

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des sciences Biologiques et des sciences Agronomiques
Département de Biochimie et Microbiologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention de diplôme de Master

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

Enzymes microbiennes : Principaux caractéristiques et leurs intérêts biotechnologiques.

Le : 28/10/2020

Travail réalisé par :

Mlle LAGAB Karima

Mlle SALI Saida

Devant le jury composé de :

Mlle ASMANI K.	MCB	UMMTO	Présidente
Mr OUELHADJ A.	MCA	UMMTO	Promoteur
Mr BOUACEM K.	MCB	UMMTO	Examineur

Remerciements

Nous remercions tout d'abord « Allah » de nous avoir donné le courage d'entamer et de finir ce mémoire dans de bonnes conditions.

Nos remerciements les plus sincères vont à :

Monsieur, OUELHADJ A. : Maître de Conférences classe (A) à l'UMMTO,
d'avoir accepté de diriger notre travail et pour ses conseils précieux et son suivis
qu'il nous a prodigué durant tout notre travail.

Mademoiselle, ASMANI K. : Maître de Conférences classe (B) à l'UMMTO,
de nous avoir fait l'honneur d'être la présidente du jury.

Monsieur, BOUACEM K. : Maître de Conférences classe (B) à l'UMMTO,
d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tenons également à remercier tous les enseignants de nous avoir procuré
un riche savoir tout au long de notre parcours universitaire.



Dédicaces

Mes très chers parents.

En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect.

Je ne vous remercierai jamais assez pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre soutien tout au long de ma scolarité, pour tous vos sacrifices depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A mon très cher frère ainsi que sa merveilleuse femme
Je vous remercie pour votre soutien, amour et encouragements.

A ma petite sœur chérie
Pour son amour et son encouragement.

A toute ma famille, qui m'a soutenue tout au long de mon parcours

A tous mes amis, qui m'ont accompagné toutes ces années.

LAGAB Karima

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un immense amour
A mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères
sentiments, pour leurs sacrifices, soutien et leurs encouragements durant ces
années d'études.

A mon très cher frère

Pour son amour et son support

A ma famille, mes proches qui m'ont toujours encouragé

A mes amis, qui m'ont accompagné tout au long de ces années

et à tous ceux que j'aime

Sali Saida

Résumé

La production industrielle, génère et utilise des produits chimiques toxiques qui peuvent être dans certains cas la cause principale de la pollution de l'environnement et influence de façon négative sur l'écosystème naturel.

L'objectif de cette recherche, repose sur la possibilité que les microorganismes et leurs biocatalyseurs peuvent être une alternative aux produits chimiques employés dans les industries, ainsi que l'obtention d'une enzyme microbienne idéale qui nécessite la mise en œuvre de nouvelles technologies, comme la métagenomique, l'ingénierie des protéines et l'immobilisation d'enzymes. L'utilisation des biocatalyseurs d'origine non toxiques, fournit un rendement de production élevé de façon durable tout en diminuant le coût de production, cependant la découverte de la molécule souhaitée et du microorganisme producteur adapté aux conditions de production à grande échelle nécessite des années de recherche et d'efforts.

Mots clés : Enzymes microbiennes, métagenomique, ingénierie des protéines, biotechnologie industrielle.

Abstract

Industrial production, generates and uses toxic and chemicals products which in some cases can be the main cause of environmental pollution and negatively influence the natural ecosystem.

The objective of this research, is based on the possibility that microorganisms and their biocatalysts can be an alternative to chemicals products used in industries, as well as obtaining an ideal microbial enzyme which requires the implementation of new technologies, such as metagenomic, protein engineering, and enzyme immobilization. The use of biocatalysts of non-toxic origin, provides a high production yield in a sustainable way while reducing the production cost, however the discovery of the desired molecule and the producer microorganism suitable for large-scale production conditions requires years of research and efforts.

Key words : Microbial enzymes, metagenomic, proteins engineering, industrial biotechnology.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma du mécanisme d'action d'une enzyme.....	4
Figure 2 : Schéma du mécanisme d'action de la cellulase.....	10
Figure 3 : Structure de lipase microbienne.....	12
Figure 4 : Structure des protéases microbiennes	13
Figure 5 : Structure de la pectinase microbienne	14
Figure 6 : Structure de la famille GH10 xylanase.....	15
Figure 7 : Mécanisme de l'hydrolyse de l'acide phytique par la phytase.....	16
Figure 8 : Schéma qui résume l'approche métagénomique.....	19
Figure 9 : Organigramme de la méthode shotgun utilisée pour le séquençage automatique de l'ADN.....	20
Figure 10 : Schéma illustrant les stratégies d'amélioration d'enzymes.....	24
Figure 11 : Schéma général de l'évolution dirigée.....	26
Figure 12 : Les méthodes de l'immobilisation d'enzymes.....	27
Figure 13 : Schéma d'une cellule d'ultrafiltration.....	33
Figure 14 : Schéma général de dialyse	34
Figure 15 : Schéma illustrant la chromatographie d'affinité	36
Figure 16 : Diagramme représentant la répartition d'enzymes selon la source.....	47
Figure 17 : Répartition par régions du marché d'enzymes.....	48
Figure 18 : Histogramme illustrant la demande croissante des industriels	48

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des enzymes	5
Tableau II : Exemples de microorganismes producteurs d'enzymes	6
Tableau III : Classification des extrémophiles et les applications industrielles de quelques enzymes	23
Tableau IV : Enzymes microbiennes utilisées en industrie laitière	39
Tableau V : Enzymes microbiennes utilisées en boulangerie.....	40
Tableau VI : Enzymes microbiennes utilisées en industrie des boissons.....	41
Tableau VII : Enzymes microbiennes utilisées dans l'industrie textile.....	42
Tableau VIII : Enzymes microbiennes utilisées en cosmétique.....	43
Tableau IX : Enzymes microbiennes utilisées en industrie de papier.....	44
Tableau X : Les polluants majeurs des eaux usées.....	46
Tableau XI : Enzymes microbiennes utilisées dans la biorestauration des polluants organiques et inorganiques.....	46

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

Aw : Activité de l'eau.

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool.

CAGR : Compound annual growth rate (Taux de croissance annuel composé).

CAZy : Carbohydrate Active Enzyme database.

kDa : Kilo dalton.

M : Molaire.

M.O : Microorganisme.

MPa : Méga Pascal.

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne.

pH : Potentiel Hydrogène.

Taq : *Thermus aquaticus*.

USD : United State Dollar.

UV : Ultraviolet.

V : Volt.

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Chapitre 1 : Enzymes microbiennes

1- Généralités sur les enzymes.....3

1-1- Historique des enzymes.....3

1-2-Définition.....3

1-3- Notion du site actif et le mécanisme d'action des enzymes..... 3

1-4-Classification.....4

2- Enzymes microbiennes commercialisés.....5

2-1-Définition des enzymes microbiennes.....5

2-2-Oxydoréductases..... 6

2-2-1- Glucose-oxydase..... .6

2-2-2- Enzymes lignolytiques.....6

2-2-2-1-Peroxydases.....7

2-2-2-2- Laccases.....7

2-2-3-Catalases.....8

2-3-Hydrolases.....8

2-3-1-Amylases.....8

2-3-2-L-Asparaginase..... 9

2-3-3-Cellulases..... 9

2-3-4-Chitinases..... 11

2-3-5-Lipases..... 11

2-3-6-Protéases..... 12

2-3-7-Pectinases..... 14

2-3-8-Xylanases..... 14

2-3-9 Phytases..... 15

Chapitre 2 : Recherche, Amélioration et production d'enzymes

1- Découverte d'enzymes microbiennes.....18

Table des matières

1-1-Métagénomique.....	18
1-1-1-Métagénomique non sélective.....	19
1-1-1-1-Stratégie shotgun.....	19
1-1-1-2-Séquençage haut débit (NGS).....	20
1-1-2-Métagénomique ciblée.....	21
1-1-2-1-Criblage basé sur la séquence.....	21
1-1-2-2-Criblage basé sur la fonction.....	21
1-2-Génomique.....	22
1-3-Extrêmophiles.....	22
2- Amélioration des enzymes.....	24
2-1-Rational design.....	25
2-2-Méthodes combinatoires.....	25
2-2-1-PCR sujette aux erreurs.....	25
2-2-2-DNA Shuffling.....	26
2-3-Immobilisation d'enzymes.....	26
2-3-1-Adsorption.....	26
2-3-2-Piégeage.....	27
2-3-3-Réticulation.....	27
3- Production.....	28
3-1-Conditions de production.....	28
3-2-Processus de production.....	28
3-2-1-Etapes avant fermentation.....	28
3-2-2-Fermentation.....	29
3-2-2-1-Fermentation sur milieu solide.....	29
3-2-2-2-Fermentation submergée.....	30
3-3-Amélioration des souches.....	30
3-3-1-Mutation.....	30
3-3-2-ADN recombinant.....	30
4- Downstream processing.....	31
4-1- Méthodes d'extraction.....	31
4-1-1-Extraction d'enzymes intracellulaires.....	31
4-1-1-1-Méthodes physiques.....	31
4-1-1-2-Méthodes mécaniques.....	31
4-1-1-3-Enzymes lytiques.....	32

Table des matières

4-1-2-Extraction d'enzymes extracellulaires.....	32
--	----

Chapitre 3 : Applications Biotechnologiques

1- Application des enzymes.....	38
1-1-Domaine médical.....	38
1-1-1-Enzymes thérapeutiques.....	38
1-1-2-Autres applications.....	38
1-2-Domaine alimentaire.....	39
1-2-1-Industrie laitière.....	39
1-2-2-Boulangerie.....	40
1-2-3-Industrie des boissons.....	40
1-3-Alimentation animal.....	41
1-4-Industrie textile.....	41
1-5-Industrie cosmétique.....	42
1-6-Industrie des détergents.....	43
1-7-Industrie du papier.....	44
1-8-Industrie de cuir.....	44
1-9-Production de bioéthanol.....	45
1-10-Bioremediation.....	45
2- Marché mondial des enzymes.....	47
Conclusion et perspectives.....	50

Références bibliographiques

Introduction

Les industries d'aujourd'hui, s'orientent vers la recherche de nouvelles molécules biologiques comme alternative aux substances chimiques et toxiques, causant des dommages irréparables sur l'environnement en polluant l'eau, l'air et le sol et sur la santé humaine par l'apparition de nouvelles maladies, que ce soit respiratoires, cutanées ou autres. Parmi les molécules biologiques recherchées, les enzymes microbiennes ont reçus une grande attention en étant une source renouvelable issue de nombreux microorganismes bactéries, champignons, levures. Par définition, les enzymes sont des protéines qui catalysent diverses réactions chimiques présentes dans la nature, ce qui est si intéressant au sujet de ces molécules, c'est qu'elles peuvent effectuer des réactions spécifiques complexes tout en gardant leur forme native. Les enzymes issus des microorganismes prédominent le marché des enzymes avec un taux de 88%, se suit ceux des animaux avec 8% et enfin celui des plantes 4% (Gurung *et al.*, 2013).

Diverses enzymes microbiennes telles que les lipases, amylases, phytases, cellulases et laccases sont utilisés dans divers secteurs industriels allant de l'alimentaire en production d'énergie en passant par la bioremediation, par leur propriété qui permet de convertir des composés nocifs en composés utiles non nocifs pour l'environnement. Le marché d'utilisation final des enzymes industrielles est extrêmement répandu, plus de 500 produits industriels sont fabriqués à l'aide des enzymes (Adrio et Demain, 2014). Mais avec l'augmentation de la demande en enzymes et les difficultés de mettre en œuvre des enzymes adéquates permettant l'obtention de résultats espérés par l'industriel, un développement d'enzymes avec des propriétés nouvelles et adaptés à chaque processus de production est indispensable.

Dans le travail suivant, nous allons voir comment ces difficultés seront surmontées grâce aux progrès réalisés en biologie moléculaire et comment ces enzymes vont attribuer dans le développement économique mondial tout en gardant une trace respectueuse de l'environnement.

Notre thématique est subdivisée en trois chapitres :

- Le chapitre 1 traite les différentes enzymes microbiennes ainsi que leurs principales caractéristiques ;
- Le chapitre 2 évoque les processus permettant l'obtention d'enzymes aptes à être commercialisées ;
- Le chapitre 3 présente les différentes manières dont ces enzymes microbiennes sont exploitées en biotechnologie ;
- Enfin, nous terminons par une conclusion et des perspectives.

1- Généralités sur les enzymes

1-1-Historique des enzymes

Les enzymes ont toujours fait partie de la vie quotidienne depuis de nombreuses civilisations. Le mot « enzyme » a été utilisé pour la première fois par le physiologiste allemand Wilhelm Kühne en 1878, lorsqu'il décrivait la capacité de la levure à produire de l'alcool à partir de sucres, il est dérivé des mots grecs en (signifiant « dans ») et zume (signifiant « levure »). À la fin du XIXe siècle et au début du XXe siècle, des progrès significatifs ont été réalisés dans l'extraction, la caractérisation et l'exploitation commerciale de nombreuses enzymes, mais ce n'est que dans les années 1920 que les enzymes ont été cristallisées, révélant que l'activité catalytique est associée aux molécules de protéines (Robinson, 2015).

1-2-Definition

Les enzymes sont des biocatalyseurs de nature protéique, qui agissent sur des substrats de manière spécifique. Elles permettent d'accélérer la vitesse de la réaction en abaissant l'énergie d'activation sans qu'elle rentre dans la réaction (enzyme régénérée) (Fersht, 1985 ; Piccolino, 2000 ; Aldridge, 2013). Leur activité est contrôlée par plusieurs facteurs du milieu comme la température, pH, activité de l'eau...ect. Sur le plan structurel les enzymes sont des grandes macromolécules d'environ 10 à 1000 kDa (Burhan et *al.*, 2002), composées de polymères d'acides aminés reliés par des liaisons amides, elles comportent des sites catalytiques qui souvent enfouies profondément dans les poches hydrophobes (Singh et *al.*, 2016).

1-3-Notion du site actif et le mécanisme d'action des enzymes

La première représentation d'un substrat se fixant à la surface d'une enzyme, a été proposée par Armstrong en 1904 pour expliquer la stéréospécificité des enzymes.

Le site actif est défini comme étant la région catalytique de l'enzyme où se déroule la réaction enzymatique, a une taille restreinte par rapport à la taille globale de la protéine, la spécificité d'action et du substrat sont déterminées par rapport à l'arrangement des atomes présents dans le site actif (Athel et *al.*, 2005). La liaison entre le substrat et l'enzyme induit la formation du complexe enzyme-substrat, qui initie la réaction par exemple l'hydrolyse ou l'oxydation du substrat par une enzyme, ce qui entraîne la libération du produit. A la fin de la réaction, l'enzyme sera régénérée (fig.1).

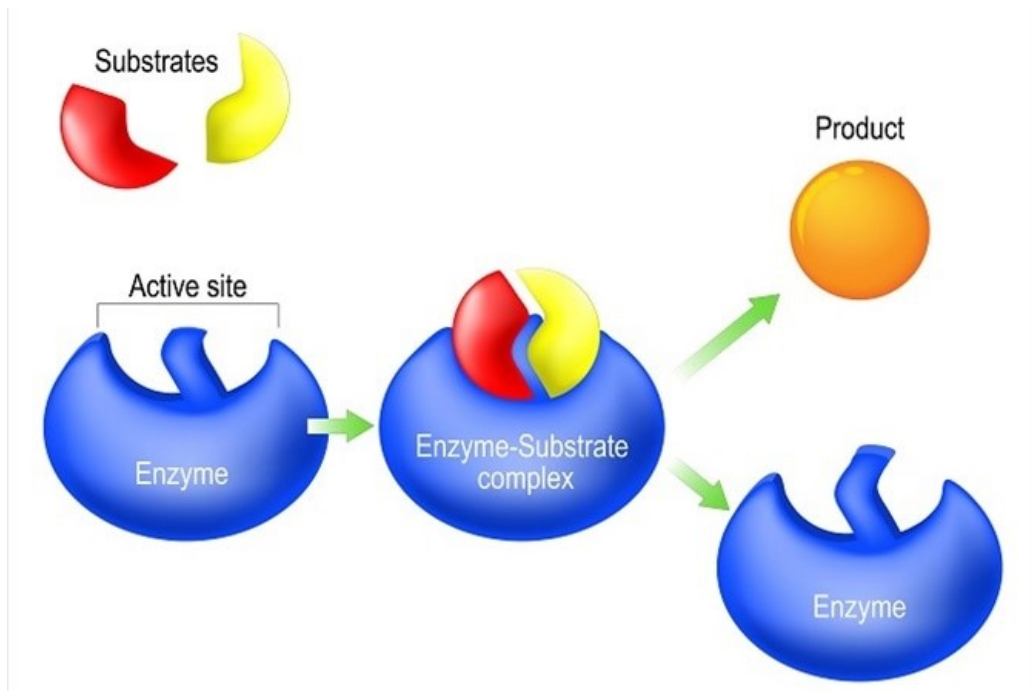


Figure 1 : Schéma du mécanisme d'action d'une enzyme (Smith et Pharm, 2019).

1-4- Classification

En raison de la diversité enzymatique et leur métabolisme varié, les enzymes sont répertoriés selon la classification EC (Enzyme Commission) qui a été mise en place en 1955 par l'IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). EC signifie « enzyme commission ».

