amylase-producing actinomycetes

The Actinomycetes strains used in this study were isolated from samples of water, soil and tree barks collected at two sites located in the northeast of Algeria (Kitouni et al., 2005). Stock cultures were maintained on agar in inclined tubes and spore suspensions were prepared in liquid Bennett medium after cultivation (30 °C/5 days) in this same medium. Spores were maintained in 50% glycerol, 50% Bennett medium (v/v) at –20 °C. Fourteen strains were tested for the production of α -amylase. Cells were spotted in duplicates on malt yeast extract agar (Shirling and Gottlieb, 1966) containing (g/L): Beef extract 3.0, peptone 10.0, soluble starch 2.0, agar 15.0, pH 7.2. Amylase-producing strains were identified, after an incubation period of 3 days at 30 °C, by the addition of lugol solution 0.1% and observing a clearing zone surrounding the culture.

2.1.1. Halo assay

For selecting the most producing of α -amylase, cells were spotted on starch (0.2%)/NB plate and digestion of starch was detected with I₂/KI solution to form halo and the colonies with the largest halo-forming zone were chosen for further investigations (Tatsinkou et al., 2005). In the present study the strain 20r was chosen and the sequence of its 16S rRNA gene was determined and submitted to GenBank under accession number KP314280.

2.2. Substrate and culture media

Orange waste was procured from the UNAJUC a juice production firm of Ramdhan Djamel, Skikda, Algeria. The chemical composition of the waste according to the analyzes of the firm is as follows (%): total sugar 44.5 ± 1.65; crude protein 3.71 ± 0.05; crude fat 0.39 ± 0.001 and Ash 3.46 ± 0.27. The waste is air dried and then passed through a sieve of 0.250 mm diameter and stored in sealed boxes: 5% and 10% of the suspension of orange waste are prepared with distilled water. They are well mixed and centrifuged (6000 rpm). The supernatant is used as a basal medium after dilution with 0.1 M phosphate buffer at pH 5 and its enrichment with various substances. In order to determine the factors significantly influencing α -amylase production the Plackett and Burman design was used. The composition of the production medium varies according to the design matrix.

2.3. Inoculum preparation

Streptomyces sp. (20r), 5 days old, were harvested from plates by adding ten milliliters of distilled water. The spores were dislodged with a platinum loop under aseptic conditions. Then it was, appropriately diluted for the required density of spores and used as the master suspension (Solis-pereira et al., 1993).

2.4. Fermentation conditions

Streptomyces sp. (20r) strain was cultivated in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of a growth medium, as described above, supplemented with a carbon and nitrogen sources at different concentrations according to Table 1 generating 24 different runs. The contents were thoroughly mixed; the cotton plugged flasks were autoclaved at 121 °C (15 psi) for 20 min. After cooling the medium, they were inoculated with 10 and 5% of a spore suspension (DO₆₀₀=0.68), kept on a rotary shaker at permanent conditions for 5 days at 30 °C, 140 rpm (orbital shaker New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA). Their whole content filtered to separate cells from the supernatant. The contents of the flasks were centrifuged at 6500 rpm at 4 °C for 20 min, filtered through a Whatman filter N°2 and the crude supernatants used for enzymatic assays.

2.5. Experimental design and statistical analysis

The present study was aimed at screening the important medium components with respect to their main effects by Plackett–Burman design. The Plackett–Burman experimental design is a two-factorial design, which identifies the critical physico-chemical parameters required for elevated α -amylase production by screening n variables in $n+1$ experiments (Plackett and Burman, 1946). Twenty three variables chosen for the present study which nineteen real variables and four dummy.

The experimental design for the screening of the variables is given in (Table 2). The columns represent different variables and the rows represent different experiments. To estimate the experimental error four variables (X3, X12, X16 and X19) are designed as dummy variables

Table 1
Relationship between the coded levels and the actual levels of the used 19 factors.

Factors		Levels	
		(+) High	(-) Low
X1	Orange waste (g/L)	15% (150)	5% (50)
X2	Starch (g/L)	1% (10)	0
X3	Dummy 1	–	–
X4	Saline solution (mL/L)	1 mL (0.1%)	0
X5	CaCl ₂ (g/L)	0.1% (1)	0
X6	NaCl (g/L)	6.5% (65)	0
X7	Glycérol (mL/L)	0.02% (0.2)	0
X8	Inoculum size (mL/L)	10% (100)	5% (50)
X9	pH	9	5
X10	Tween 80 (mL/L)	1% (10)	0
X11	Corn Steep Liquor (mL/L)	1 mL (0.1%)	0
X12	Dummy 2	–	–
X13	Yeast extract (g/L)	0.1% (1)	0
X14	Peptone (g/L)	1% (10)	0
X15	Tryptone (g/L)	0.1% (1)	0
X16	Dummy 3	–	–
X17	Urea (g/L)	0.1% (1)	0
X18	Casein (g/L)	0.1% (1)	0
X19	Dummy 4	–	–
X20	Ammonium sulfate (g/L)	0.5% (5)	0
X21	Beef extract (g/L)	1% (10)	0
X22	Ammonium phosphate (g/L)	0.1% (1)	0
X23	Sodium Nitrate (g/L)	0.1% (1)	0

All the variables are denoted as numerical factors and investigated at two widely spaced intervals designated as –1 (low level) and +1 (high level) (Table 1).