C'est une classification numérique, basée sur la nature de la réaction chimique catalysée. Chaque numéro EC correspond à un nom d'enzyme. Qui peut être soit de la forme A.B.C.D ou A, B, C et D, ces nombres représentent chacun une caractéristique de l'enzyme qui permet de l'identifier (Gaëlle, 2014).

- A : indique le type de réactions catalysées ;
- B : indique le substrat général impliqué lors de la réaction ;
- C : indique le substrat spécifique impliqué ;
- D : correspond au numéro de série de l'enzyme.

Ce système de classification répartie les enzymes en six classes représentées dans le tableau suivant :

Tableau I : Classification des enzymes (Gaëlle, 2014).

Numéro	Classe	Réaction catalysée
EC.1	Oxydoréductases	Catalysent les réactions d'oxydoréduction.
EC.2	Transférases	Transfèrent un groupement fonctionnel (par exemple un groupe méthyle ou phosphate).
EC.3	Hydrolases	Catalysent l'hydrolyse de diverses liaisons.
EC.4	Lyases	Brisent diverses liaisons par d'autres procédés que l'hydrolyse et l'oxydation.
EC.5	Isomérases	Catalysent les réactions d'isomérisation dans une simple molécule.
EC.6	Ligases	Joignent deux molécules par des liaisons covalentes.

2- Enzymes microbiennes commercialisées

Les enzymes, proviennent de plusieurs sources allant d'un microorganisme minuscule aux plantes et aux animaux. Leur présence en petite quantité chez les plantes ne leur permet pas d'être utilisé par les industriels, ce qui est différent pour les enzymes produites à partir de microorganismes présentant des avantages, tels qu'une manipulation facile, une multiplication rapide dans des conditions contrôlées, une manipulation génétique facile, un rendement de production élevé...ect. De plus, les enzymes microbiennes offrent plusieurs bienfaits pour les industries, comme une activité catalytique et une spécificité élevées, une stabilité accrue, sont de nature non toxique et une rentabilité de production plus efficace (Singh et *al.*, 2019).

2-1- Définition des enzymes microbiennes

Les enzymes microbiennes sont obtenues à partir de différents microorganismes comme les bactéries : *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, et les champignons : *Aspergillus* spp., *Rhizopus* (tableau II). Elles sont considérées comme étant des enzymes supérieures (Sanchez et Demain, 2017) utilisées en particulier dans des applications industrielles pour la production de détergents, produits alimentaires et boissons, papier et textile....Ect.

Tableau II : Exemples de microorganismes producteurs d'enzymes.

Source	Espèce	Référence
Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i>	(Konsoula et liakoupoulou, 2007 ; Panday et al., 2000).
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(Gennaro et al., 2014). (Kalme et al., 2007 ; telke et al., 2010).
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Pseudomonas sp.</i>	
champignons	<i>Aspergillus tubengiensis</i>	(Kriaa et kammoun, 2016).
	<i>A.oryzae</i>	(Dubay et al., 2017).
	<i>A.carbonarius</i>	(Yang et al., 2014).
	<i>A.flavus</i>	(Bhat et al., 2013).
	<i>A.niger</i>	(Liu et al., 2001).

2-2-Oxydoréductases

2-2-1-Glucose-oxydase

La glucose-oxydase (EC.1.1.3.4) est une enzyme oxydoréductase appartenant à la famille GMC (glucose/méthanol/choline) réductase. La glucose-oxydase est une holoenzyme avec un cofacteur flavine adénine dinucléotide, constituée de deux sous unités identiques (80kDa). Elle catalyse l'oxydation du glucose en glucono- δ -lactone en utilisant l'oxygène atomique comme accepteur d'électrons avec la génération simultanée de peroxyde d'hydrogène. La glucono- δ -lactone est ensuite hydrolysée en acide gluconique par les lactamases, tandis que le peroxyde d'hydrogène généré est décomposé en oxygène et en eau par les catalases (Singh et al., 2019).

La glucose-oxydase, peut être produite par plusieurs souches fongiques dont : *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus tubingiensis*, *A. oryzae*, *A. carbonarius*, *A.flavus*, et *A.niger*, *Penicillium notatum*, *P.fumiculosum*, *P. amagasakiense*, *P. variable* et *P. fellutanum* (Singh et al., 2019).

2-2-2-Enzymes lignolytiques

Trois principales enzymes ligninolytiques, la laccase (EC.1.10.3.2), la lignine peroxydase (EC.11.1.14), et la manganèse peroxydase (EC.1.11.1.13), peuvent dégrader la lignine (Peyman et al., 2020).

2-2-2-1-Peroxydases

Les peroxydases (EC.1.11.1.7), sont des oxydoréductases qui transforment une variété de composés *via* l'utilisation de H₂O₂ en produits oxydés ou polymérisés. L'activité peroxydase implique le don d'électrons au ferricyanure et à l'acide ascorbique pour les transformer en composés inoffensifs (Singh et *al.*, 2019).

- **Lignine-peroxydase (LiP)**

Les lignines peroxydases (EC.1.11.1.14), (1,2-bis (3,4-diméthoxyphényl) propane-1,3-diol : hydrogène-peroxyde oxydoréductase) catalysent la dépolymérisation oxydative dépendante du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) de la lignine (Tien et Kirt, 1983 ; Hammel et *al.*, 1993). La lignine peroxydase a un site actif composé d'un complexe ferreux (l'hème). Elle possède un potentiel redox élevé (autour de +1,2 V), en conséquent elle peut oxyder des substrats phénoliques et non phénoliques (Rakotovelo, 2016).

- **Manganèse- peroxydase (MnP)**

MnP (EC.1.11.1.13), est une glycoprotéine contenant de l'hème qui oxyde le donneur à un électron Mn²⁺ en Mn³⁺ qui à son tour peut oxyder un grand nombre de substrats phénoliques (Abdel Hamid et *al.*, 2013).

Les peroxydases sont produites par une variété de microorganismes (bactéries, champignons, levures) (Singh et *al.*, 2019) :

- Parmi les souches bactériennes : *E.coli*, *Bacillus* sp., et *Pseudomonas* sp.
- Parmi les souches fongiques : *Thanatephorus* sp., *Auricularia* sp., *Pleurotus ostreatus*, *Umbellopsis isabellina* et *Penicillium geastrovirus*.
- Parmi les levures : *Candida tropicalis* et *Debaryomyces polymorphus*.

2-2-2-2-Laccases

Les laccases (EC.1.10.3.2) sont des enzymes oxydant les phénols (Singh et *al.*, 2019). Ils appartiennent au groupe des oxydases de cuivre bleu et contiennent trois types différents d'atomes de cuivre. Le cuivre de type 1, donne à l'enzyme la couleur bleue de la protéine. Il est responsable de l'oxydation des substrats réducteurs, tels que les phénols. Les cuivres de type 2 et de type 3 créent un cluster triangulaire. Ce site est destiné à la réduction du dioxygène (Dominic, 2008).

Les laccases fongiques cas de *Trametes versicolor*, se produisent souvent sous forme d'isozymes avec des structures protéiques monomères ou dimères. Les isozymes intracellulaires et extracellulaires peuvent être produites à partir d'un seul organisme. Les protéines monomères

ont une masse moléculaire allant de 50 à 110 kDa (Thurston, 1994). La plus grande quantité des laccases est produite par les champignons de la pourriture blanche : *Pleurotus florida*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* et *P. tailandia*. Autres souches fongiques : *Trametes* sp., *Corioloropsis* sp., *Grifola* sp., *Lentinula* sp...ect (Singh et al., 2019).

2-2-3-Catalase

Les catalases (EC 1.11.1.6), sont des enzymes antioxydants qui catalysent la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Selon la structure et la séquence, les catalases peuvent être divisées en trois classes : la catalase monofonctionnelle ou catalase typique, la catalase-peroxydase et la pseudocatalase ou Mn-catalase. Il existe au moins huit souches capables de produire des catalases (Zhang et al., 2010), *Penicillium variable*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Bacillus subtilis* et *Rhizobium radiobacter* (Liu et Kokare, 2017).

2-3-Hydrolases

2-3-1-Amylases

Les amylases catalysent l'hydrolyse de l'amidon en sucre tel que le glucose et le maltose (Sundram et murthy, 2014). Elles sont subdivisées en trois sous classes α , β et γ amylose selon le type de liaisons qu'elles sont capables de cliver (Liu et Kokare, 2017).

- **α -amylase**

Les α -amylases (EC.3.2.1.1), catalysent l'hydrolyse des liaisons α -1,4-O-glycosidiques internes dans les polysaccharides en maintenant la configuration α -anomérique dans les produits. La plupart des α - amylases sont des métalloenzymes, qui nécessitent des ions calcium Ca^{2+} pour leur activité, leur intégrité structurelle et leur stabilité (Liu et Kokare, 2017).

- **β -amylases**

Les β -amylases (EC.3.2.1.2), sont des enzymes exohydrolases qui agissent à partir de l'extrémité non réductrice d'une chaîne polysaccharidique en hydrolysant les liaisons α -1,4-glucane pour donner des unités maltoses successives.

- **γ -amylases**

Les γ -amylases (EC.3.2.1.3) clivent les liaisons α -1,6-glycosidique, en plus de cliver les dernières liaisons α -1,4-glycosidiques à l'extrémité non réductrice de l'amylose et de

l'amylopectine contrairement aux autres formes d'amylase ce qui donne le glucose (Liu et Kokare, 2017).

Les enzymes amylolytiques sont retrouvées dans une variété de microorganismes (Singh et al., 2019) :

- Parmi les souches bactériennes : Les espèces de *Bacillus* y compris *Bacillus amyloliquifaciens*, *B.cerues*, *B.coagulans*, *B.licheniformis*, *B.polymyxa*, *B.subtiis*, *B.stearothermophilus*, *B.mesentericus*, *B.vulgaris*, *B.megaterium*, *B.halodurans* ect. D'autres souches microbiennes, comprennent *Caldimonas taiwanesis*, *Chromohalobacter* sp., *Corynebacterium gigantean*, *Geobacillus thermoleovorans*, des ferments tels que *Lactobacillus* et *Lactobacillus manihotivorans*.
- Certaines souche halophiles dont *Bacillus dipsosauri*, *Halobacillus* sp., *Haloarcula hispanica*, *Chromohalobacter* sp., et *Meridien halomonas*.
- Des Aspergillii (*Aspergillus oryzea*, *A.niger*, *A. awamori*, *A.fumigatus*, *A.kawachi*, *A.flavus*) et *Penicillium* sp. (*P.bruneum*, *P. chrysogenum*, *P.roqueforti*, *P.camemberti*).

2-3-2-L-Asparaginase

La L-Asparaginase (L-asparagine amidohydrolase, (EC.3.5.1.1)), catalyse la désamidation de L- asparagine en acide L-aspartique et l'ammoniaque. Elle est synthétisée par plusieurs microorganismes dont :

- Les souches bactériennes : *Erwinia aroideae*, *Proteus vulgaris*, *E.coli*, *Serratia marcescens*, *Vibrio succinogenes*, *Citrobacter freundii*, et *Klebsiella aerogenes*. De nombreuses autres sources bactériennes de L-asparaginase sont *Bacillus circulans*, *B.lechiniformis*, *B.cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Alcaligenes faecalis*.
- Des bactéries thermophiles: *Thermus aquaticus* et *Thermus thermophilus*.
- Les souches fongiques, y compris *Aspergillus terreus*, *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Sacharomyces cerevisiae* (Singh et al., 2019).

2-3-3-Cellulases

Les cellulases, hydrolysent les liaisons $\beta(1,4)$ dans les chaines cellulosiques. Les modules catalytiques des cellulases ont été classés en de nombreuses familles en fonction de leurs séquences d'acides aminés et leur structure cristalline (Henrissat, 1991). La cellulase est un

complexe de trois enzymes qui agissent en synergie pour hydrolyser la cellulose native, ce sont les endoglucanases (E.C.3.2.1.4), les exoglucanases (cellobiohydrolases E.C 3.2.1.91) et les β -glucosidases (E.C 3.2.1.21) (Eveleigh et al., 1995 ; Kuhad et al., 1997) (fig.2).

- **Les endoglucanases**

Les endoglucanases (E.C.3.2.1.4) hydrolysent les liaisons glycosidiques au niveau des régions amorphes de la cellulose générant des oligomères à longue chaîne.

- **Les exoglucanases**

Elles clivent les oligosaccharides à longues chaînes générées par l'action des endoglucanases en oligosaccharides à chaînes courtes. Il existe deux types d'exoglucanases : agissant de manière unidirectionnelle sur les oligomères à longues chaînes, soit à partir des extrémités réductrices (E.C.3.2.1.176) ou non réductrices (E.C3.2.1.91) libérant le cellobiose.

- **Les β -glucosidases**

Les β -glucosidases (E.C.3.2.1.21) hydrolysent la cellobiose libérée par les exoglucanases (Juturu et Wu, 2014).

Les champignons sont considérés comme les principaux producteurs de cellulases. On trouve des genres fongiques tels qu'*Aspergillus* et *Trichoderma*. *A.protuberus*, *A.ellipticus*, *A.niger*, *Trichoderma viride* et *T.asperellum* (Singh et al., 2019).

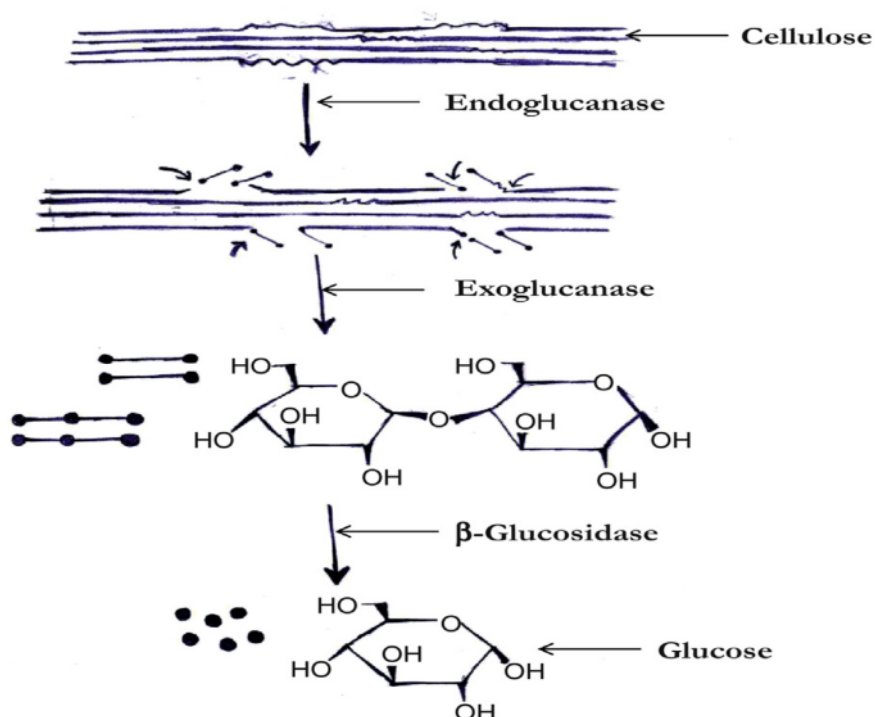


Figure 2 : Schéma du mécanisme d'action de la cellulase (Chakraborty et al., 2016).

2-3-4-Chitinases

Les chitinases appartiennent à la famille des glycosyl-hydrolases, qui hydrolysent la liaison glycosidique β -1,4-N-acétyl-D-glucosamine dans la chitine pour produire des unités monomères et oligomères. Les chitinases sont classés en deux catégories, à savoir les endochitinases et les exochitinases.

- **Les endochitinases**

Les endochitinases (EC.3.2.1.14) clivent aléatoirement la chitine à des sites internes pour produire de la chitotriose, du chitotetraose et le diacétylchitobiose.

- **Les exochitinases**

Les exochitinases sont classées en deux sous catégories, la première catégorie qui est les chitobiosidases (EC.3.2.1.29), libèrent le diacétylchitobiose à partir de l'extrémité non réductrice de la chitine et les β -1,4 N-acétylglucosaminidase (EC.3.2.1.30), clivent les produits d'endochitinase et de chitobiosidase, générant des unités N-acétyl-D glucosamine. La chitinase est principalement produite par les souches bactériennes, parmi les genres bactériens on trouve : *Serratia*, *Chromobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Arthrobacter* et *Aeromonas*, des *Streptomyces* sp., *S.antibioticus*, *S.griseus*, *S.plicatus*, *S.livadans*, et *S.aureofaciens* (Singh et al., 2019).

2-3-5-Lipases

Les lipases (triacylglycérol acylhydrolases) (EC.3.1.1.3), catalysent l'hydrolyse des triacylglycérols en glycérol, diacylglycérols, monoglycérols et acides gras libres (Treichel et al., 2010). Les lipases sont des enzymes multifonctionnelles qui sont capables de catalyser de nombreuses réactions, y compris l'estérification, la transestérification et interestérification des lipides (Panesar et al., 2016), elles catalysent également l'acidolyse, l'alcoololyse et l'aminolyse sur les triglycérides. Avec leur spécificité de substrat et une activité optimale sur une large gamme de températures, les lipases sont désignés comme des biocatalyseurs polyvalents (Singh et al., 2019).

Les lipases bactériennes sont classées en huit familles (familles I-VIII) selon leurs séquences d'acides aminés et leurs propriétés biologiques (Arpigny et Jaeger, 1999). Appartiennent à la classe des serines hydrolases qui ne nécessite aucun cofacteur. La famille I des vraies lipases est la plus représentée et peut être divisée en sous-famille *Pseudomonas* lipase, sous-famille *Bacillus* lipase, sous-famille *Staphylococcal* lipase, etc. (Fig.3) (Liu et Kokare, 2017).

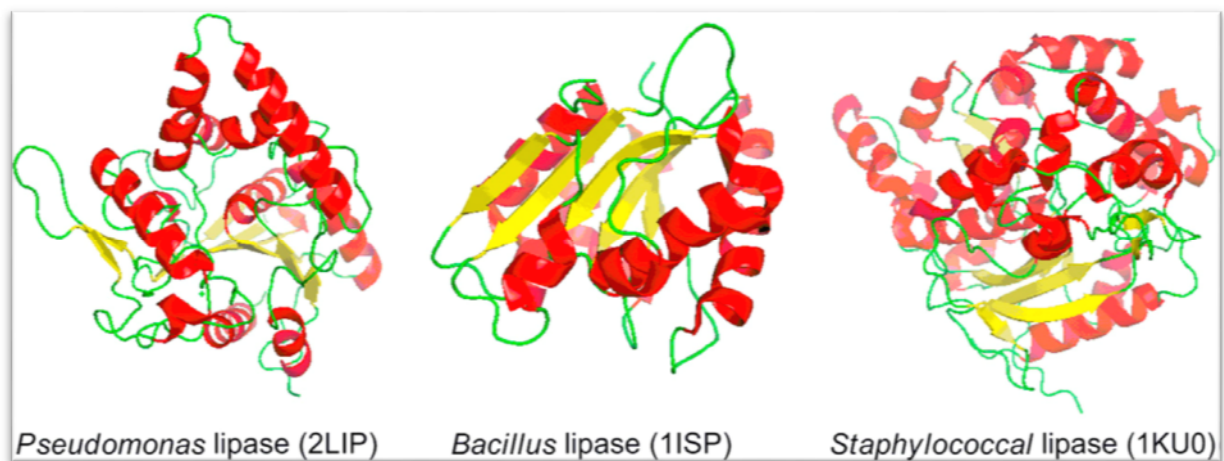


Figure 3 : Structure de lipase microbienne (Liu et Kokare, 2017).

Plusieurs microorganismes sont considérés comme producteurs de lipases :

- Parmi les champignons on trouve : *Rhizopus* sp., *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor* et *Rhizomucor* (Gupta et al., 2004; Treichel et al., 2010).
- Parmi les levures : *Candida rugosa*, *C.tropicalis*, *C.antarctica*, *C.cylindracea*, *C.parapsilopsis*, *C.deformans*, *C.curvata*, *C.valida*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *R.pilimornae*, *Pichia bispora*, *P.mexicana*, *P.sivicola*, *P. xylosa*, *P.burtonii*, *Saccharomycopsis crataegensis*, *Torulaspota globosa* (Treichel et al., 2010).
- Parmi les bactéries : *Bacillus subtilis*, *B.pumilus*, *B.licheniformis*, *B.coagulans*, *B. stearothermophilus* et *B.alcalophilus* sont les espèces productrices de lipases les plus courantes. *Pseudomonas* sp., *P.aeruginosa*, *Burkholderia multivorans*, *B.cepacia* et *Staphylococcus caseolyticus* (Gupta et al., 2004).

2-3-6-Protéases

Les protéases (peptidase ou protéinase) constituent un groupe diversifié et complexe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques covalentes (Liu et Kokare, 2017). Selon (EC), les protéases appartiennent au groupe 3 et au sous-groupe 4 des hydrolases (Aguilar et Sato, 2017). On peut classer les protéases en fonction du pH, de la spécificité du substrat, de la similitude avec des enzymes bien caractérisées et de l'acide aminé du site actif (Ellaiah et al., 2002). Sur la base des pH optimaux, on trouve les protéases acides, neutres ou alcalines. En fonction de leur site d'action, les protéases sont classées comme endo- ou exoprotéases (Rao et

1- Recherche d'enzymes microbiennes

La nature offre une biodiversité importante, en ce qui concerne les microorganismes et leurs sources inestimables en enzymes (Adrio et Demain, 2014). Afin d'exploiter cette diversité un développement d'outils de recherche de nouvelles molécules telles que les enzymes microbiennes est mis au point par ces différentes méthodes :

- Analyse métagénomique (Rondon et *al.*, 1999 ; Gilbert et Dupont, 2011).
- Analyse du génome microbien (génomique) (Kaul et Asano, 2012).
- Recherche des extrêmophiles (Schiraldini et De Rosa, 2002 ; Kumar et *al.*, 2011).

1-1-Métagénomique

Les microorganismes sont connus pour leur diversité et leur capacité à coloniser plusieurs environnements mais moins de 1% sont cultivables dans des laboratoires (Adrio et Demain, 2014). La métagénomique est une approche puissante qui permet d'explorer la biodiversité d'un microbiote, présent dans un milieu donné appelé microbiome ainsi que leur activité, qu'ils puissent ou non être cultivés au laboratoire. Le terme métagénomique a été introduit pour la première fois par Handelsman et *al.* (1998). Une étude métagénomique passe par plusieurs niveaux (fig.8) :

- Niveau 1 : isolement de l'ADN génomique à partir d'un échantillon de l'environnement ;
- Niveau 2 : la construction de bibliothèques de clones pour l'insertion de l'échantillon d'ADN dans un vecteur adéquat puis l'ADN recombiné est transformé dans un organisme hôte (généralement *E.coli*)
- Niveau 3 : analyse de l'ADN en utilisant les outils bioinformatiques et des méthodes expérimentales de confirmation (Handelsman, 2004).

Afin de comprendre la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes présentes dans un milieu donné les études métagénomiques mettent en œuvre des approches, basées sur différentes méthodes de criblage (Suenaga, 2011) :

- Analyse shotgun ;
- Criblage basé sur la fonction ;
- Criblage basé sur la séquence) ;
- Les techniques de séquençage à haut débit.

Les quatre approches de métagénomique décrites ci-dessus peuvent être caractérisées comme une métagénomique non sélective (analyse par shot-gun et séquençage de nouvelle génération)

et ciblée (études axées sur l'activité et sur la séquence) en fonction de leurs stratégies de séquençage aléatoire et dirigé respectivement (Suenaga, 2011).

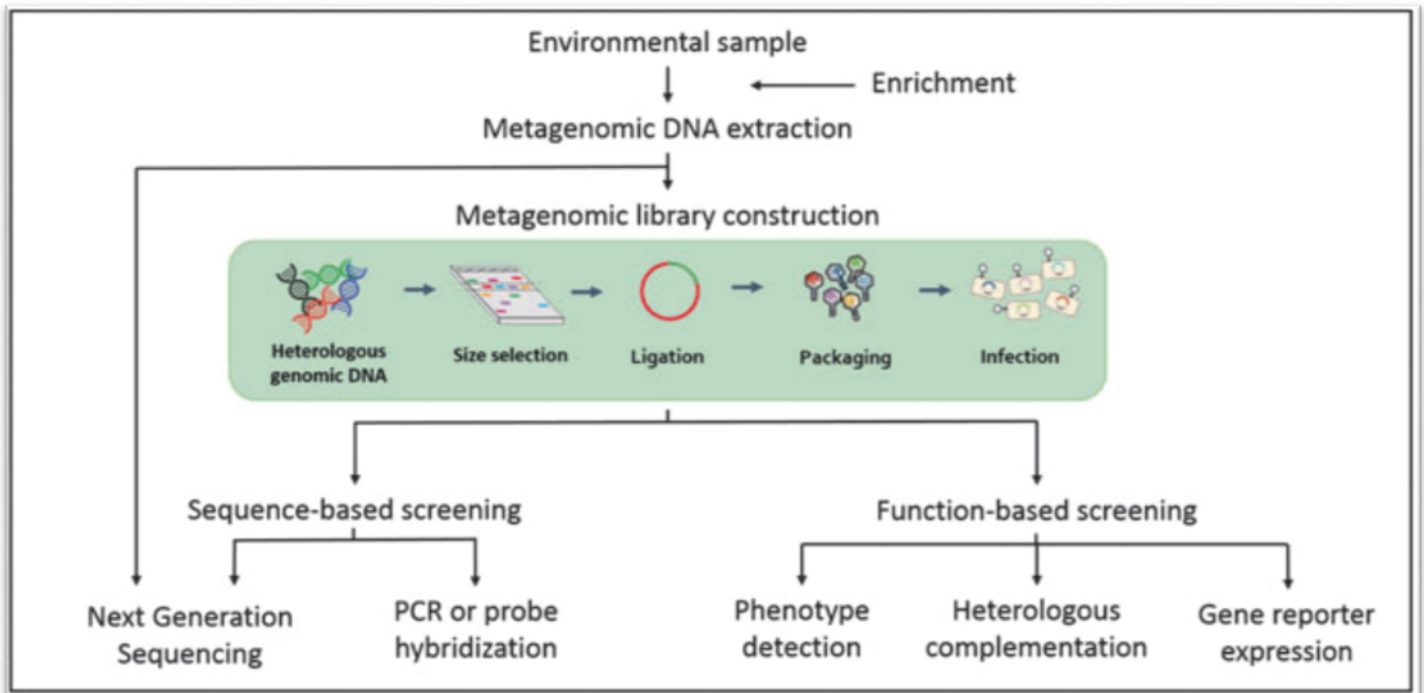


Figure 8 : Schéma qui résume l'approche métagénomique (Marco et al., 2016)

1-1-1-Métagénomique non sélective

1-1-1-1-Stratégie shotgun

La méthode de séquençage shotgun, comme son nom l'indique permet la fragmentation aléatoire de l'ADN en petits morceaux pour les analysés, cette méthode permet le séquençage rapide d'un génome de grande taille, mais elle présente le risque de rater quelques séquences lors de séquençage, qui est dû au nombre élevé de fragments générés par la fragmentation aléatoire. Elle s'effectue de la manière suivante (fig.9) (Gallardo et al., 1994) :

- Application des ondes sonores sur les échantillons d'ADN, afin d'obtenir des fragments de taille variable ;
- Réparation des fragments d'ADN en utilisant l'ADN polymérase T4 et l'enzyme de klenow, puis leur séparation selon la taille par électrophorèse sur gel d'agarose ;
- Après la sélection des fragments de taille souhaitée (généralement dans la gamme de taille de 1,5 à 3 kb), ils sont purifiés et insérés par ligature à bouts francs dans un vecteur de séquençage, tel que M13. Après la ligature, l'ADN est transformé dans un organisme hôte (*Escherichia coli*) ;

- Séquençage de l'ADN (Sanger ou NGS), les séquences obtenues (reads) sont alignées pour reconstruire la séquence complète par l'outil de bioinformatique qui va comparer entre elles (recherche d'homologie).

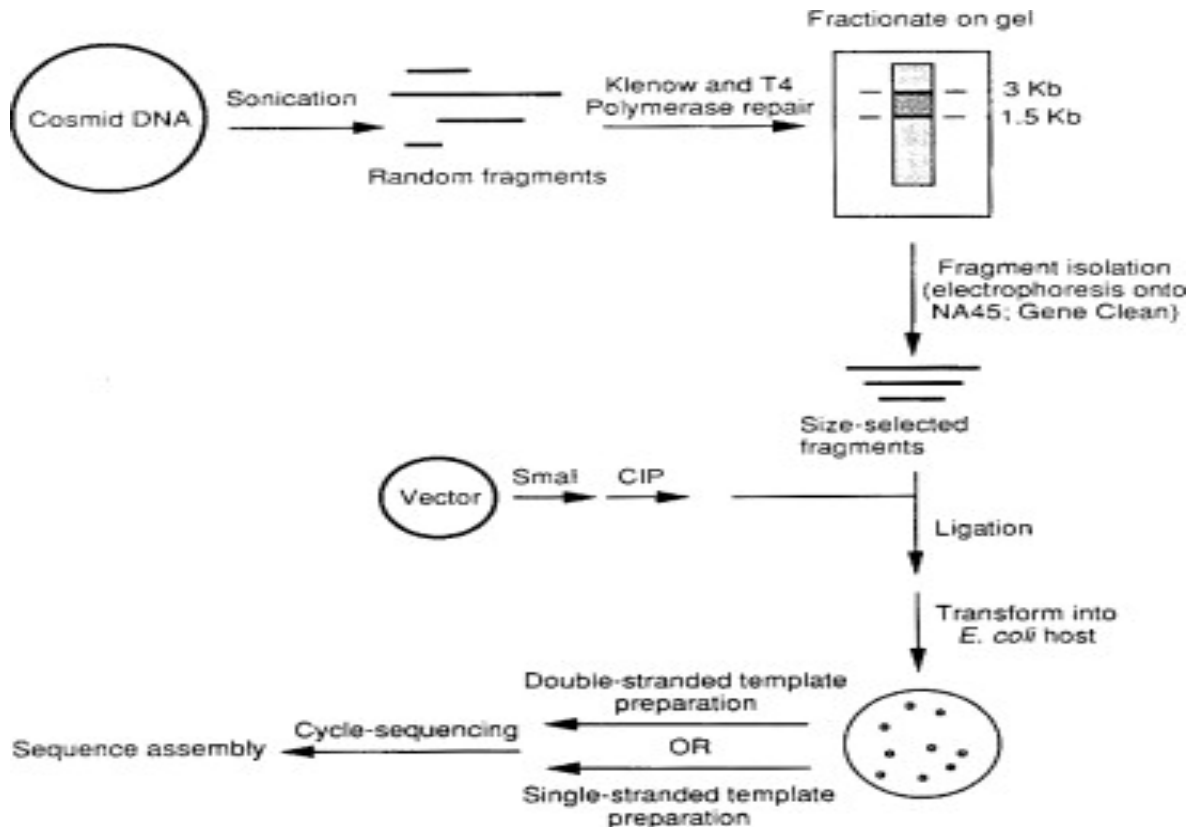


Figure 9 : Organigramme de la méthode shotgun utilisée pour le séquençage automatique de l'ADN (Gallardo et *al.*, 1994).

1-1-1-2-Séquençage haut débit (NGS)

Les NGS (Next Generation Sequencing) sont parmi les nouvelles technologies de séquençage, ils présentent la particularité d'être une technique rapide et efficace qui permet de séquencer un nombre assez important de fragments d'ADN de petite taille dans un temps réduit, sans avoir à passer par le clonage. Les fragments générés seront alignés et comparés par des logiciels de bioinformatique pour obtenir la séquence complète du génome mais le taux élevé de petits fragments générés empêche l'alignement correct des génomes en entraînant la formation de vides (gaps).

1-1-2-Métagénomique ciblée

1-1-2-1-Criblage basé sur la séquence

Le dépistage basé sur la séquence repose sur la recherche de gènes codant pour des classes d'enzymes particulières, en passant soit par la conception d'amorces PCR pour le séquençage des gènes ou par l'hybridation de sondes sur des régions conservées et des motifs de familles de protéines connues et la recherche d'homologie dans les bases de données (Ferrer et *al.*, 2009).

Cette approche, ne fournit pas de nouvelles informations sur les enzymes car elle repose uniquement sur les annotations des génomes déjà identifiés (Beja et *al.*, 2000). Les approches basées sur la séquence ont conduit à l'identification de gènes codant pour, les lipases (Bell et *al.*, 2002), glycérol déshydratase (Knietsch et *al.*, 2003), chitinases (Hjort et *al.*, 2010), les nitrilases (Gong et *al.*, 2013), et les estérases (Ferrer et *al.*, 2015).

1-1-2-2-Criblage basé sur la fonction

Contrairement à l'approche basée sur la séquence, l'approche fonctionnelle ne s'appuie pas sur les connaissances génomiques ultérieures et permet la découverte de nouvelles enzymes avec de nouvelles propriétés et donne ainsi des informations sur la fonction et la structure des enzymes. Le criblage fonctionnel passe d'abord par la construction de la bibliothèque d'expression de l'ADN métagénomique et trois stratégies différentes pour identifier les clones d'intérêt (Marco et *al.*, 2016) : détection phénotypique directe à l'aide d'un substrat colorimétrique ou fluorométrique spécifique (Handelsman, 2004). On utilise aussi la complémentation hétérologue des souches hôtes (Kazimierczak et *al.*, 2009 ; Mirete et *al.*, 2007) et l'expression de gènes rapporteurs (Uchiyama et *al.*, 2005).

La probabilité d'identifier un certain gène dépend de plusieurs facteurs (Marco et *al.*, 2016) :

- La méthode d'extraction d'ADN ;
- Le système hôte vecteur ;
- La taille du gène cible et son abondance dans le métagénome ;
- L'efficacité de l'expression génique hétérologue chez un hôte de substitution.

1-2-Génomique

La découverte de nouvelles enzymes en utilisant la génomique qui contrairement à la métagénomique, nécessite l'isolement et la culture des microorganismes et l'analyse d'un génome appartenant à une seule espèce. Deux approches sont utilisées pour découvrir de nouvelles enzymes.

- D'une part, les séquences à noter en tant qu'enzymes putatives sont clonées dans des systèmes d'expression permettant la surexpression du gène ainsi qu'une sélection de son activité.
- Une autre approche appelée Data mining, est basée sur l'alignement des séquences et la recherche d'homologie entre les séquences dans les bases de données en utilisant différents outils bioinformatiques (ex : Blast) (Adrio et Demain, 2014).