The Plackett–Burman design assumes that there are no interactions between the different media constituents, X_i in the range of variables (factors) under consideration. A linear approach is considered to be sufficient for screening.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \varepsilon \quad (1)$$

Where Y is the experimental response, β_0 the main effects of the factors, β_i are the regression coefficients, ε is a random error. The Plackett–Burman experimental design is a fractional factorial design and the main effect of such a design may be simply calculated as the difference between the average of measurements made at the highest level (+1) of the factor and the average of measurements at the low level (–1). All experiments were carried out in duplicate. The first order polynomial coefficients were calculated and analyzed using the 'R' software (version 2.14.1 (2011–12–22) statistical package.

The effect of individual parameters on the α -amylase production was calculated by the following equation:

$$E = \frac{(\sum(Y+) - \sum(Y-))}{N} \quad (2)$$

Where, (E) is the effect of the parameters under study and ($Y+$) and ($Y-$) are responses (α -amylase, proteins and biomass) of trials at which the parameter was at its higher and lower levels, respectively, and N is the total number of trials.

2.6. Enzyme assay

α -amylase enzyme was assayed according to the method described by Bernfeld (1955). The reaction mixture contained 0.5 mL of 1% (w/v) soluble starch in 0.1 M phosphate Buffer and 0.5 mL enzyme. The reaction was incubated for 30 min at 40 °C. The reaction was stopped, by the addition of 1 mL of dinitrosalicylic acid and boiled for 5 min in a boiling water bath and cooling, 10 mL of distilled water was added and the color was measured at 540 nm. One unit of α -amylase activity was defined as the amount of

enzyme that produced, reducing sugar equivalent to 1 μ mole of maltose per mL per min under the assay conditions.

2.7. Proteins

Proteins are quantified using the Folin–Ciocalteu method (Lowry et al., 1951). Bovine serum albumin [BSA (sigma)] was used as standard.

2.8. Biomass

Biomass was harvested by paper filtration (Watman paper N°2), washed with distilled water and determined by constant weight for 24 h at 105 °C.

3. Results and discussion

3.1. Selection of amylase-producing actinomycetes

The screening data for α -amylase-producing actinomycetes (Table 3) demonstrate that although three strains were prominent, among twelve actinomycetes, which showed a zone of clearance surround the microbial growth in starch medium, the actinomycete *Streptomyces* sp. (20r) strain was chosen due to its good growth and sporulation characteristics. This microorganism was isolated from water of the salt marsh in Ain Mlila (Constantine, Algeria).

3.2. Screening of significant variables using Plackett–Burman design

Commercialization of new industrial enzyme is generally limited by the high cost of production. However, the cost of culture medium represents 30–40% of the total production cost (Bayoumi et al., 2008). At the same time, unused agro-industrial wastes are accumulated in large quantities, resulting in considerable dangers for the health and the environment. In the recent years, applications of the agro-industrial residues have represented an alternative step to replace the pure and costly raw materials. Use of these materials could help to solve many environmental problems and thus contribute to the cost reduction of production of enzymes (John et al., 2006).

Different sources of lignocellulose, such as orange and citrus waste, wheat bran, rice husk and sugarcane bagasse have been utilized to produce various extracellular enzymes (Mohamed et al., 2010, Demir et al., 2012). However, α -amylase production from these substrates has been reported only rarely. While there are several reports on the control of extracellular α -amylase production by actinobacteria, optimization of cultivation conditions is expected to improve the enzyme production. In this study, optimization of α -amylase production by an halophilic actinobacterium using a statistical design was investigated.

The most widely used statistical experimental designs are Plackett–Burman design and central composite design (Broedel et al., 2001). Advantages of the designs include simplicity and assessment of a large number of factors on the relative efficiency of the production process. Optimization of culture conditions of α -amylase production by *Streptomyces* sp. erumpens MTCC7314 under submerged fermentation was reported by Kar and Ray (2007), but it did not deal with statistical optimization of the process. Cotârlet (2013) reported the use of statistical design for the production of α -amylase by the psychrotrophic *Streptomyces* MIUG 4 Alga.

A total of 23 medium components were analyzed with regard to their effects on α -amylase, proteins and biomass production by *Streptomyces* sp. (20r), the experimental design protocol along

Table 2
Experimental design and results of the biomass, proteins and α -amylase production.

Run order	Factors																							Activity (U/mL)	Proteins (g/L)	Biomass (g/L)	
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23				
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3.873	3.06	21.2
2	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1.251	0.63	5.7
3	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	3.237	0.818	2.92
4	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1.132	0.912	3.64
5	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	2.307	0.558	3.38
6	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1.665	1.238	1.66
7	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	3.133	1.59	3.04
8	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1.757	0.86	4.6
9	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	3.356	3.542	7.1
10	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	0.533	1.709	6.36
11	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	0.318	1.688	3.36
12	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	2.127	3.118	14.22
13	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	2.127	3.246	12.58
14	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	0.772	2.189	8.86
15	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1.529	1.773	2.34
16	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	2.021	3.870	9.92
17	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	5.021	4.146	21.68
18	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	1	0.930	2.218	9.28
19	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	2.505	3.943	8.1
20	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1.471	3.034	14.58
21	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	4.773	4.379	17.32
22	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	2.013	4.372	17.594
23	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	2.772	4.255	11.22
24	1	1	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8.263	4.357	17.78

Table 3
Screening on agar plate of α -amylase-producing actinomycetes, through hydrolysis zones on soluble starch medium.

Strains origin	Amylase activity on Petri dish			
	-	+	++	+++
Soil of sebkha	2	2	1	0
Water of sebkha	0	1	1	1
Water of lake	0	2	0	0
Barks of Cedar	0	2	1	1
Total	2(14.3%)	7(50%)	3(21.4%)	2(14.3%)

Hydrolysis zone: (-) negative; (+) weak (< 2.0 cm diameter); (++) medium (2.0 < x < 3.0 cm diameter); (+++) strong (> 3 cm diameter)

with responses of different experimental trials is shown in Table 2. Adequacy of the model was calculated and the variables evidencing statistically significant effects were screened for each factor (Table 4).

For a minimal probability of significance 90%, all variables with a probability at or above 90% are accepted and considered with an effect on the response (the production of α -amylase, proteins and biomass).

Regression analysis suggested that the level of α -amylase was significantly affected by only five independent variables which one dummy (X_3) out of Twenty three tested independent variables. These five independent variables showing significant effects at $(1-\alpha) \geq 90\%$ were orange waste percent with an effect of 2.090 ($p \geq 100\%$) was determined to be the most significant factor in α -amylase production followed by pH (1.297) ($p \geq 99\%$), NaCl (1.112) ($p \geq 97.8\%$), inoculum size of the production medium (0.722) ($p \geq 91.1\%$) and dummy (X_3) 0.689 ($p \geq 90.1\%$). Whereas peptone (-0.683) ($p \geq 10.1\%$), sodium nitrates (-0.699) ($p \geq 9.6\%$), glycerol (-0.701) ($p \geq 9.5\%$) and beef extract (-0.714) ($p \geq 9.1\%$) exerted a negative insignificant effect on the α -amylase production.

However, in this study the two variables CaCl_2 and starch, which, are two main factors that influencing the production of α -amylase according to the literature, has no effect on the enzyme production estimated at ($p \geq 60.7\%$) (0.143), ($p \geq 66.4\%$) (0.223) respectively. The highest activity was found in run 24, where all the significant medium components (orange waste percent, pH, NaCl, inoculum size) were present and at their highest levels, while runs 10 and 11 showed the lowest activity of 0.533 and 0.318 U/mL respectively. This could be related to the absence of the significant variables despite the presence of inducers (Starch) in run 10.

The effect of orange waste on the production of proteins and biomass is positive ($p \geq 100\%$). The variation in pH from 5 to 9 leads to a positive effect ($p \geq 100\%$) on the production of biomass. On the contrary, its effect on the production of proteins is negative ($p \geq 23.7\%$), which causes a decrease in the biomass. The NaCl shows no effect on the production of proteins while its effect on biomass is clearly positive ($p \geq 100\%$). The inoculum size shows no effect on the production of proteins and biomass. The addition of starch stimulates the protein synthesis and have a positive effect on the biomass production ($p \geq 96.9\%$), ($p \geq 100\%$) respectively. As for the presence of the CaCl_2 , its effect on the production of proteins is not significant, while it has a positive effect on the production of biomass ($p \geq 100\%$).

Considering the results displayed in Table ((4) and (5)) and after exclusion of the insignificant model terms (based on their insignificant P -values > 0.1) the reduced polynomial equations (1) may be written as follows:

For α -amylase production:

$$Y = 2.45 + 2.09X_1 + 1.112X_6 + 0.722X_8 + 1.297X_9 + 0.014 \quad (3)$$

Where X_1 =Orange waste, X_6 =NaCl, X_8 =Inoculum size, X_9 =pH.

For proteins production:

$$Y = 2.563 + 2.188X_1 + 0.554X_2 + 0.431X_{21} + 0.519X_{23} + 0.061 \quad (4)$$

Where X_1 =Orange waste, X_2 =Starch, X_{21} =Beef extract, X_{23} =Sodium Nitrate.

For biomass production:

$$Y = 9.518 + 7.923X_1 + 6.203X_2 + 1.690X_4 + 2.214X_5 + 4.220X_6 + 1.070X_9 + 0.431X_{13} + 1.294X_{20} + 1.064X_{21} + 2.266X_{22} + 2.180X_{23} + 0.024 \quad (5)$$

Where X_1 =Orange waste, X_2 =Starch, X_4 =Saline solution, X_5 = CaCl_2 , X_6 =NaCl, X_9 =pH, X_{13} =Yeast extract, X_{20} =Ammonium sulfate, X_{21} =Beef extract, X_{22} =Ammonium phosphate, X_{23} =Sodium Nitrate.