1-3-Extrêmophiles

Les extrêmophiles sont les microorganismes dont la croissance optimale s'effectue dans les milieux les plus extrêmes (exemple : les lacs glacés, les volcans, la mer morte, les sources hydrothermales...ect) de la planète. Le terme extrêmophile a été utilisé pour la première fois par MacElroy en 1974, il y'a environ trois décennies. La plupart des extrêmophiles appartiennent au domaine des archées, mais sont également retrouvés dans le domaine des eubactéries et celui des eucaryotes. Les extrêmophiles, sont classés selon le pH (acidophile, alcaliphile), la pression (piézophile), le rayonnement (radiorésistant), le potentiel redox (xérophile), la salinité (halophile) et la température (psychrotolérant, psychrophile, thermophile, hyperthermophiles) (Kour et al., 2020). Les microorganismes, qui supportent plus de deux conditions extrêmes, sont appelés polyextrêmophiles, comme par exemple ceux retrouvés dans des endroits à température élevée et une acidité élevée, une température élevée et une alcalinité élevée ou haute pression et basse température (Gomes et Steiner, 2004).

Les extrêmophiles, sont une source d'enzymes qui sont connus sous le nom d'extrêmozymes. Une extrêmozyme est une enzyme, souvent produite par des archées et d'autres microorganismes extrêmophiles, qui peuvent fonctionner dans des environnements extrêmes (conditions très acides / basiques, températures élevées / basses, salinité élevée ou autre facteurs). Les extrêmozymes présentent la caractéristique d'avoir une stabilité accrue et une activité efficace dans des conditions extrêmes, cela les rend des enzymes de choix pour les utilisations industrielles (Kour et al., 2020) (tableau III).

Chapitre II Recherche, Amélioration et production d'enzymes

Tableau III : Classification des extrêmophiles et les applications industrielles de quelques enzymes (Dumorné et *al.*, 2017 ; Van Den Burg, 2003).

Type de microorganisme	Caractéristiques de croissance	Enzyme	Application
Acidophile	pH optimal de croissance 3-4 ou moins	Amylase, glucoamylase Protéases Cellulases Oxydases	Traitement de l'amidon. Alimentation animale pour améliorer la digestion. Détergents. Désulfuration du charbon.
Alcaliphile	pH optimal de croissance supérieur à 10.	Protéases Cellulases	Détergents, alimentation. Fermentation de la bière et du vin, panification et transformation des jus de fruits.
Piezophile	Vivent à des pressions hydrostatiques de 40 MPa ou plus.	ND	Procèdes alimentaire et la production d'antibiotiques.
Radioresistant	Organismes résistants à des niveaux élevés de radiations ionisantes.	ND	ND
Xérophile	Organisme capable de croître à une (aw) basse et supportant la dessiccation.	ND	ND
Halophile	Organismes qui nécessitent au moins 1M de NaCl pour croître.	Protéases	Synthèse des peptides.
Psychrophiles	température de croissance optimale de 10 °C et une température maximale de 20°C.	Protéases	Détergents, alimentation.
Thermophiles	Organismes qui peuvent prospérer à des températures d'humidité comprises entre 60 °C et 85 °C.	Protéases Lipases, estérases	Détergents, hydrolyse dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, brassage, cuisson. Détergents, réactions stéréoscopiques (par exemple : transestérification, biosynthèse organique).
Hyperthermophile	Organismes ayant une température de croissance optimale de 80 °C ou plus.	ND	ND

ND : Non Déterminé.

2-Amélioration des enzymes

L'utilisation des enzymes dans l'industrie, nécessite quelques améliorations qui permettent l'obtention d'une enzyme spécifique avec une activité élevée ainsi qu'une enantiosélectivité élevée envers des substrats complexes, cela afin de réduire le coût et le temps de production (Steiner et Schwab, 2012). L'amélioration est effectuée par deux techniques : le design rationnel des biocatalyseurs existants et les méthodes combinatoires qui recherchent la fonctionnalité souhaitée dans des bibliothèques générées au hasard (Adrio et Demain, 2014). Des approches hybrides ont été développées reliant entre les deux approches précédentes appelées « conception semi-rationnelle », la figure (10) résume les trois techniques d'amélioration (Porter et *al.*, 2016). On peut rencontrer d'autres problèmes, comme le manque de stabilité à long terme et une récupération et une réutilisation difficile des enzymes. Ces contraintes peuvent généralement, être surmontées par l'immobilisation de l'enzyme sur des supports.

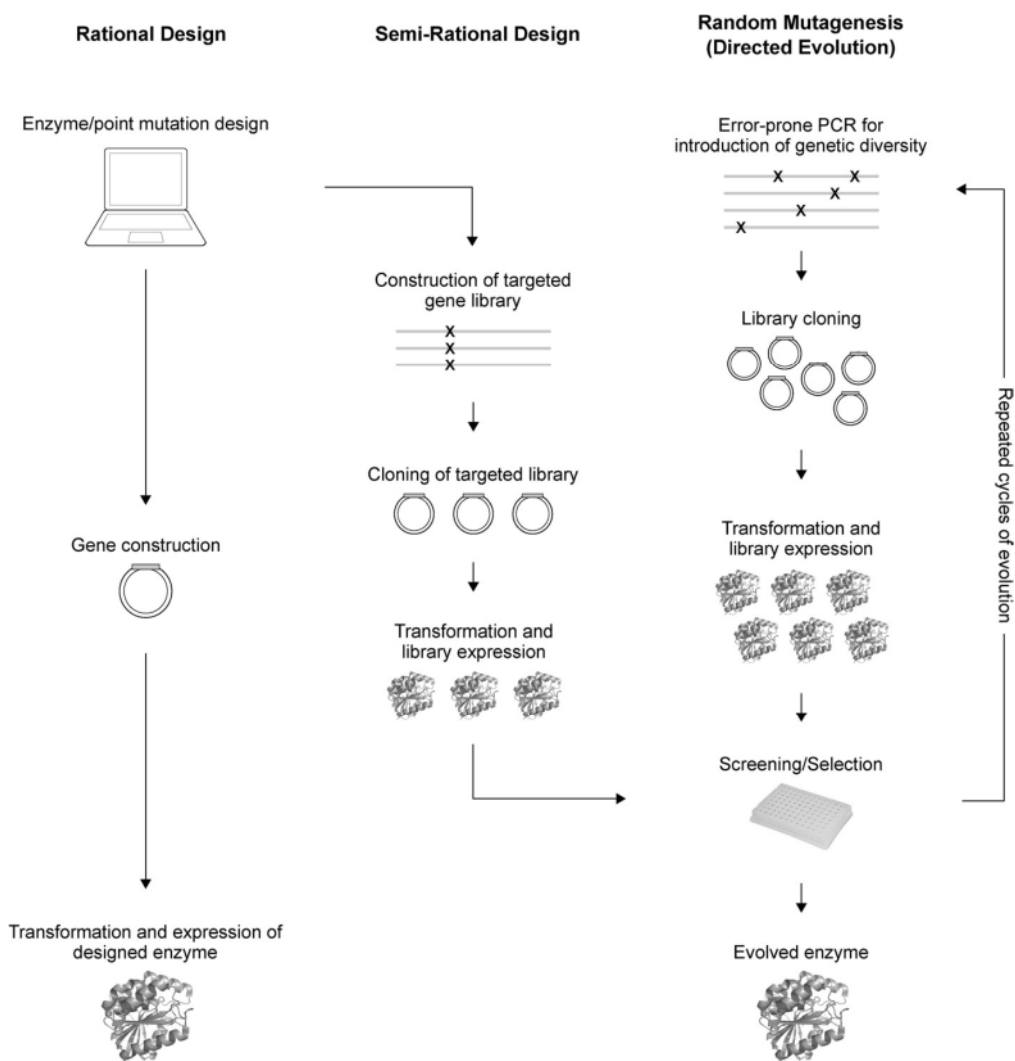


Figure 10 : Schéma illustrant les stratégies d'amélioration d'enzyme (Porter et *al.*, 2016).

2-1-Rational design

Cette approche repose sur la mutagenèse dirigée qui cible les substitutions d'acides aminés (Adrio et Demain, 2014). La conception rationnelle nécessite des connaissances, sur les données biochimiques, les structures protéiques et les données de modélisation moléculaire pour proposer des mutations ciblant des endroits spécifiques sur la molécule (Steiner et Schwab, 2012). Présente un avantage, de produire moins de variantes ce qui rend l'évaluation rapide, elle aide aussi à évaluer les aspects structurels et fonctionnels de résidus d'acides aminés particuliers dans une protéine (Baweja *et al.*, 2016).

2-2-Méthodes combinatoires

L'évolution dirigée ne repose pas sur une compréhension détaillée de la relation entre la structure et la fonction des enzymes ; elle repose plutôt sur l'application de mutations aléatoires puis la sélection des variantes générées. Comme le montre la (fig. 11), à partir d'un gène cible ou d'un ensemble de gènes cibles, une banque de gènes mutants est créée par mutagenèse aléatoire (PCR sujette aux erreurs) et / ou recombinaison génique (shuffling DNA). Les variantes produites sont ensuite clonées dans un vecteur qui est à son tour introduit dans des microorganismes hôtes pour l'expression des protéines. Les protéines mutantes fonctionnellement améliorées sont identifiées par une sélection soigneusement conçue ou une méthode de criblage à haut débit, et utilisées par la suite comme modèles pour le nouveau cycle d'amélioration. Le cycle est répété plusieurs fois jusqu'à ce que l'objectif soit atteint ou qu'aucune amélioration supplémentaire ne soit possible. Le choix des méthodes de mutations et des méthodes de criblage ou de sélection appropriées est crucial pour le succès de cette technique (Johannes et Zhao, 2006).

2-2-1-PCR sujette aux erreurs

Le principe de la PCR sujette aux erreurs repose sur l'utilisation d'une ADN polymérase défectueuse, qui induit des mutations aléatoires lors de la réplication. Cependant, cette ADN polymérase défectueuse ne permet pas d'obtenir un taux élevé de mutations, pour augmenter le taux de mauvaise incorporation de nucléotides, il faut jouer sur la variation du rapport nucléotidique, en augmentant la concentration de Mg^{2+} ou l'ajout de Mn^{2+} (Porter *et al.*, 2016).

2-2-2-DNA shuffling

DNA shuffling, également appelée recombinaison génétique, implique la fragmentation et la recombinaison ultérieure de plusieurs séquences d'ADN dans le but de combiner des mutations bénéfiques. La méthode originale, utilise la désoxyribonuclease I pour fragmenter les gènes et la PCR auto-amorçante pour remonter les fragments (Porter et *al.*, 2016).

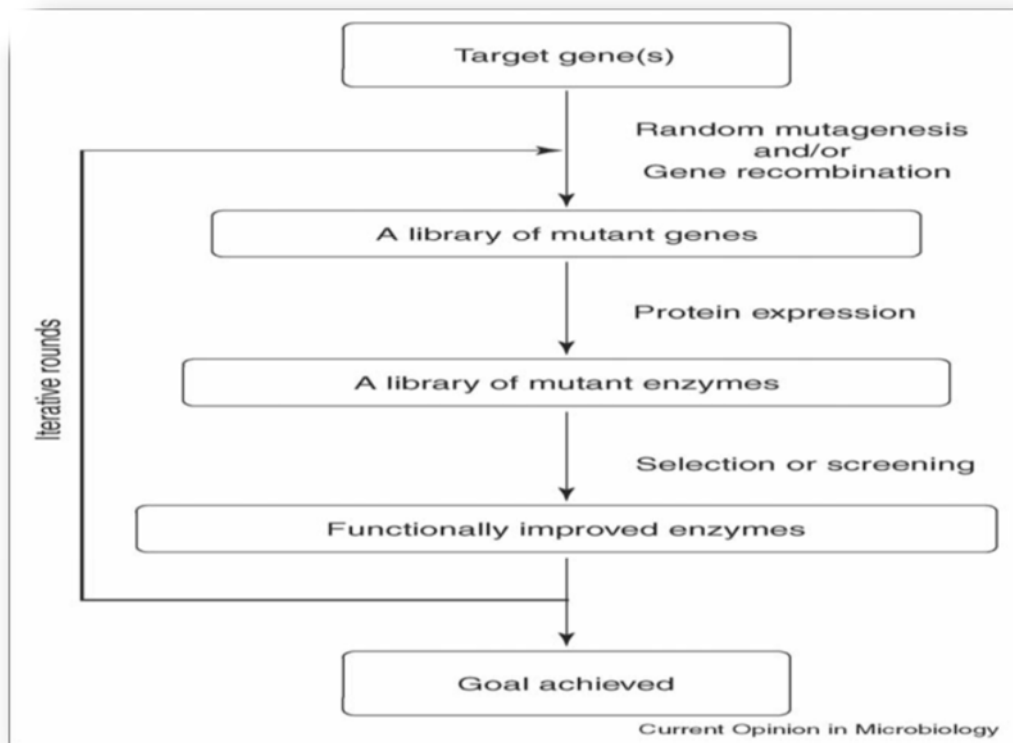


Figure 11 : Schéma général de l'évolution dirigée.

2-3-Immobilisation d'enzymes

C'est une technique qui consiste en le maintien de l'enzyme fixée sur des supports solides. Elle s'effectue par différentes manières dont l'adsorption, piégeage et par réticulation (Roger et Sander, 2013) (fig.12), afin de les rendre plus stables, faciles à séparer du produit, une récupération et une réutilisation efficace

2-3-1-Adsorption

Dans cette méthode physique, les enzymes sont immobilisés de manière réversible sur un support solide. L'activité enzymatique est maintenue lors de l'adsorption mais les enzymes sont susceptibles de se détacher du support solide en raison de l'interaction relativement faible avec

le support (Mateo et *al.*, 2007), les supports utilisés dans cette méthode, sont les résines synthétiques, les biopolymers tels que les polysaccharides ou la silice (Roger et Sander, 2013).

2-3-2-Piégeage

Le piégeage est une technique d'adsorption simple (Aravind et *al.*, 2017), il s'agit du piégeage par inclusion d'une enzyme dans un réseau constitué de polymères organiques ou inorganiques, comme le polyacrylamide et le sol-gel de silice ou un dispositif à membranes telles qu'une fibre creuse ou une microcapsule (Roger et Sander, 2013).

2-3-3-Réticulation

La réticulation est utilisée pour lier les enzymes entre elles de manière covalente. Cette technique est efficace lorsqu'une charge importante d'enzymes est nécessaire sans utilisation de support (Sheldon, 2007), les enzymes sont précipitées après être réticulées à l'aide d'agents tels que le glutaraldehyde ou l'aldéhyde dextrane (Sheldon, 2011).

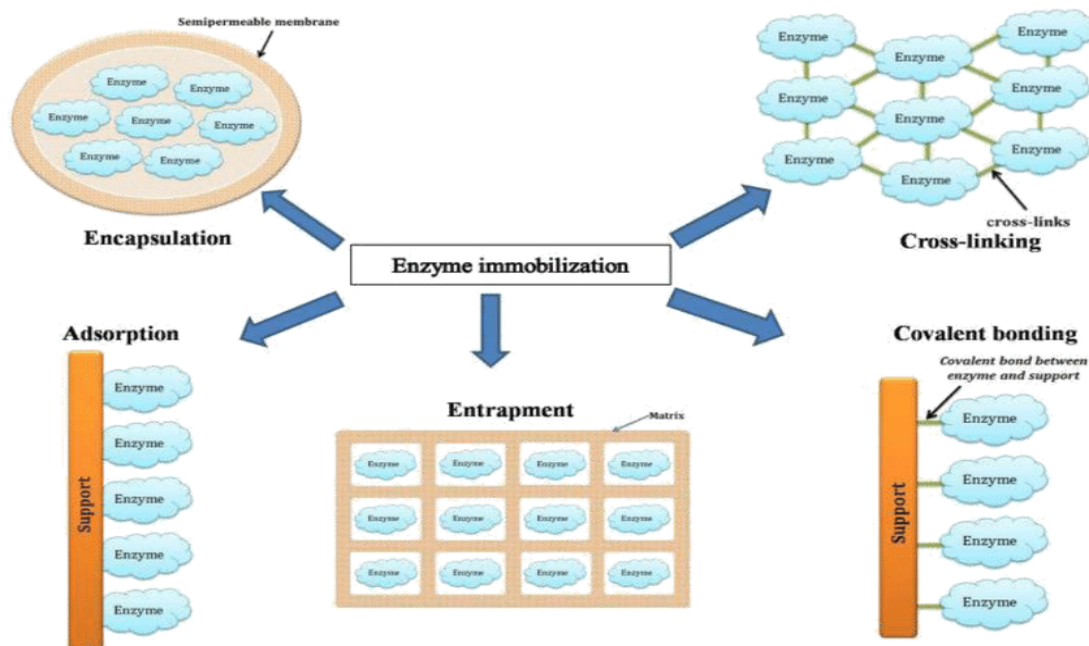


Figure 12 : Les méthodes d'immobilisation d'enzymes (Panchatchram et Vivekanandan, 2018).

3-Production

La source microbienne est préférée aux plantes et aux animaux pour la production d'enzymes principalement pour les raisons suivantes :

- Les enzymes peuvent être produites à grande échelle et sont économiques (Seo et *al.*, 2016 ; Rodríguez et *al.*, 2014) ;
- Le processus d'extraction et de purification des enzymes à partir de sources microbiennes est plus facile (Singh et *al.*, 2016) ;
- Les sources microbiennes sont capables de produire une variété d'enzymes dans différentes conditions environnementales dans un espace et une période de temps limités (Adrio et Demain, 2014).