Here, the statistical process of α -amylase production by *Streptomyces* sp. (20r) was studied thoroughly from the standpoint of low cost effectiveness in conjunction with appreciable yield. In the course of search for low cost effective medium composition to simultaneously support the growth of *Streptomyces* sp. (20r) and induce α -amylase production. Different sources of carbon (orange waste, starch, glycerol, tween 80 had been introduced into the fermentation broth as α -amylase inducers. Our data demonstrated that there exists a profound impact imposed by the carbon source on the production of α -amylase from *Streptomyces* sp. (20r) present finding reveals that orange waste as a sole source of carbon is a superior α -amylase inducer comparable with other synthetic carbon sources, resulting increases of 85.17% of enzymatic production, treatment of orange waste is an effective way to realize the high potential of this underutilized residue. The biomass left over after extraction, mainly consists of lignocellulose, which is an excellent sugar source that supports the growth of microorganisms able to generate other high value products. The agro-industrial orange waste seems to be a rich substrate that could simultaneously provide the bacterium with all elements needed during the course of bacterial growth and enzymatic induction. This finding greatly alleviates the cost of the α -amylases production medium. In accordance with our findings, orange peel waste was the best inducer of α -amylase from *A. nidulans* under solid state fermentation (Shahera et al., 2002). It was demonstrated that citrus peel had a high activity of α -amylase (Mohamed et al., 2010). Embaby et al. (2014) and Demir et al. (2012), reported that the production of another enzyme polygalacturonase from *Bacillus licheniformis* SHG10 and *Aspergillus sojae* M3 respectively was tested on the orange peel in submerged state fermentation. Utilization of orange waste has, however, not been tested for α -amylase production by *Streptomyces* sp.

In the present investigation, *Streptomyces* sp. (20r) exhibited a positive effect, when orange waste was used as substrate, followed by a polysaccharide which is starch; it has no effect on the production of α -amylase (0.223) and slightly increases the production with 9.08% but not significantly stimulates it. Present result is in disagreement with that of (Narayana and Vijayalakshmi, 2008) who reported that starch was found to be the best substrate, showing maximum enzyme activity. However, in accordance with our findings, (Singh et al., 2011) demonstrated that D-inositol and D-sorbitol were found to be best inducers for α -amylase production, followed by the starch. The α -amylase synthesis necessitates, therefore, the presence of starch, an enzyme substrate, because of its inductive effect (Ray, 2001) and its role in stabilizing the enzyme (Aguilar et al., 2000), but amylase production by this strain was constitutive since biosynthesis of the enzyme took place not

Table 4
The effects of the explicative factors on the production of α -amylase, proteins and biomass.

Factors	α -amylase				Proteins				Biomass			
	Estimate of coefficients	Test value	P value	Signification of probability	Estimate of coefficients	Test value	P value	Signification of probability	Estimate of coefficients	Test value	P value	Signification of probability
X1: Orange waste	2.090	4.023	< 0.001	100%	2.188	7.764	< 0.001	100%	7.923	39.918	< 0.001	100%
X2: Starch	0.223	0.429		–	0.554	1.966	0.031	96.90%	6.203	31.252	< 0.001	100%
X3: Dummy	0.689	1.326	0.099	90.1%	0.35	1.242	–	–	0.16	0.806		–
X4: Saline solution	0.085	0.164		–	0.141	0.5	–	–	1.69	8.515	< 0.001	100%
X5: CaCl ₂	0.143	0.275		–	–0.026	–0.092	–	–	2.214	11.155	< 0.001	100%
X6: NaCl	1.112	2.140	0.022	97.8%	0.102	0.362	–	–	4.22	21.261	< 0.001	100%
X7: Glycérol	–0.701	–1.349		–	–0.493	–1.749	–	–	–2.414	–12.162		–
X8: Inoculum size	0.722	1.390	0.089	91.1%	–0.164	–0.582	–	–	–1.16	–5.844		–
X9: pH	1.297	2.496	0.01	99%	–0.205	–0.727	–	–	1.07	5.391	< 0.001	100%
X10: Tween 80	–0.043	–0.083		–	–0.524	–1.859	–	–	–0.967	–4.872		–
X11: Corn Steep Liquor	–0.210	–0.404		–	–0.035	–0.124	–	–	–0.797	–4.015		–
X12: Dummy	0.129	0.248		–	–0.119	–0.422	–	–	0.157	0.791		–
X13: Yeast extract	0.343	0.660		–	–0.328	–1.164	–	–	0.341	1.718	0.05	95%
X14: Peptone	–0.683	–1.315		–	–0.371	–1.317	–	–	–0.234	–1.179		–
X15: Tryptone	–0.280	–0.539		–	–0.474	–1.682	–	–	–0.986	–4.968		–
X16: Dummy	0.004	0.008		–	–0.054	–0.192	–	–	–0.311	–1.567		–
X17: Urea	–0.369	–0.710		–	–0.111	–0.394	–	–	–0.096	–0.484		–
X18: Casein	0.535	1.030		–	–0.173	–0.614	–	–	–0.35	–1.763		–
X19: Dummy	–0.767	–1.476		–	–0.422	–1.497	–	–	–0.103	–0.519		–
X20: Ammonium sulfate	0.133	0.256		–	–0.073	–0.259	–	–	1.294	6.52	< 0.001	100%
X21: Beef extract	–0.714	–1.374		–	0.431	1.529	0.07	93%	1.064	5.361	< 0.001	100%
X22: Ammonium phosphate	–0.199	–0.383		–	0.282	1.001	–	–	2.266	11.417	< 0.001	100%
X23: Sodium Nitrate	–0.699	–1.345		–	0.519	1.842	0.039	96.10%	2.18	10.983	< 0.001	100%

only in the presence of starch, but also with other carbon sources (Mamo and Gessesse, 1999).