3-1-Conditions de production

« Un nouveau produit enzymatique, ne devient un succès commercial que s'il existe un marché et si il peut être produit de manière économique » (Volsky et *al.*, 1984). Les conditions suivantes doivent être respectées afin de répondre aux critères cités ci-dessus :

- ✓ L'organisme doit produire l'enzyme avec des rendements et des concentrations élevées ;
- ✓ Les contaminations enzymatiques indésirables et la teneur en métabolites dans le bouillon de fermentation doivent être minimales ;
- ✓ La récupération de l'enzyme doit être techniquement réalisable et peu coûteuse ;
- ✓ En terme de risque biologique, le processus de production et son produit doivent être sûrs pour le personnel impliqué et pour le consommateur ;
- ✓ Le traitement des effluents du processus de production doivent être techniquement et économiquement réalisables.

3-2-Processus de production

3-2-1-Etapes avant fermentation

1) Préparation d'inoculum

Une culture pure de la souche sélectionnée du microorganisme est cultivée dans un flacon de laboratoire, ces flacons sont utilisés pour inoculer les bioréacteurs pilotes qui à leur tour sont utilisés pour inoculer le fermenteur de production. La taille optimale de l'inoculum varie généralement de 2 à 10% du volume total du milieu de production. En général, l'inoculum doit être suffisamment grand pour permettre un démarrage rapide et diminuer le risque d'altération, de contamination et d'obtenir le meilleur rendement lors du traitement (Volsky et *al.*, 1984) .

2) Milieu de culture

Afin d'obtenir une croissance optimale des microorganismes avec un meilleur rendement de produits, il est nécessaire de fournir les éléments nutritifs suivants dans le milieu de culture : une source de carbone, d'azote et certains besoins comme les acides aminés et les vitamines essentielles, ainsi que des minéraux tels que le Ca, Mg, Fe, Mn, Au, Cu, Co. Pour stimuler la production d'enzymes d'autres sources sont ajoutées, comme le lactose par exemple doit être fourni si des β -galactosidases sont souhaitées.

3) Stérilisation du milieu de culture

Le milieu de culture peut être stérilisé par différentes manières et à différents niveaux. A l'échelle industrielle le milieu de culture est soit stérilisé à part par des moyens de stérilisation, tel que la chaleur sèche et le bioréacteur à part ou lorsque il est introduit à l'intérieur du bioréacteur par le moyen de la vapeur d'eau chaude. Si le milieu contient certains composés sensibles à la chaleur (thermolabiles) comme les sucres, les vitamines sont stérilisés par filtration stérilisante puis sont ajoutés au milieu de culture.

3-2-2-Fermentation

3-2-2-1-Fermentation sur milieu solide

La fermentation sur milieu solide (SSF), comme son nom l'indique est une technique de fermentation où les microorganismes croissent sur des matériaux solides en absence de liquide libre. Elle utilise généralement, les microorganismes filamenteux comme les champignons pour la transformation des aliments et la production d'enzymes. Dans la technique SSF, les microorganismes sont cultivés sur et à l'intérieur du substrat solide humidifié pour les aider à croître (Prabhakar et *al.*, 2005).

Avantages

- Une concentration relativement plus élevée des produits ;
- Moins de génération d'efflux ;
- Une main d'œuvre moins formée ;
- Un équipement de fermentation faible ;
- Economique par l'utilisation des déchets agro-industriels comme substrat (Panday et *al.*, 2007).

3-2-2-2-Fermentation submergée

La fermentation submergée (SmF), a lieu dans un environnement liquide sous agitation et aération, implique l'utilisation des microorganismes qui produisent des enzymes extracellulaires. Les fermenteurs à grande échelle, pour SmF variant en volume de milliers à cent mille litres, et permettent le contrôle en ligne des paramètres suivants : le pH, la température, l'OD (oxygène dissout) et la formation de mousse ; de plus il n'y a pas de problème de transfert de masse et l'évacuation de la chaleur (Patel et *al.*, 2017).

3-3-Amélioration des souches

3-3-1-Mutation

Parmi les méthodes utilisées pour l'amélioration des souches, la mutagenèse par rayonnement UV ou la mutagenèse chimique ont été appliquées pour trouver des variantes utiles. Le but de cette technique est d'avoir une productivité globale plus élevée.

Il existe plusieurs exemples de souches mutantes connues sous le nom d'hyperproductrices telles que : *Trichoderma reesei* RUT C-30, qui est l'un des meilleurs producteurs de cellulases depuis des décennies (Patel et *al.*, 2017).

3-3-2-ADN recombinant

La technologie de l'ADN recombinant consiste à insérer un fragment d'ADN d'intérêt dans un vecteur, le choix du vecteur dépend de la taille du fragment insert, qui peut être soit un plasmide, phage, YAC ou cosmide... ect, le vecteur recombiné est transformé dans un organisme hôte qui permet l'expression du gène d'intérêt. La technologie de l'ADN recombinant, permet la production d'enzymes à des niveaux 100 fois plus élevés que l'expression native, les rendant disponibles à faibles coût et en grande quantité (Shu-Jen, 2004).

- ✓ **Plasmide** : ADN bactérien extrachromosomique, circulaire double brin, portant des gènes de résistance aux antibiotiques et une origine de réplication leur permettant une réplication autonome. Ils peuvent intégrer des fragments d'ADN qui peuvent aller jusqu'à 10 kb.
- ✓ **Phages** : ce sont des virus, dont il est possible de remplacer certaines séquences par de l'ADN exogène en conservant les régions nécessaires à leur capacité d'infecter les bactéries, avec une capacité d'insertion de fragments d'ADN de 10 à 20 kb.
- ✓ **Cosmides** : il s'agit d'un plasmide modifié, contenant les extrémités cohésives des bactériophages lambda permettant l'empaquetage in vitro de longs fragments d'ADN d'environ 45 kb.

- ✓ **YACs (Yeast Artificial Chromosome)** : qui signifie chromosome artificiel de levures, ce sont des vecteurs utilisés pour incorporer des fragments d'ADN de grande taille qui sont compris entre 150 et 1000 kb (Briand et Cavard, 1997 In : Kamoun, 1997).

4-Downstream processing

Après la fermentation, on obtient un liquide visqueux appelé « moût de fermentation », dans lequel se trouve le produit, la biomasse et les déchets, la première étape qui suit est de séparer les insolubles du moût de fermentation par différentes techniques de séparation parmi elles la filtration, la centrifugation et bien d'autres, le choix de la technique réside dans la taille du microorganisme ou de la molécule. Ensuite, vient l'étape d'extraction du produit souhaité dans ce cas le choix de la technique d'extraction dépend de la localisation des enzymes intra ou extracellulaire, pour cela les méthodes diffèrent selon le cas. Si on souhaite, l'obtention d'un produit hautement purifié par exemple dans l'industrie pharmaceutique, des méthodes plus avancées sont nécessaires telles que les techniques chromatographiques.

4-1-Méthodes d'extraction

4-1-1-Extraction d'enzymes intracellulaires

Si le produit désiré est intracellulaire les cellules doivent être brisées. La méthode de fragmentation dépend du type cellulaire et de la nature du produit intracellulaire d'intérêt.

Ces méthodes peuvent être classifiées en :

4-1-1-1-Méthodes physiques

- **Choc osmotique**

Le choc osmotique, c'est une technique douce qui permet l'éclatement de certaines cellules fragiles avec un minimum de dommages. Les cellules sont incubées dans une solution hypotonique, cherchant à établir l'équilibre osmotique entre le milieu interne et externe, l'eau pénètre dans la cellule et finit par causer une rupture de la membrane plasmique (turgescence) et la libération des constituants cellulaires (Leblanc, 2013).

4-1-1-2-Méthodes mécaniques

- **Congélation et décongélation**

La suspension microbienne, subit un refroidissement brusque, ce qui va induire la formation de cristaux qui à leur tour entraînent la formation des pores au niveau de la paroi cellulaire provoquant la libération de son contenu.

- **Billes de verre**

Le principe de cette méthode repose sur l'action abrasive des billes de verre sur la suspension contenue dans l'appareil en agitation qui fait tourbillonner les billes, le contact entre eux provoque la désintégration des cellules et la rupture de la paroi cellulaire, afin d'éviter une éventuelle explosion de l'appareil de l'eau glacé est utilisé.

- **Homogénéisateur de type Donce**

L'homogénéisateur type donce ressemble à une éprouvette dans laquelle s'enfonce un piston serré, le passage des cellules dans l'espace entre le piston et la paroi interne du tube cause leur désintégration (Gaillet, 2013).

- **Sonication**

Application des ultrasons dans un liquide contenant des cellules. Les forces de cavitation et de cisaillement résultantes amènent à la perturbation et la lyse des cellules.

4-1-1-3-Enzymes lytiques

C'est une technique, qui permet la désintégration de la paroi cellulaire, en utilisant des enzymes lytiques telles que les cellulases, les pectinases, xylanases et les protéases...etc. (Kumar et Garg, 2006).

4-1-2-Extraction d'enzymes extracellulaires

Les enzymes extracellulaires, se trouvent dans le moût de fermentation avec les différentes molécules produites et les débris cellulaires pour les séparer il existe plusieurs techniques comme :

- **Centrifugation**

La centrifugation, est une méthode mécanique qui permet de séparer les particules d'un mélange hétérogène. La séparation s'effectue selon le poids moléculaire de molécules ayant une faible densité.

- **Coagulation et floculation**

La coagulation est la formation de petits floccs à partir de colloïdes dispersés en utilisant des agents coagulant ; La floculation est l'agglomération de ces petits floccs en plus grosses particules en utilisant des agents floculant qui sont généralement des polyélectrolytes ou des sels minéraux (Gaillet, 2013).

- **Ultrafiltration sur membrane**

L'ultrafiltration, est une méthode physique de séparation. Elle utilise des membranes poreuses dont la taille des pores est comprise entre 100 et 2nm pour séparer des éléments dissouts tels que les virus, les protéines dans un liquide. Cette technique permet de circuler le liquide tangentielllement à la surface du media filtrant, la membrane poreuse est sous l'effet de la pression, une partie du liquide traverse la membrane pour être clarifié (fig.13) (Kamoun, 1997).

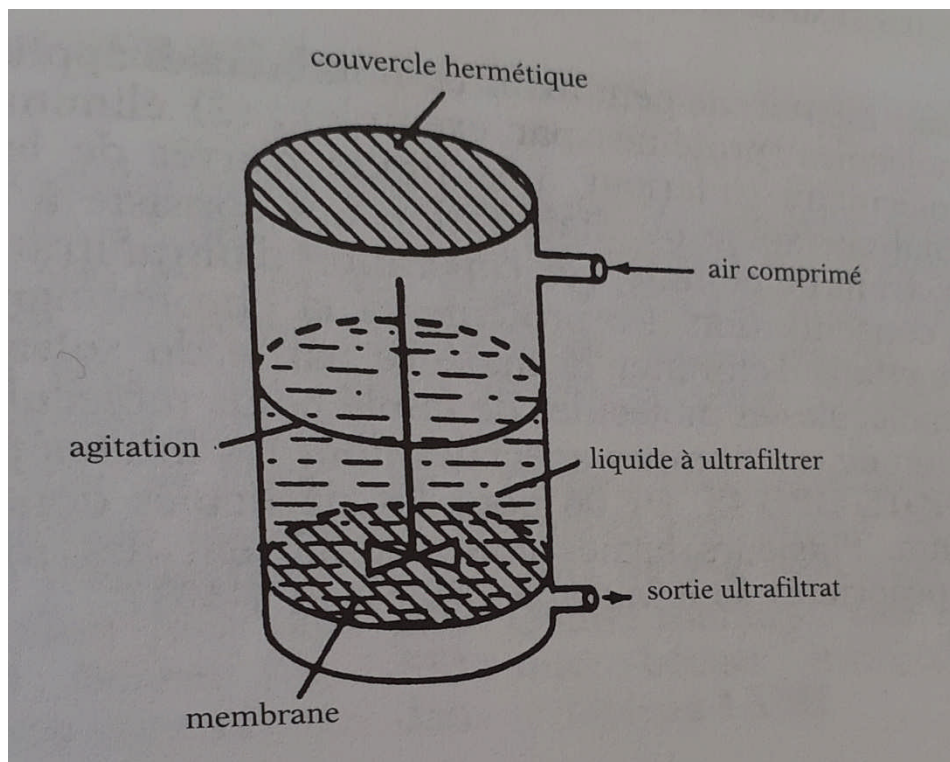


Figure 13 : Schéma d'une cellule d'ultrafiltration.

- **Précipitation par des sels**

C'est une technique qui repose sur la différence de solubilité des protéines contenue dans une solution d'eau en présence de molécules ioniques exemple du sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ qui est utilisé dans la majorité des cas. Chaque protéine précipite à un certain seuil selon son affinité avec le sel et la concentration du sel présent dans le milieu, si on ajoute une faible concentration en ions, on observe un phénomène de « salting-in » qui augmente la solubilité des protéines. Par contre, si on augmente très fortement la concentration en ions qui conduit à la saturation de la solution en sel, cela se traduit par la liaison des protéines

avec le sel et leur détachement des particules de l'eau (précipitation), c'est le phénomène « salting-out » appelé également phénomène de relargage par des sels.

- **Dialyse**

La dialyse est une technique qui permet de séparer des substances en utilisant leurs capacités respectives à franchir les pores d'une membrane appelée membrane de dialyse. Les membranes de dialyse habituellement utilisées, se présentent sous forme de cylindre allongé qu'il faut fermer aux deux extrémités et qui contiennent le liquide à dialyser. Ce cylindre prend le nom de « boudin » de dialyse. Il est placé dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse ou liquide de contre dialyse (fig. 14) (Kamoun, 1997).

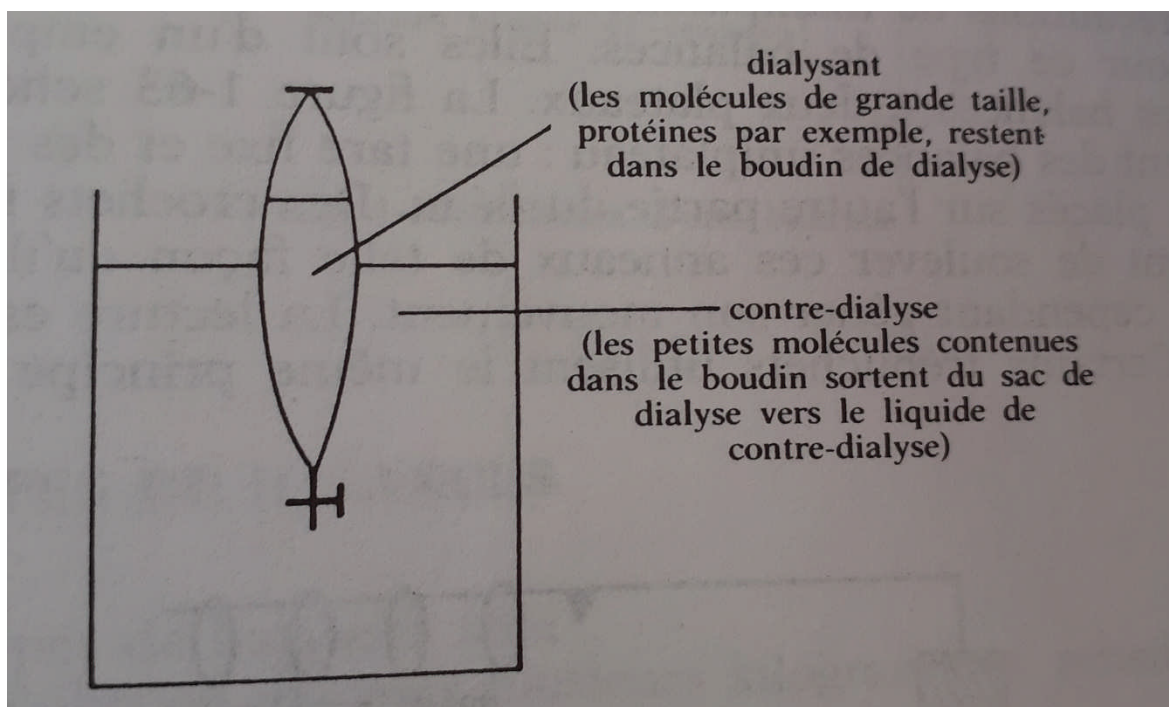


Figure 14 : Schéma général de dialyse.

- **Electrophorèse**

L'électrophorèse, est une technique qui permet la séparation des particules selon leur charge, leur masse moléculaire et leur taille. La migration est poussée par un champ électrique sur un gel dont la composition peut varier selon la nature de la molécule à séparer (gel d'agarose pour les acides nucléiques et le gel de polyacrylamide pour les protéines), la densité du gel utilisé est en fonction du diamètre des particules, la vitesse de migration va être variable ce qui permet la séparation de différentes molécules.

- **Méthodes chromatographiques**

La chromatographie, est une technique qualitative et quantitative qui permet la séparation des particules dans une colonne chromatographique constituée de deux phases hétérogènes : une phase dite stationnaire (fixée sur le support) qui est généralement solide et une phase mobile (éluant) qui est soit un gaz ou un liquide. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants par l'éluant qui traverse la colonne, la vitesse d'entraînement diffère selon les propriétés intrinsèques des molécules (taille, structure,) ou à leur affinité avec la phase stationnaire et la phase mobile (polarité).

Les chromatographies échangeuses d'ions et les chromatographies d'affinité sont les deux techniques les plus exploitées en industrie pour la purification des enzymes, en raison de leur application à de bons volumes ainsi que leur spécificité de séparation.

- **Chromatographie d'affinité**

La chromatographie d'affinité, est une technique qualitative, qui repose sur l'interaction spécifique présente entre deux molécules ayant une grande affinité entre elles, exemple : la formation des complexes enzymes-substrat ou antigènes-anticorps, la fixation d'une hormone sur son récepteur, la fixation de certaines cellules sur des macromolécules extracellulaires. Dans cette méthode, l'un des composés est purifié et fixé par des liaisons covalentes sur la matrice et permet à son tour la fixation de l'autre molécule en formant un complexe pour la séparer du mélange, par exemple une solution contenant l'enzyme passe à travers la colonne et se fixe spécifiquement au substrat, tandis que, toutes les autres molécules de la solution s'écoulent dans l'effluent. Après lavage, il suffit de faire passer un tampon contenant des sels minéraux à une assez forte molarité pour que les molécules adsorbées se détachent du ligand et passent pures dans l'éluant (fig. 15) (Borel et Randoux, 1997 In : Kamoun, 1997).

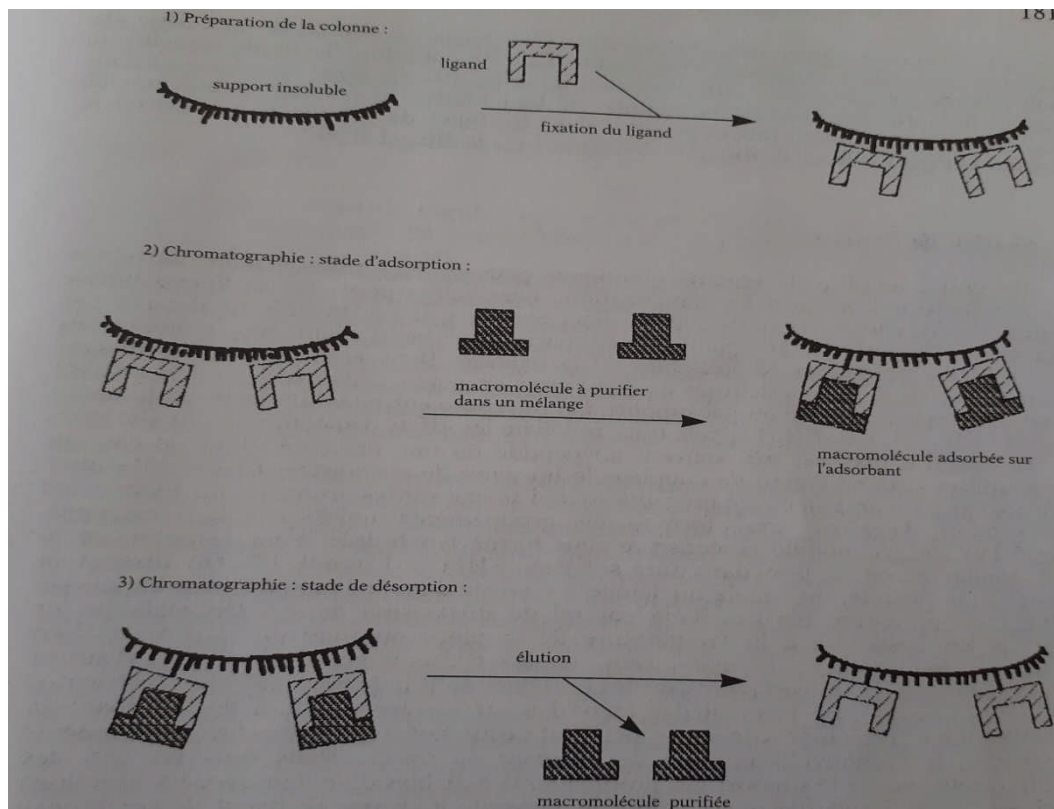


Figure 15 : Schéma illustrant la chromatographie d'affinité.

➤ Chromatographie échangeuse d'ions

Dans la chromatographie échangeuse d'ions, le paramètre qui détermine la manière dont les molécules se séparent est la charge nette. Les échangeurs d'ions sont des substances hautement polymérisées constituant un réseau tridimensionnel portant des fonctions acides ou basiques. Il existe des échangeurs de cations et des échangeurs d'anions, on remarque qu'une résine anionique est échangeuse de cations et une résine cationique est échangeuse d'anions (Borel et Randoux, 1997 In : Kamoun, 1997).

1-Applications des enzymes

Avec l'augmentation croissante des besoins mondiaux des populations et les impacts environnementaux, liés à l'utilisation de produits chimiques dans les industries, les enzymes semblent être la meilleure alternative pour les industriels. En raison de leur potentiel enzymatique élevé et leur capacité à dégrader des substances complexes et leur caractère renouvelable et respectueux de l'environnement. Actuellement, environ 200 types d'enzymes microbiens parmi 4000 enzymes connues, sont utilisés dans le commerce. Cependant une vingtaine d'enzymes seulement sont produites à une échelle véritablement industrielle. Elles sont exploitées dans différents secteurs tels que : laitier, agricole, médical, alimentaire, environnemental...ect (Liu et Kokare, 2017).

1-1-Domaine médical**1-1-1-Enzymes thérapeutiques**

Les enzymes thérapeutiques, présentent une variété d'utilisations spécifiques, elles sont utilisées comme des anticoagulants et pour remplacer les déficiences métaboliques. Les sources de ces enzymes doivent être sélectionnées dans le plus grand soin pour éviter toute possibilité de contaminations indésirables et également pour permettre une purification facile ; elles sont généralement, commercialisées sous forme de préparations pures lyophilisées, à un coût considérablement élevé (Gurung et *al.*, 2013).

Exemples d'enzymes et leurs applications :

- Les collagénases : qui hydrolysent le collagène natif et évitent l'hydrolyse d'autres protéines a été utilisé dans le traitement des ulcères cutanés et brulures.
- La désoxyribonucléase : est utilisée comme agent mucolytique chez les patients atteints de bronchites chroniques.
- La trypsine et la chymotrypsine : ont été utilisées avec succès dans le traitement des blessures sportives et des traumatismes postopératoires de la main (Liu et Kokare, 2017).
- Hyaluronidase : a une activité hydrolytique sur le sulfate de chondroïtine et peut aider à la régénération des tissus nerveux endommagés (Moon et *al.*, 2003)

1-1-2-Autres applications

Les enzymes sont utilisées dans les procédures de diagnostic telles que ELISA et les kits de test du diabète (Mane et Tale, 2015) et également pour estimer la concentration du substrat et pour déterminer l'activité catalytique de l'enzyme présente dans les échantillons biologiques.

1-2-Domaine alimentaire

1-2-1- Industrie laitière

Dans l'industrie laitière, les enzymes microbiennes utilisées ont un rôle important dans l'amélioration des caractéristiques organoleptiques telles que l'arôme, la couleur et la saveur ainsi qu'un rendement important en produits laitiers (Pai, 2003 ; Quveshi et *al.*, 2015). Les besoins mondiaux en fromage produit par des microorganismes présurés représentent environ 33% par jour (Van Kampen et *al.*, 2013). Les enzymes des microorganismes utilisées en industrie laitière sont résumés dans le tableau (IV).

Tableau IV : Enzymes microbiens utilisés en industrie laitière.

Enzyme	Utilisation	M.O	Référence
Lipase	-Amélioration de la saveur. -Accélération du processus de fabrication du fromage. -Lipolyse de la crème.	<i>Aspergillus niger</i>	(Sharma et Sharma, 2017). (Svendsen, 2000). (Aravindon et <i>al.</i> , 2007).
Aminopeptidase	-Amélioration de la saveur des produits laitiers fermentés. -Minimiser les propriétés allergiques.	<i>Lactobacillus</i> sp.	(Masoud et <i>al.</i> , 2017). (Abada, 2019).
Catalase	-Production du fromage Suisse. -Pasteurisation. -Conserver les enzymes naturelles du lait.	<i>A.niger</i>	(Perin et <i>al.</i> , 2017).
Présure	-Production du fromage de haute qualité. -Coagulation du lait.	<i>A.oryzae</i> <i>Rhizomucor pusilus</i>	(Farkye, 1995 ; Fox, 1998 ; Green, 1993). (Abada, 2019)
Lactase (β galactosidase)	-Amélioration de la solubilité et la douceur des produits laitiers. -Minimiser ou éliminer la teneur en lactose. -Agent digestif des produits laitiers.	<i>E.coli</i> <i>Kluyveromyces</i> sp.	(Singh et <i>al.</i> , 2016). (Soares et <i>al.</i> , 2012 ; Qureshi et <i>al.</i> , 2015).
Transglutamase (Tgase)	-Polymérisation des protéines du lait.	<i>Streptomyces</i> sp.	(Domagata et <i>al.</i> , 2016). (Abada, 2019).

1-2-2-Boulangerie

Les enzymes jouent un rôle majeur dans l'industrie de la boulangerie, en améliorant la texture, la forme et le goût des produits tels que le pain, la pâtisserie, les gâteaux et les biscuits en rentrant dans leur composition. Le tableau (V) résume les différentes utilisations d'enzymes dans la boulangerie industrielle (Al Maqtari *et al.*, 2019).

Tableau V : Les enzymes microbiennes utilisées en boulangerie.

Enzymes	Utilisations	Références
Amylase (alpha-amylase)	-Améliore la structure de la mie et le volume du pain. -Retenir l'humidité plus efficacement pour augmenter la douceur, la fraîcheur, la conservation.	(Al Maqtari <i>et al.</i> , 2019) (Kurachi <i>et al.</i> , 1997 ; Moore <i>et al.</i> , 2006 ; Kieliszek <i>et Misiewicz</i> , 2014)
Lipase et xylanase	-Le contrôle d'aération du produit. -La stabilité et le conditionnement de la pâte.	(Campbell <i>et Mougeot</i> , 1999 ; Sconlon <i>et Zghal</i> , 2001).
Glucose-oxydase et lipogenase	-Améliorer le renforcement de la pâte.	(Singh <i>et al.</i> , 2016).
Transglutaminase	-Amélioration de la qualité de la farine, -la texture du pain et la texture des pâtes cuites.	(Kurachi <i>et al.</i> , 1997 ; Moore <i>et al.</i> , 2006 ; Kieliszek <i>et Misiewicz</i> , 2014).

1-2-3-Industrie des boissons

Les enzymes sont utilisées dans les industries brassicoles, pour digérer la paroi cellulaire lors de l'extraction de la matière végétale, afin de fournir un rendement, une couleur et un arôme améliorés et des produits plus clairs (Karlund *et al.*, 2014). Elles sont également utilisées dans l'industrie des jus de fruits et de légumes pour améliorer l'efficacité des opérations, par exemple éplucher, presser, clarifier, extraire.....ect (Law, 2002) (tableau VI).

Tableau VI : Enzymes microbiennes utilisées en industrie des boissons.

Enzymes	Utilisations	Références
Amylase	-Clarification des jus. -Hydrolyse d'amidon.	(Vaillant et <i>al.</i> , 2001 ; Sivaramakri-Shnan et <i>al.</i> , 2006). (Singh et <i>al.</i> , 2016).
Cellulase et pectinase	-Améliore l'extraction. -Meilleur rendement. -Stabilité des nuages et la texture des jus.	(Bhat, 2000 ; Kashyap et <i>al.</i> , 2001 ; Garg et <i>al.</i> , 2016).
Naringinase et limoninase	-Hydrolyse des composants amers -Améliore les attributs de qualité des jus d'agrumes.	(Hotchkis et Soares, 2000 ; Li et <i>al.</i> , 2012).
Polygalacturonase Pectine estérase	-Maintenir la pectine pour réguler les troubles des jus.	(Kashyap et <i>al.</i> , 2001 ; Yadav et <i>al.</i> , 2001).

1-3-Alimentation animale

Les animaux monogastriques (exemple : la volaille), ne peuvent généralement pas digérer complètement et utiliser les aliments riches en fibres. Les enzymes alimentaires avec leur capacité à dégrader des composés complexes, interviennent dans ce cas pour faciliter la digestion des nutriments chez les animaux (Choct, 2006).

Les enzymes alimentaires disponibles dans le marché sont des phytases, protéases, les alpha-galactosidases, les glucanases, les xylanases, les alpha-amylases et les polygalacturonases (Selle et Ravindran, 2007). La phytase, est l'enzyme la plus utilisée dans les aliments à base de céréales riches en acides phytiques et de complexes métalliques, elle libère une partie du phosphore lié et permet de réduire la quantité de suppléments ajoutés à l'alimentation animale ; comme elle peut également réduire la pollution de l'environnement due au phosphore dans les déchets animaux (Lei et Stahl, 2000).

1-4-Industrie textile

Les enzymes sont vues comme une nouvelle alternative utilisée dans le traitement de textile, principalement dans la finition des tissus et des vêtements, tout en préservant la qualité

du produit et en réduisant la pollution d'eau par les produits et les colorants chimiques toxiques éliminés lors de la fabrication.

Les principales enzymes utilisées dans l'industrie textiles sont les hydrolases et les oxydoréductases (tableau VII).

Tableau VII : Les enzymes microbiennes utilisées dans l'industrie textile (Singh et al., 2016).

Enzyme	Utilisation	M.O
Amylase	-Désencollage.	<i>Bacillus</i> sp. <i>B.licheniformis</i>
Cellulase	-Adoucissement du coton. -Finition de denim.	<i>A.niger</i> <i>P.feniculosum</i>
Catalase	-Finition du blanchiment.	<i>Aspergillus</i> sp.
Laccase	-Blanchiment sans chlore -Teinture des tissus.	<i>B.subtilis</i>
Protéase	-Enlèvement des écailles de fibres de laines. -Dégommage de la soie.	<i>A.niger</i> <i>B.subtilis</i>
Lipase	-Elimination des lubrifiants de taille. -Finition de denim.	<i>Candida antarctica</i>
Collagénase	-Finition de laine.	<i>Clostridium histolyticum</i>
Chitinase	-Récurage du coton. -Modification des fibres synthétiques.	<i>Pseudomonas mendocina</i> <i>Fusarium solani pisi</i> <i>Thermomonospora fusca</i>

1-5-Industrie cosmétique

Afin de répondre aux exigences des consommateurs pour les produits cosmétiques bios, l'industrie cosmétique s'est orientée vers l'exploitation des sources microbiennes, précisément leurs molécules biocatalytiques. L'avantage majeur de l'utilisation d'ingrédients microbiens est leur biocompatibilité ; de plus, ils présentent d'autres avantages comme un processus simplifié, une qualité améliorée et consistante de produits (Gupta et al., 2019) . L'utilisation d'enzymes en cosmétique a suscité un intérêt éminent, un exemple réussi est l'utilisation de la superoxyde-dismutase (SOD) pour capturer les radicaux libres et prévenir les dommages cutanés causés par

la pollution de l'environnement, les bactéries et d'autres facteurs nocifs (Babizhayev, 2006). D'autres enzymes et leur rôle dans le cosmétique sont représentés dans le tableau (VIII).

Tableau VIII : Enzymes microbiennes utilisés en cosmétique (Gupta et *al.*, 2019).

Enzyme	Utilisation
Lactate-déshydrogénase (LDH)	-Permet le fonctionnement normal des cellules exposées au soleil.
Protéase- aspartique alcaline	-Traitement du trouble cutané : xérose (sècheresse de la peau). -Ichtyose (peau squameuse).
Kératinase	-Traitement des vergetures. -Traitement des tissus cicatrisés. -Régénération des cellules épithéliales. -Traitement de peeling enzymatique.

1-6-Industrie des détergents

L'industrie des détergents est la plus grande industrie pour l'utilisation d'enzymes, avec un pourcentage de 25 à 30% du total des enzymes industrielles. Les enzymes sont retrouvées dans presque la moitié des détergents disponibles dans le marché. Seules les protéases, amylases, cellulases et lipases sont couramment utilisées dans l'industrie des détergents (Patel et *al.*, 2017). Les détergents à base de protéases sont produits et fournis par deux grandes compagnies dont :

- Novo Industri A / S produit et fournit trois protéases, alcalase, à partir de *Bacillus licheniformis*, Espérase, d'une souche alcalophile d'un *B. licheniformis*, et Savinase, d'une souche alcalophile de *B. amyloliquefaciens*.
- GistBrocades produit et fournit de la Maxatase, à partir de *B. licheniformis*.

Les amylases, sont le deuxième type d'enzymes retrouvées dans 90% des détergents liquides (Mitidieri et *al.*, 2006). Ces enzymes, sont utilisées pour la lessive et le lavage automatique de la vaisselle. Les lipases comme troisième type d'enzymes, utilisées dans la formulation des détergents, facilitent l'élimination des tâches grasses, telles que les rouges à lèvres, les graisses de friture, le beurre, l'huile de salade, les sauces et les tâches tenaces sur les cols et les poignets. Une préparation de cellulase fongique stable au pH alcalin a été introduite pour une utilisation dans le lavage de tissus en coton (Liu et Kokare, 2017).

1-7-Industrie du papier

L'utilisation d'enzymes en papèterie (tableau IX), réduit le temps de traitement, l'énergie de consommation et la quantité de produits chimiques à traiter (Srivastava et Singh, 2015).

Tableau IX : Enzymes microbiennes utilisées en industrie de papier.