The tested ranges (5–9) of the initial medium pH result a significant increase of 52.85% in α -amylase production. These results clearly indicate the alkaline nature of amylase enzyme from strain *Streptomyces* sp. (20r). This result is in good agreement with Chakraborty et al. (2009) and Syed et al. (2009) which reported that the enzyme exhibited an optimal activity at pH 9.0 by *Streptomyces* sp. D1., *Streptomyces gulbargensis* respectively. Present finding is in disagreement with (Gangadharan et al., 2008), who found that the synthesis of the extra-cellular α -amylase is not affected by the pH of the medium. Actually, research was focused on the isolation of alkaline amylase enzymes from microbes because there is tremendous potential of alkaline enzymes in the detergent industry (Kondepudi and Chandra, 2008).

Haloalkaliphilic microorganisms not only require an alkaline pH, but high salt for growth and enzyme production (Margesin and Schinner, 2001). In our study, the addition of 6.5% (1.11 M) of Sodium chloride increase the production of 45.31%. Moderately halophilic bacteria that grow optimally in media containing 3–15% NaCl (Margesin and Schinner, 2001), may be a source of halophilic α -amylases. Enzyme activity over a board range of salt concentrations (0–4 M) has been observed in halophilic amylases from *N. halobia* (Onishi and Sonada, 1979) *Halomonas meridiana* (Coronado et al., 2000), *Bacillus dipsosauri* (Deutch, 2002) *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 (Prakash et al., 2009) and *Halobacterium halobium* (Good and Hartman, 1970). Therefore, they can be used in many harsh industrial processes where solutions containing high salt concentration would inhibit many enzymatic conversions (Ventosa and Nieto, 1995). To the best of our knowledge, there are no reports on raw starch digesting and halophilic amylases.

Many metal ions often influence the activity of amylase (Zhu et al., 2007). Most of the α -amylase is known to be a calcium metalloenzyme and in most of the cases, Ca^{2+} ions are required for maintaining the spatial conformation of the enzyme, thus play an important role in enzyme stability (Chessa et al., 1999). In this study, addition of Ca^{2+} had no effect on enzyme activity. It was not required for it. Ca^{+2} ion exhibited neither inhibitory nor potentiating activity on amylase activity. This clearly shows that amylase from *Streptomyces* strain 20r is calcium independent, Ca^{2+} independent amylase merits consideration for starch liquefaction, especially in the manufacture of fructose sirup (Tonkova, 2006). A similar result was also observed with α -amylase from *B. thermooleovrans* (Malhotra et al., 2000), *Streptomyces* MIUG 4 Alga (Cotârlet, 2013), *Streptomyces* sp. ML12 (Sivakumar et al., 2012). Otherwise Zhu et al. (2007) demonstrated that *Streptomyces* sp, suggesting its calcium-dependent nature. *Bacillus* sp. ANT-6 also showed increased activity in the presence of Ca^{2+} ions (Burhan et al., 2003).

Statistical analysis showed that inoculum size is among the most important factors affecting α -amylase release; it affects enzyme production positively by increasing by 29.42%. (Abou-Elala et al., 2009) proved in their research that inoculum size was the most significant variables affecting enzyme production in *No-cardiopsis aegyptia*. The great importance of inoculum size on the production of α -amylase was already reported. The size of inoculum was recognized as being the most controlling parameters on the production of α -amylase by *A. oryzae* (Kammoun et al., 2008). Similarly, (Mulimani et al., 2000) reported that inoculums volume per gram of substrate was among the most effective parameters in stimulating amylase production by *Gibberella fujikuroi*. On the other hand (Gangadharan et al., 2008) demonstrate that the tested range of inoculum did not result in any significant variation in α -amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*.

Literature offers information that organic nitrogen source, such

as corn steep liquor casein and yeast extract have an edge over inorganic sources as they also have trace mineral and ions that could enhance the production of the enzyme, but in our investigation, The Plackett–Burman experimental design showed that among organic and inorganic nitrogen source no one played a role in enzyme production with respect to the other selected parameters. All nitrogen sources exerted a negative effect on the α -amylase production, whereas casein, yeast extract and ammonium sulfate did not affect it (0.535, 0.343, 0.133) respectively. These results may be explained by the fact that orange waste provides a nitrogen source, which are necessary for the bacterial growth and consequently the enzyme production (Souci et al., 1994). On the other hand, it is probably due to the excessive amount of the nitrogen source, which may inhibit the production of the enzyme when concentration exceeds a critical value (Pedersen and Nielsen, 2000); this decrease may also be caused by the simultaneous addition of two complex nitrogen sources (Mctigue et al., 1994). On the basis of analysing the results, we may conclude that microorganisms necessitate a low level of nitrogen in order to produce enzymes because nitrogen may be a limiting factor (Mctigue et al., 1994; Pedersen and Nielsen, 2000). Contrasting results were presented by (Chakraborty et al., 2012) in which the presence of all nitrogen sources, both organic and inorganic, supported the growth and amylase production in *Streptomyces* strain A3.