Enzymes	Utilisation	Reference
Xylanase et ligninase	-Augmenter la valeur de pate en éliminant la lignine et l'hémicellulase.	(Maijala et <i>al.</i> , 2008).
Amylase	-Revêtement d'amidon. -Désencrage. -Amélioration de la propreté du papier et l'amélioration du drainage.	(Kuhad et <i>al.</i> , 2011).
Lipase	-Désencrage. -Amélioration du contrôle de la hauteur.	(Kirk et Jeffries, 1996).
Cellulase	-Désencrage. -Amélioration de la douceur et du drainage. -Développement du bioprocédé de recyclage des imprimés du papier.	(Kirk et Jeffries, 1996). (Patrick, 2004).
Laccase	-Blanchiment.	(Fu et <i>al.</i> , 2005).
Mannase	-Dégradation du glucomannase pour améliorer la luminosité du papier.	(Clarke et <i>al.</i> , 2000).

1-8-Industrie de cuir

Les enzymes sont nécessaires pour faciliter la procédure et améliorer la qualité de cuir au cours des différentes étapes de la transformation, comme durcissement, trempage, chaulage, épilation, bating, piching, dégraissage et tannage (Mojsov, 2011). Les enzymes utilisées dans les industries du cuir sont les protéases alcalines, les protéases neutres et les lipases. Les protéases alcalines sont utilisées pour éliminer les protéines non fibreuses pendant le trempage, en bating pour rendre le cuir souple et pliable. Les protéases neutres et alcalines, toutes deux utilisées dans l'épilation pour réduire le gaspillage d'eau en plus de cela des lipases sont utilisées lors du dégraissage pour éliminer les graisses (Rao et *al.*, 1998).

1-9-Production de bioéthanol

Le Brésil et les États-Unis sont les plus grands producteurs mondiaux de bioéthanol. La biomasse lignocellulosique, est la source renouvelable la plus abondante avec une production annuelle estimée de 10 à 50 milliards de tonnes, utilisée comme une alternative pour la production de bioéthanol ; elle est composée de : cellulose (20–50%), hémicellulose (20–35%) et lignine polyphénolique (10–35%) et autres composants en petites quantités.

Le processus biologique de conversion de la lignocellulose en éthanol pour la production de carburant nécessite les étapes suivantes (Gamage et *al.*, 2010) :

- Délignification pour libérer la cellulose et l'hémicellulose ;
- Dépolymérisation de polymères glucidiques pour produire des sucres libres ;
- Fermentation de sucres mixtes d'hexose et de pentose pour produire de l'éthanol.

1-10-Bioremediation

La bioremediation, est une approche respectueuse de l'environnement qui peut être l'alternative appropriée pour traiter et gérer efficacement les eaux usées industrielles complexes hautement toxiques, ainsi que leurs polluants chimiques (tableau X). Par définition la bioremediation, est l'utilisation de microbes et de plantes ou de leurs enzymes pour dégrader et détoxifier les polluants organiques et inorganiques présents dans les eaux usées industrielles (Bharagava et *al.*, 2018; Saxena et Bharagava, 2017 ; Chandra et *al.*, 2015; Singh et *al.*, 2011). Mais actuellement l'utilisation d'enzymes microbiennes dans la bioremediation des polluants environnementaux est un domaine émergent qui nécessite plus de recherche (Saxena et *al.*, 2020). Les classes d'enzymes, les plus représentatives dans l'assainissement des environnements pollués sont les suivants : les hydrolases, les déhalogenase, les transférases et les oxydoréductases (Tableau XI) qui sont produits par les bactéries, les champignons (principalement les champignons de la pourriture blanche), les plantes, les associations microbes-plantes (Rao et *al.*, 2010).

Tableau X : Les polluants majeurs des eaux usées (Pandey et *al.*, 2017).

Polluants	Source responsable
Composés aromatiques (phénols, amines aromatiques).	-Conversion du charbon. -Raffinage du pétrole. -Préservation de bois. -Revêtement métallique. -Teinture, textile, papier.
Produits chlorés, toxiques et mutagènes	-Blanchiment.
Pesticides (herbicides, fongicides, insecticides)	-Protection de culture. -Désintoxication des contenants des pesticides. -Réservoirs de pulvérisation.
Métaux lourds (cadmium, arsénique, cuivre, plomb, chrome)	-Déchets industriels et meuniers. -Boue d'épuration municipale. -Lixiviation de décharges.
Surfactants	-Usine de formulation de shampoing.
Molécules organiques biodégradables	-Industrie laitière. -Abattoir.
Déchets de cuir	-Transformation de cuir.

Tableau XI : Enzymes microbiennes utilisées dans la biorestauration des polluants organiques et inorganiques (Karigar et Rao, 2011 ; Rao et *al.*, 2010)

Enzyme	Application
Chromate réductase	Un groupe d enzyme qui catalysent la réduction des substances toxique et cancérigènes Cr(VI) au Cr(III).
Laccase	Décoloration des colorants et des eaux usées de textile, détoxification des chlorophenols et des phénols.
Manganèse-peroxydase	Dégradation des phénols, lignine, pentachlorophenol et les colorants.
Lignine- peroxydase	Dégradation des composés aromatiques et phénoliques.
Monooxygénase	Déshalogénéation, désulfuration, dénitrification et hydroxylation des composés aromatiques, Biorestauration du pentachlorophenol, phénol, p-nitrophenol, 2, 4,6-trichlorophenol.
Dioxygénase	Dégradation des polluants aromatiques.
Cellulase	Dégradation de la cellulose.

2-Marché mondial des enzymes

Un rapport récent fourni par Research and Markets, sur les enzymes industrielles a révélé que le marché mondial des enzymes industrielles a été estimé à 10,0 milliards USD en 2019 et devrait atteindre 14,7 milliards USD d'ici 2025, enregistrant un CAGR de 6,7%, en termes de valeur. Selon la source (fig.16), le marché des enzymes est subdivisé en segments (micro-organismes, plantes et animaux). Il a été estimé que le segment des microorganismes représenterait la plus grande part du marché des enzymes car ils sont la principale source d'enzymes industrielles en raison de leurs caractéristiques spéciales et d'autres propriétés biochimiques (nature active et stable et leur capacité à dégrader une large gamme de substrats complexes en sources d'énergie plus utiles) (Market Analysis Report, 2020).

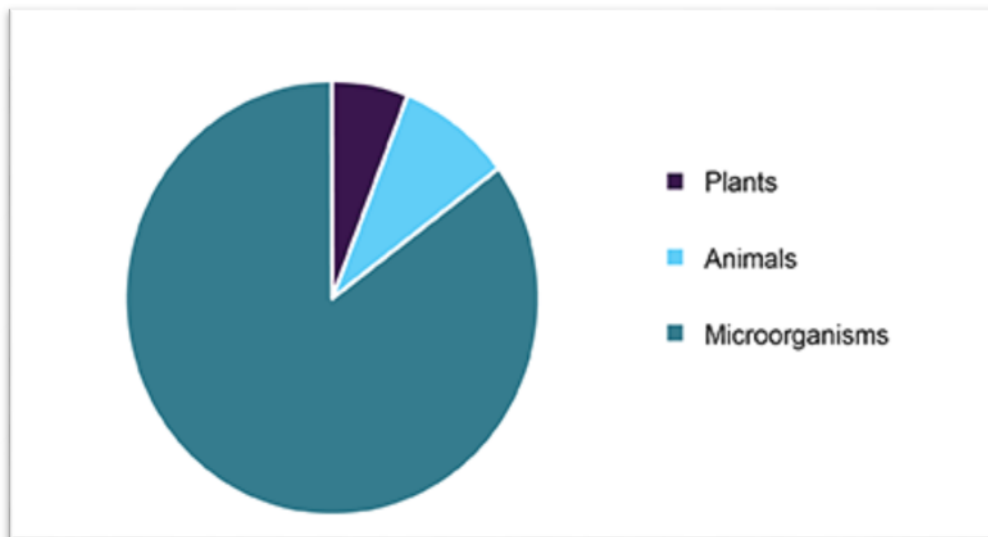


Figure 16 : Diagramme représentant la répartition d'enzymes selon la source (Market Analysis Report, 2020).

Selon BCC Research « une attention particulière est accordée aux pays dont les marchés des enzymes se développent rapidement, notamment le Canada et l'Inde. Les principaux acteurs du marché sont Novozymes, BASF, Associated British Foods (AB Enzymes), Danisco / DuPont (Genencor Industrial Biosciences), Specialty Enzymes and Biotechnology, DSM, Maps Enzymes et Chr. Hansen » (Market Research Report, 2019).

Le marché d'enzymes est repartié par région (fig. 17), Ces régions comprennent l'Amérique du Nord, l'Europe, l'Asie-Pacifique et le reste du monde (Brésil, Argentine, Afrique du Sud ...) (Market Research Report, 2019).

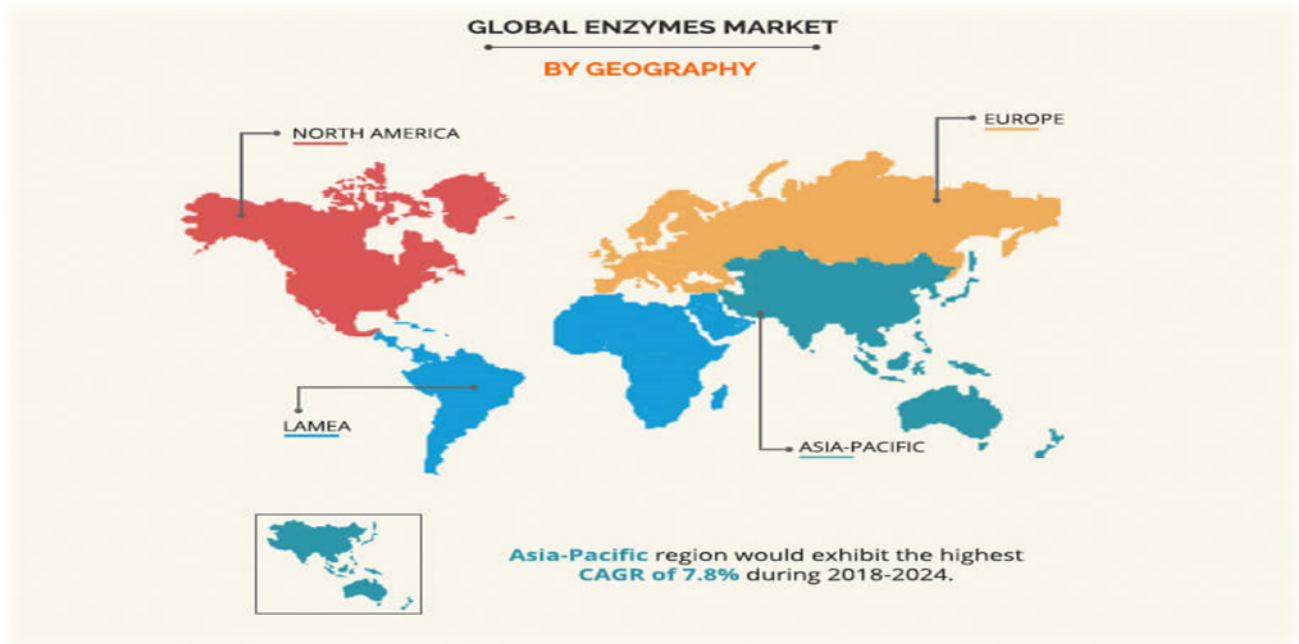


Figure 17 : Répartition par régions du marché d’enzymes (Market Research Report, 2019).

La demande croissante des industries d'utilisation finale telles que les aliments et les boissons, les biocarburants, les aliments pour animaux et le nettoyage domestique devrait stimuler la croissance du marché au cours de la période de prévision (fig.18) (Market Analysis Report, 2020).

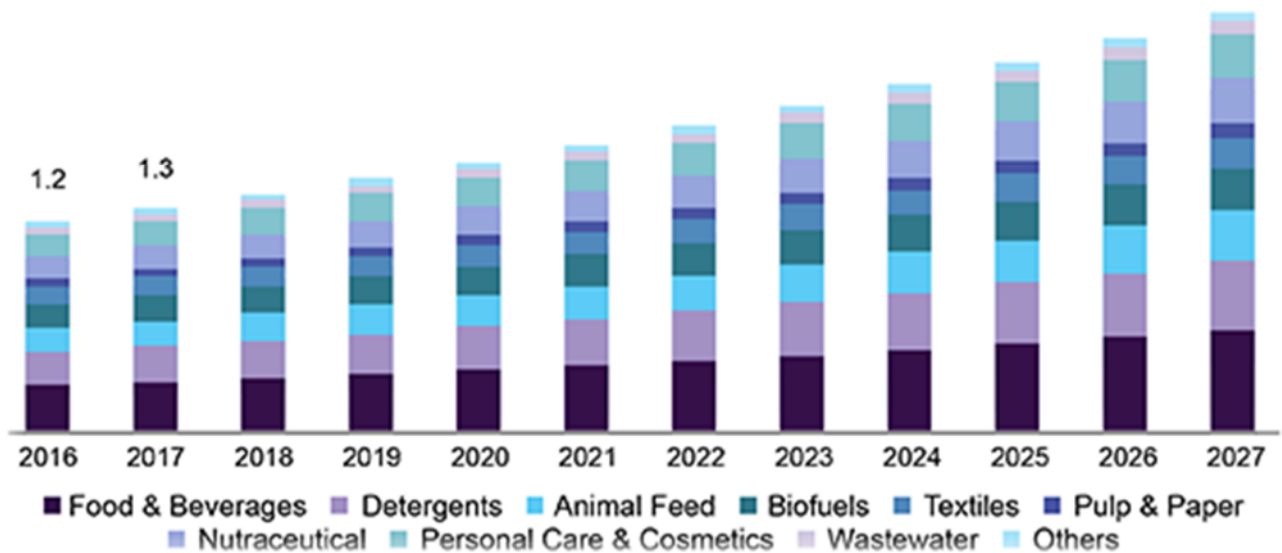


Figure 18 : Histogramme illustrant la demande croissante des industries (Market Analysis Report, 2020).

Conclusion et perspectives

La nature renferme des sources inestimables que l'Homme peut exploiter de façon permanente et sans perturber son écosystème naturel. Parmi les créatures vivantes retrouvées dans cet écosystème, les microorganismes ont suscité un énorme intérêt pour l'avancée technologique tout en gardant le caractère biologique dans les industries. La mise en place d'un processus industriel qui utilise des microorganismes ou leurs enzymes nécessite des années de recherche et d'investissement, pour retrouver le microorganisme ou l'enzyme idéal adapté aux conditions de production à grande échelle avec une productivité maximale. Le développement des techniques de biologie moléculaire et de bioinformatique, ont ouvert un champ libre aux différents secteurs industriels allant de la médecine à l'environnement, en leur permettant de réaliser d'énormes progrès tout en diminuant le temps et le coût de production. Cela est possible, en rendant facile l'isolement, la manipulation génétique et la productivité des microorganismes ainsi que leurs enzymes, par conséquent cela a conduit à l'augmentation de l'utilisation des enzymes en industries et au même temps au développement de l'économie mondiale tout en gardant un environnement sain par la diminution de la pollution.

Comme notre travail est limité à la recherche bibliographique, une suite est envisageable par :

- Isolement et identification de microorganismes susceptibles de produire des enzymes ;
- Etude de l'activité enzymatique par la culture des microorganismes dans des milieux contenant par exemple la caséine, la cellulose.....ect ;
- Optimisation de l'activité enzymatique dans les différentes conditions de température, pH, salinité...ect ;
- Etudier le potentiel des microorganismes à dégradé des composés complexes ;
- Enfin, des méthodes de criblage des microorganismes plus sophistiquées peuvent être employées pour obtenir des résultats plus intéressants.

- Abada E. (2019).** Application of Microbial Enzymes in the Dairy Industry. *Enzymes in Food Biotechnology*, 61-72.
- Abdel Hamid A.M., Solbiati J.O., Cann I.K.O (2013).** Aperçu de la dégradation de la lignine et de ses applications industrielles potentielles. *Advances In Applied Microbiology*, 82.
- Adrio J.L., Demain L.A. (2014).** Microbial enzymes : Tools for biotechnological process. *Biomolecules*, 4 : 117-139.
- Aguilar R., Sato H. (2017).** Microbial proteases : Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food research international*, 103 : 253-262.
- Aldridge S. (2013).** Industry backs biocatalysis for greener manufacturing. *Nature Biotechnology*, 31(2) : 95-96.
- Al-Maqtari Q.A., Al-Ansi W., Ali Mahdi A. (2019).** Microbial enzymes produced by fermentation and their applications in the food industry-A review. *Intrenational Journal of Agriculture Innovation and Research*, 8 : 2319-149.
- Aravind Madhavan., Raveendran Sindhu., Parameswaran Binod., Rajeev K. Sukumaran., Ashok Pandey. (2017).** Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. *Bioresource Technology*, 245 : 1304-1313.
- Arpigny J., Jaeger K.E. (1999).** Bacterial lipolytic enzyme : Classification and propeties. *Biochemistry Journal*, 343, pt1, 177-183. DOI : [10.1042 / 0264-6021: 3430177](https://doi.org/10.1042/0264-6021:3430177).
- Athel Cornish-Bowden., Marc J., Valdur S. (2005).** Cinétique enzymatique, Portland press, London, 66.
- Babizhayev MA. (2006).** Biological activities of the natural imidazol containing peptidomimetics n-acetylcarnosine, carcinine and Lcarnosine in ophthalmic and skin care products. *Life Science*, 78(20) : 2343–2357.
- Baweja M., Nain L., Kawarabayasi Y., Shukla P. (2016).** Current technological improvements in enzymes toward their biotechnological application. *Fronties in microbiology*, 7 : 965.
- Beja O., Aravind L., Koonim E.V., Suzuki M.T., Hadd A., Nguyen L.P., jovanovich S.B., Gates C.M., Feldman R.A., Spudich J.L., Spudich E.N., Delong E.F. (2000).** Bacterial rhodopsin : Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, New york, 289(5486) : 1902-1906.
- Bell P.J.L., Sunna A., Curach N.C., Bergquist P.L., Gibbs.M.D., Nevalainen H. (2002).** Prospecting for noval lipase genes using PCR. *Microbiology*, 148(8) : 2283-2291.
- Bharagava R.N., Saxena G., Mulla S.I., Patel D.K. (2017).** Characterization and Identification of Recalcitrant Organic Pollutants (ROPs) in Tannery Wastewater and Its

Phytotoxicity Evaluation for Environmental Safety. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(2):259-272.