One dummy in our case have a significant effect with a probability of ($p \geq 90\%$). Normally, if there is no interaction between the studied variables, or errors in the measurement of the response (production of α -amylase). The effects of dummy are equal to zero, the values found can be explained by the fact that the matrices experience of Plackett–Burman experience and view the highest order of fractionation effects are confounded with simple interaction of second order or more so the dummy can be confused with a significant interaction effect or dummy are due to truly errors measurements or assays performed.

4. Conclusion

The α -amylase in this research possesses some unique properties, making this strain valuable on an industrial scale. In the present work, we have demonstrated the optimization of *Streptomyces* sp. 20r culture conditions and media composition by a factorial experimental design leading to a substantial increase in α -amylase production yield. This strategy proved to be a useful and powerful tool for screening, optimization and modeling of the fermentation process. The production of α -amylase on agro-residues in SmF, including orange waste represents an alternative lignocellulosic source for enzyme production, biotechnological applications and constitutes best inducer for the production of α -amylase. There were very few reports on the production of α -amylases in SmF using agro-residues as sole carbon sources by an actinomycete strain. The effect of various process parameters on the enzyme yield and the production was found to be significantly influenced by substrate concentration, pH, NaCl and Inoculum size. Our results suggest that the economical utilization of agro-residues for cost-effective production of α -amylase is possible.

As a perspective research has shown that the integrated use of orange waste is now a practical and economic option. Large scale applications are likely to be forthcoming. However, more effort is still required in the following areas. (a) A greater knowledge of the chemical constituents of orange peel, with the aim of detecting higher value products. (b) Development of microbial strains more efficient at converting orange peel into high value products using classic mutagenesis or metabolic engineering. (c) Integrated study of the orange peel treatment steps, in which the residues obtained in one step will be employed as raw material in the following one,

according to the definition of a biorefinery facility.

The four chosen independent variables recognized by Plackett–Burman design were considered to be the main significant key determinants for α -amylase production by *Streptomyces* sp. (20r), they were further determined in the next stage the optimum levels by CCD and study of the optimization plan via response surface methodology (RSM).

Acknowledgments

The authors thank Professor **A. Boulahrouf** of engineering microbiology and applications laboratory for having facilitated the realization of this work in his laboratory.

References

- 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 *Nocardia aegyptia*. *J. Appl. Sci. Res.* 5 (3), 286–292.
- Agger, T., Spohr, A.B., Nielsen, J., 2001. Alpha amylase production in high cell density submerged cultivation of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55 (1), 81–84.
- Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., Guyot, J.P., 2000. Purification and characterization of an extra cellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 1801 (T), an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzym. Microb. Technol.* 27 (6), 406–413.
- Balkan, B., Ertan, F., 2007. Production of α -Amylase from *Penicillium chrysogenum* Under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Product. *Food Technol. Biotechnol.* 45, 439–442.
- Balu, A.M., Budarin, V., Shuttleworth, P.S., Pfaltzgraff, L.A., Waldron, K., Luque, R., Clark, J.H., 2012. Valorization of orange peel residues: waste to biochemicals and nanoporous materials. *Chem. Sus. Chem.* 5 (9), 1694–1697.
- Bayoumi, R.A., Yassin, H.M., Swelim, M.A., Abdel-All, E.Z., 2008. Production of Bacterial Pectinase(s) from Agro-Industrial Wastes Under Solid State Fermentation Conditions. *J. Appl. Sci. Res.* 4 (12), 1708–1721.
- Bernfeld, P., 1955. α and β amylases. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology* vol 1. Academic Press, USA, p. 149.
- Broedel, S.E., Papciak, S.M., Jones, W.R., 2001. The selection of optimum media formulations for improved expression of recombinant proteins in *E. coli*. *Tech. Bull.* 2, 1–6.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., Osman, G., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem.* 38 (10), 1397–1403.
- Chakraborty, S., Khopade, A., Kokare, C., Mahadik, K., Chopade, B., 2009. Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 58 (1–4), 17–23.
- Chakraborty, S., Raut, G., Khopade, A., Mahadik, K., Kokare, C., 2012. Study on calcium ion independent α -amylase from haloalkaliphilic marine *Streptomyces* strain A3. *Indian J. Biotechnol.* 11, 427–437.
- Chessa, J.P., Feller, G., Gerday, C., 1999. Purification and characterization of the heat-labile α -amylase secreted by the psychrophilic bacterium TAC 240B. *Can. J. Microbiol.* 45 (6), 452–457.
- Coronado, M.J., Vargas, C., Hofmeister, J., Ventosa, A., Nieto, J.J., 2000. Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 67–71.
- Cotârlet, M., 2013. Medium optimization for the production of cold active β -Amylase by psychrotrophic *Streptomyces* MIUG 4 Alga using response surface methodology. *Microbiology* 82 (2), 147–154.
- Demir, H., Gögüş, N., Tari, C., Heerd, D., Lahore, M.F., 2012. Optimization of the process parameters for the utilization of orange peel to produce polygalacturonase by solid-state fermentation from an *Aspergillus sojae* mutant strain. *Turk. J. Biol.* 36, 394–404.
- Deutch, C.E., 2002. Characterization of a salt-tolerant extracellular α -amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Let. Appl. Microbiol.* 35, 78–84.
- Dey, G., Mitra, A., Banerjee, R., Maiti, B.R., 2001. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 7, 227–231.
- Djekrif-Dakhmouche, C., Gheribi-Aoulmi, Z., Meraihi, Z., Bennamoun, L., 2006. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J. Food Eng.* 73, 190–197.
- Embaby, A.M., Masoud, A.A., Marey, H.S., Shaban, N.Z., Ghonaim, T.M., 2014. Raw agro-industrial orange peel waste as a low cost effective inducer for alkaline polygalacturonase production from *Bacillus licheniformis* SHG10. *SpringerPlus* 3, 327.
- Gangadharan, D., Sivaramkrishnan, S., Nampoothiri, K.M., Sukumaran, R.K., Pandey, A., 2008. Response surface methodology for the optimization of α -amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresour. Technol.* 99, 4597–4602.
- Good, W.M., Hartman, P.A., 1970. Properties of amylase from *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 104, 601–613.
- Grupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003. Microbial α -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38 (11), 1599–1616.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M., Pandey, A., 2006. Solid state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochem.* 41, 759–763.
- Kammoun, R., Naili, B., Bejar, S., 2008. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresour. Technol.* 99, 5602–5609.
- Kar, S., Ray, R.C., 2007. Partial characterization and optimization of extracellular thermostable Ca²⁺ inhibited α -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317. *J. Sci. Ind. Res.* 67, 58–64.
- Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioia, S., Boughachiche, F., Zerzer, H., Hamdiken, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A., Boiron, P., 2005. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J. Mycol. Méd.* 15, 45–51.
- Kondepudi, K.K., Chandra, T.S., 2008. Production of surfactant and detergent-stable, halophilic and alkalitolerant α -amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77 (5), 1023–1031.
- Li, X., Yu, H.Y., 2011. Extracellular Production of β -Amylase by a Halophilic Isolate, *Halobacillus* sp. LY9. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1837–1843.
- 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. *Adv. Appl. Microbiol.* 35, 1–56.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Malhotra, R., Noorvez, S.M., Satyanarayana, T., 2000. Production and partial characterization of thermostable and calcium independent alpha amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Let. Appl. Microbiol.* 31, 378–384.
- Mamo, G., Gessesse, A., 1999. Effect of cultivation conditions on growth and α -amylase production by thermophilic *Bacillus* sp. *Let. Appl. Microbiol.* 29, 61–65.
- Margesin, R., Schinner, F., 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5, 73–83.
- Mctigue, M.A., Kelly, C.T., Fogarty, W.M., Doyle, E.M., 1994. Production studies on the alkaline amylases of three alkaliphilic *Bacillus* spp. *Biotechnol. Lett.* 16 (6), 569–574.
- Mohamed, S.A., Drees, E.A., El-Badry, M.O., Fahmy, A.S., 2010. Biochemical Properties of α -Amylase from Peel of *Citrus sinensis* cv. *Abosora*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 2054–2065.
- Möller, M., Schmitz, P.M., Thiele, H., Wronka, T., 2001. Economically and ecologically integrated valuation of land-use in less favored areas. *Ber. Landwirtsch.* 79 (1), 19–48.
- Mulimani, V.H., Patil, G.N., Ramalingam, A., 2000. α -Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses. *Biochem. Educat.* 28, 161–163.
- Narayana, K.J.P., Vijayalakshmi, M., 2008. Production of extracellular α -amylase by *Streptomyces albidoflavus*. *Asian J. Biochem.* 3, 194–197.
- Onishi, H., Sonada, K., 1979. Purification and some properties of an extracellular amylase from moderate halophile, *Micrococcus halobius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 616–620.
- Pedersen, H., Nielsen, J., 2000. The influence of nitrogen sources of the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53 (3), 278–281.
- Plackett, R.L., Burman, J.P., 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33, 305–325.
- 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 Biochem.* 44, 210–215.
- Ray, R.R., 2001. Production of α -amylase xylanase by an alkaliphilic strain of *Penicillium griseooreum* RR-99. *Acta Microbiol. Pol.* 50 (3–4), 305–309.
- Rivas, B., Borrado, A., Torre, P., Converti, A., Dominguez, J.M., 2008. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *J. Agric Food Chem.* 56 (7), 2380–2387.
- Shahera, H., Attyia, A., Ashour, S.M., 2002. Biodegradation of agro-industrial orange waste under solid state fermentation and natural environmental conditions. *Egypt. J. Biol.* 4, 23–30.
- Shirling, E.B., Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16, 313–340.
- Siles, J.A., Thompson, L.Q.Z., 2010. Biorefinery of waste orange peel. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30 (1), 63–69.
- Silva, C.J.S.M., Roberto, I.C., 2001. Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. *Process Biochem.* 36, 1119–1124.
- Singh, R., Kapoor, V., Kumar, V., 2011. Influence of carbon and nitrogen sources on the α -amylase production by a newly isolated thermophilic *Streptomyces* sp. MSC702 (MTCC10772). *Asian J. Biotechnol.* 3, 540–553.
- Sivakumar, K., Karuppiah, V., Sethubathi, G.V., Thangaradjou, T., Kannan, L., 2012. Response surface methodology for the optimization of α -amylase production by *Streptomyces* sp. ML12 using agricultural byproducts. *Biologia* 67 (1), 32–40.
- Solis-pereira, S., Ernesto, F.T., Gustavo, V.G., Mariano, G., 1993. Effects of different

- carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 36–41.
- Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H., 1994. *Food Composition and Nutrition Tables 5th Edition*. CRC Press, Stuttgart: Medpharm Scientific Publ.
- Syed, D.G., Agasar, D., Pandey, A., 2009. Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 189–194.
- Tatsinkou, F.B., Taveai, F., Ndjouenkeui, R., 2005. Production and partial characterisation of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *Afr. J. Biotechnol.* 4 (1), 14–18.
- Tonkova, A., 2006. Microbial starch converting enzymes of the α -amylase family. In: Ray, R.C., Wards, O.P. (Eds.), *Microbial Biotechnology in Horticulture* vol. 1. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA.
- Ventosa, A., Nieto, J.J., 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 85–94.
- Zangirolami, T.C., Carlsen, M., Nielsen, J., Jorgensen, S.B., 2002. Growth and enzyme production during continuous cultures of high amylase producing variant of *A. oryzae*. *Braz. J. Chem.* 19 (1), 55–67.
- Zhu, W., Dongmei, C., Gugue, C., Qian, P., Ping, S., 2007. Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049. *Enzym. Microbiol. Technol.* 40, 1592–1597.

**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.**

Résumé

Une nouvelle souche de *Streptomyces* sp. (20r) a été choisie parmi quatorze actinomycètes en raison de son activité amylasique et de ses bonnes caractéristiques de croissance et de sporulation. Elle est issue d'un biotope semi-aride du nord-est Algérien, les marais salants d'Ain Mlila. Le gène codant pour cette amylase a été isolé et cloné. Les résultats de l'annotation structurale des séquences a permis d'identifier les bornes nucléotidiques de six ORFs sur la séquence génomique de la souche *Streptomyces* sp. (20r) séquencé par la technologie Illumina HiSeq 2000, suivie d'une annotation fonctionnelle qui a son tour permet de prédire la fonction des ORFs en tant que GH et plus précisément en ayant une activité amylasique appartenant à la famille GH13. L'alignement des séquences nous a permis de mettre en évidence la triade catalytique de l'enzyme, formée d'un acide glutamique (Glu) et de deux acides aspartique (Asp) spécifique pour la famille des GH13 ce qui prouve que ces protéines appartiennent bien à cette dernière. L'analyse de séquences a permis de mettre en évidence la présence de domaine modulaire, ce qui nous a permis de retenir deux gènes codant pour des amylases pour la suite des travaux, sur les six gènes orthologues putatives positifs: Les Nodes 67 et 65 possédant un CBM 20 et un CBM 2 en C-terminal et deux CBM 25 en N-terminal, respectivement. Ces deux gènes de 537 aa et 960 aa respectivement ont été clonés dans le vecteur pET28a (+), puis exprimé chez *Escherichia coli*. Par ailleurs, grâce à la méthodologie des plans d'expériences de Plackett et Burman nous avons pu identifier quatre facteurs qui ont un effet significatif sur la production enzymatique. Ces derniers ont fait l'objet d'une optimisation par le plan d'expérience de Box-Wilson basé sur les composites centrés (CCD) combiné à la méthodologie de surface de réponse (RSM). Cette étude a permis de définir un milieu de production optimisé composé de 16,03% de déchets d'orange, 6,60% de NaCl, 9,45% d'inoculum et un pH 8,95. Nous avons ainsi obtenu des niveaux de production enzymatique optimale de l'ordre de 12,19 U/mL, ce qui a été en bon accord avec la valeur prédite par le modèle quadratique (11,55 U/mL), L' α -amylase purifiée présentait une activité sur une large gamme de pH (2,2-10,6), elle démontre un pH et une température d'activité optimaux de 8,8 et 85°C, respectivement.

Mots clés: *Streptomyces* sp., GH, α -amylase, déchets d'orange, optimisation, SmF, Plackett-Burman, CCD, RSM, purification, caractérisation, Séquençage Illumina HiSeq 2000, clonage, expression protéique.

Membres du jury :

Président :	Mr. BENHIZIA Y.	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Directeur de thèse :	Mr. KITOUNI M.	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Examineur :	Mr. BOUDEMAGH A.	Professeur	U. des frères Mentouri-Constantine
Examineur :	Mme. BENDJEMANA K.	Professeur	U. Abbès Laghrour- Khenchela