Bhat MK. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5) : 355–383.

Bhat V.S., Swathi R.B., Rosy M., Govindappa M. (2013). Isolation of characterization of glucose oxydase from *Aspergillus flavus* and *Penicillium.sp.* *International Journal Of Current Microbiology And Applied science*, 2(6) : 153-161.

Borel J., Randoux A. (1997). Methode chromatographique. In : Kamoun P.1997. Appareils et méthode en biochimie et biologie moléculaire, Médecine-science Flammarion, Paris, 151-180. ISBN : 2-257-15545-9.

Briand P., Cavard C. (1997) Techniques en biologie moleculaire. In : Kamoun P.1997. Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Médecine science Flammarion, Paris, 314-315, ISBN : 2-257-15545-9.

Chandra R., Saxena G., Kumar V. (2015). Phytoremediation of environmental pollutants: an eco-sustainable green technology to environmental management. In: Chandra R (ed) *Advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste*, 1st edn, CRC Press, Taylor& Francis Group, Boca Raton, 1–30. <https://doi.org/10.1201/b18218-2>.

Choct M. (2006). Enzymes for the feed industry. *World's Poultry science journal*, 62 (1): 5-15.

Clarke J.H., Davidson K., Rixon J.E., Halstead J.R., Fransen M.P., Gilbert H.J., Hazlewood G.P. (2000). A comparison of enzyme aided bleaching of softwood pulp using a combination of xylanase, mannanase and a-galactosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(6) : 661–667.

Cambell G.M., Mougeot E. (1999). Creation and characterisation of aerated food products. *Trends in Food Science And Technology*, 10 :283-296.

Cambria Maria T., Di Morino D., Falconi M., Garavaglia S., Cambia A. (2013). Doching simulation and competitive experiments validate the interaction between the 2,5-xylydine inhibitor and rigidoporus lignosus laccase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 27, ISSU4.

Chakaborty S., Gupta R., Jain K., Hemansi., Gautam S. (2016). Cellulase : Application in wine and brewry industry. *New And Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*.

- Domagała J., Najgebauer-Lejko D., Wieteska-Śliwa I., Sady M., Wszolek M. (2016).** Influence of milk protein cross-linking by transglutaminase on the rennet coagulation time and the gel properties. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 96 (10) : 3500–3507.
- Dominic W. S. Wong. (2008).**Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157:174–209.
- Dumorné K., Cordovo C.D., Astorga-Elo M., Renganathan P. (2017).** Extremoenzymes : A potential source for industrial applications. *Journal Microbiology Biotechnology*, 27(4) : 649-659.
- Dubey M K., Zehra A., Aamir M., Meena M., Ahirwal L., Singh S., Shukla S., Upadhyay RS., Bueno-Mari R., Bajpai VK. (2017).** Improvement Strategies, Cost Effective Production, and Potential Applications of Fungal Glucose Oxidase (GOD): Current Updates. *Frontiers in microbiology*, 8: 1032.
- Elliaiah P., Srinivasulu B., Adinarayana K. (2002).**A review on microbial alkaline protease. *Journal of Scientific And Industrial Research*, 61 : 690-704.
- Eveleigh D.E., Bok J.D., El-Dorry H., El-gogary S., Elliston K., Goyal A., Waldron C., Wright R., Wu Y.M. (1995).** Cellulase lessons revealed through the microbe's perspective. *Applied Biochemistry Biotechnologie*, 51/52 :169-177.
- Farkye N.Y. (1995).** Contribution of milk-clotting enzymes and plasm in to cheese ripening. *Advances in Experimental Medecine Biology*, 367 : 195–207.
- Ferrer M., Bargiela R., Martínez-Martínez M., Mir J., Koch R., Golyshina O.V., Golyshin P.N. (2015).** Biodiversity for biocatalysis : A review of the α/β -hydrolase fold superfamily of esterases-lipases discovered in metagenomes. *Biocatalysis and Biotransformations*, 33(5–6) : 235–249.
- Ferrer M., Beloqui A., Timmis K.N., Golyshin P.N. (2009).** Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1-2) : 109-123.
- Fox P.F. (1998).** Exogenous enzymes in dairy technology. *Journal of Food Biochemistry*, 17 : 173–175.
- Fresht A. (1985).** Enzyme structure and mechanism. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 13, 149-14.
- Fu G.Z., Chan A.W., Minns D.E. (2005).** Preliminary assessment of the environmental benefits of enzyme bleaching for pulp and paper making. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 10 : 136–142.

- Gaillet A.B., Garnier. (2013).** Séparation et purification des produits d'origine biologique. Université de Laval. Faculté des sciences et de génie.18.
- Gamage J., Lam H., Zhang Z. (2010).** Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass, A Review. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 4 : 3–11.
- Garg G., Singh A., Kaur A.,Kaur J., Mahajan R. (2016).** Microbial pectinases : an ecofriendly tool of nature for industries. *Biotechnology*, 6(1) : 47–59.
- Gen lei X., Porres J.M., Edward J.M., Brinch-Pedersen H. (2007).** Chapitre29 : Phytase : Source, structure and applications. J Polainia et A P. Maccok, (eds), *Industrial enzyme*, 505-529.
- Gallardo A., Lamerdain J., Carrano A. (1994).** Chapitre five : Shot gun sequencing. *Automated DNA Sequencing and Analyse*, 37-41.
- Gennaro P.D., Bargna A., Bruno F., Sello G. (2014).** Purification of recombinant catalase-peroxydase HPI from *E.coli* and its application in enzymatic polymerization reaction. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 98(3) : 1119-1126.
- Gilbert J.A., Dupont C.L. (2011).** Microbial metagenomic : Beyond the genome. *Annual review Marine Science*, 3 : 347-371.
- Gomes J., Steiner W. (2004).** The biocatalytic potential of extremophiles and extremoenzymes. *Food technology and biotechnology*, 42(4) : 223-235.
- Gong J.S., Lu Z.M., Li H., Zhou Z.M., Shi J.S., Xu Z.H. (2013).** Metagenomic technology and genome mining : Emerging areas for exploring novel nitrilases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(15) : 6603-6611.
- Green M.L. (1993).** Review of the progress of dairy science : milk coagulants. *Journal Dairy Research*, 44 : 159–188.
- Gupta P., Rajput M., Oza T., Trivedi U., Sanghvi G. (2019).** Eminence of Microbial Products in Cosmetic Industry. *Natural Products and Bioprospecting*, 9(4) : 267–278.
- Gupta R., Beg Q. K., & Lorenz P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: Molecularapproaches and industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 59(1) : 15–52.
- Gupta R., Gupta N., Rathi P. (2004).** Bacterial lipases : An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 64(6) : 763-781.
- Gurung N., Ray S., Bose S., Rai V. (2013).** A broader view : Microbial enzymes and their relevance in industries, Medicine and beyond. *BioMed research international*, 18.

- Hammel K.E., Jensen Jr.K.A., Mozuch M.D., Landucci L.L., Tien M., Pease E.A. (1993).** Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 268 : 12274-12281.
- Handelsman J., Ransom R.M., Brady F.S., Clarly J., Goodman M.R. (1998).** Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes : A new frontier for natural products. *Chemistry And Biology*, 5(10) : R245-9.
- Handelsman J. (2004).** Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology Molecular Biology Review*, 68(4) : 669–685.
- Henrissat H. (1991).** Classification of glycoside hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemistry Journal*, 280 : 309-316.
- Hjort K., Bergstron M., Adesina M.F., Jansson J.K., Smalla K., Sjoling S. (2010).** Chitinase genes revealed and compared in bacterial isolates, DNA extracts and a metagenomic library from a phtopathogen-suppressive soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 72(2) : 197-207
- Hotchkis J.H., Soares N.F. (2000)** The use of active packaging to improve citrus juice quality. International Citrus Congress, Orlando, Florida, 1202–1205
- Jisha V.N., Smitha R.B., Pradeep S., Sreedevi S., Unni K.N., Sajith S., Parakasan P., Moolakkariyil S., Benjamin S. (2013).** Versatility of microbial protease. *Advances in Enzyme Research*, 1(3) : 39-51.
- Johannes T.W., Zhao H. (2006).** Directed evolution of enzyme and biosynthetic pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 9(3): 261-267.
- Juturu V., Wu J.C. (2014).** Microbial cellulases engineering, production and application. *Renewable And Sustainable Energie Reviews*, 33 :188-203.
- Kalme S.D., Parshetti G.K., Jadhav S.U., Govindwan S.P. (2007).** Biodegradation of benzidine based dye direct blue-6-by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM2112. *Bioresource technology*, 98, IS7, 1405-1410.
- Kamoun P., (1997).** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Flammarion Médecine-science, Paris, 36-46.
- Karigar CS., Rao SS. (2011).** Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme Research*, 805187.
- Kårlund A., Moor U., Sandell M., Karjalainen R.O. (2014).** The Impact of Harvesting, Storage and Processing Factors on Health-Promoting Phytochemicals in Berries and Fruits. *Processes*, 2(3) : 596-624.

- Kashyap DR., Vohra PK, Chopra S. (2001).** Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresources Technology*, 77(3) : 215–227.
- Kaul P., Asano Y. (2012).** Strategies for discovery and improvement of enzyme function : State of the art and oppurunities. *Microbiology and Biotechnology*, 5 : 18-33.
- Kazmierczak K.A., Scott K.P., Kelly D., Aminov R.I. (2009).** Tetracycline resistome of the organic pig gut. *Applied Environmental Microbiology*, 75(6) : 1717–1722.
- Kieliszek M., Misiewicz A. (2014).** Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*, 59(3) : 241–250.
- Kirk TK., Jeffries TW. (1996).** Role of microbial enzymes for Pulp and Paper Processing. ACS symposium series: *Journal of the American Chemical Society*, Washington, DC, 2–14.
- Knietsch A., Waschowitz T., Bowien S., Henne A., Daniel R. (2003).** Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. *Journal Molecular Microbiology and Biotechnology*, 5 (1) : 46–56.
- Konsoula Z., M Liakopoulou-Kyriakides. (2007).** Co- production of α - amylase and β - galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, V98, N1, 150-157.
- Kour D., Kusam L.R., kaur T., Singh B., Chauhan S.V.,Kumar S., Rastegari A., Yadav N., Yadav A., Gupta V.K. (2020).** Extremophiles for hydrolytic enzymes production : Biodiversity and potential biotechnological applications, Bioprocessing for biomolecules production, Ed1, 321-372.
- Kriaa M., Kammoun R. (2015).** Producing *Aspergillus tubingensis* CTM507 glucose oxydase by solid state fermentation versus submerged fermentation : Process optimization and enzyme stability by intermediary metabolite in relation with diauxic growth. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 91, IS5, 1540-1550
- Kuhad R.C., Singh A., Erikssan K.E.L. (1997).** Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Advance in Biochemistry Engeneering Biotechnology*, 57 :47-125.
- Kuhad RC., Gupta R., Singh A. (2011).** Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzym Research*. doi:10.4061/2011/ 280696.
- Kumar A., Garg N. (2006).** Enzymology : Enzyme purification. School of biotechnology, Devi Ahilya university, 2.
- Kumar L., Awasthi G., Singh B. (2011).** Extremophiles : A novel source of industrially important enzymes. *Biotechnology*, 10 : 1–15.

- Kumar D., Kumar S.S., Kumar J., Kumar O., Mishra S.V., Kumar R., Malyan S. (2017).** Xylanases and their industrial application-Review. *Biochemical and Cellular Archives*, 17 : 353-360.
- Kuraishi C., Sakamoto J., Yamazaki K., Susa Y., Kuhara C., Soeda T.(1997).** Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal Food Science*, 62(3) : 488–490.
- Law B.A. (2002).** The nature of enzymes and their action in food : Enzyme in food technology. Sheffield academic press, Sheffield, 1-18.
- Leblanc.B. (2013).** Cours de biochimie des proteines. Université de sherbrouke.6. <https://fr.slideshare.net/adjaski21/extraction-et-purification-des-enzymes>.
- Lei X.G., Stahl C.H. (2000).** Nutritional benefits of phytase and dietary determinants of its efficacy. *Journal Applied Animal Research*, 17 : 97–112.
- Li S., Yang X., Yang S., Zhou M., Wang X. (2012).** Technology prospecting on enzymes : application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2 : 1–11.
- Liu J.Z., Huang Y.Y., Liu J., Weng L.P., Ji L.N. (2001).** Effects of metal ions on simultaneous production of glucose oxydase and catalyse by *Aspergillus niger*. *Letterns In Applied Microbiology*, 32, N1, 16-19.
- Liu X., Kokare C. (2017).** Microbial enzymes of use in industry chapter11. *Biotechnology of microbial enzyme*.
- MacElroy R.D. (1974).** Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6 : 74-75.
- Maijala P., Kleen M., Westin C., Poppius-Levlin K., Herranen K., Lehto J., Reponen P., Mäentausta O., Mettälä A., Hatakka A. (2008).** Biomechanical pulping of softwood with enzymes and white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. *Enzyme Microbial Technology*, 43 : 169–177.
- Mane P., Tale V. (2015).** Overview of microbial therapeutic enzymes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 4(4) : 17–26.
- Marco A.Distaso., HaiTran., Ferrer M., Golyshin N.P. (2016).** Metagenomic Mining of Enzyme Diversity. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*.
- Masoud H.M., Darwish D.A., Helmy M.S., Abdel-Monsef M.M. (2017).** Purification and properties of an alanine aminopeptidase from camel liver. *Journal Applied Pharmacology Science*, 7 (5) : 123–128.

- Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. (2007).** Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microbial Technology*, 40 : 1451–1463.
- Mitidieri S., Martinelli A., Schrank A., Vainstein M.H. (2006).** Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresources Technology*, 97 : 1217–1224.
- Mirete S., De figueras C.G., Gonzalez-Pastor J. (2007).** Novel nichel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plant adopted to acid mine drainage. *Applied And Environmental Microbiology*, 73(19) : 6001-6011.
- Moon L.D., Asher R.A., Fawcett J.W. (2003).** Limited growth of severed CNS axons after treatment of adult rat brain with hyaluronidase. *Journal of Neuroscience Research*, 71 : 23–37.
- Moore M.M., Heinbockel M., Dockery P., Ulmer M.H., Arendt E.K. (2006).** Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase. *Cereals Chemistry*, 83 : 28–36.
- Mojsov K. (2011).** Applications of enzymes in the textile industry: A review. In: 2nd international congress: Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry: Jahorina, Bosnia and Herzegovina, Tehnoloski Fakultet Zvornik, 230–239.
- Motta F.L., Andrade C.C., Santana, M.H.A. (2013).** A Review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. In: Chandel A.K., Silvério da Silva S. (Eds.), Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques, Applications and Commercialization, InTech, 284.
- Pai J.S. (2003).** Application of microorganisms in food biotechnology. *Indian Journal Biotechnology*, 2 : 382–386.
- Panchactchram Parthasarathy., Vivekanadan S. (2018).** A comprehensive review on thin film-based nano-biosensor for uric acid determination : Arthritis diagnosis. *World Review of Science, Technology and Sustainable Development*, vol 14, N1.
- Pandey A ., P Nigam., C R. Soccol., V T.Soccol., D singh., R Mohain. (2000).** Advances in microbial amylases. *Biotechnology And Applied Biochemistry*, 31 : 135-152.
- Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (2017).** Current deveppment in solid state fermentation .Springer, USA and Asiatech publishers, INC, New delhi.
- Panesar P., Kaur R., Singla G., Sangwan R.S. (2016).** Bio-processing of agro- industrial wastes for production of food –grade enzymes : Progress and prospects. *Applied Food Biotechnology*, 3(4) : 208-227.

Patel A.K., Singhanian R., Pandey A. (2017). Production, purification and application of microbial enzyme. *Biotechnology of Microbial Enzyme*.

Patrick K. (2004). Enzyme technology improves efficiency, cost, safety of stickies removal program. *Paper Age*, 120:22–25.

Pedrolli D.B., Monteiro A.C., Gomes E., Carmona E.C. (2009). Pectin and pectinases : production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnology Journal*, 3 : 9–18.

Perin G., Favero J.F., Severo D.R.T., Silva A.D., Machado G., Araujo H.L., Lilenbum W., Morshv M., Schetinger M.R., Jordao R.S., Sffoni L., Bottari N., Dasilva A. (2017). Occurrence of oxidative stress in dairy cows seropositives for *Brucella abortus*. *Microbial Pathogenesis*, 110 : 196–201.

Peyman A., Abudukeremu K., Pankaj K.R., Silvio S.D.S. (2020). Lignocellulos as a renewable carbon source for microbial synthesis of different enzyme. *Lignocellulosic biorefining technologies*, 1.

Piccolino M. (2000). Biological machines : From mills to molecules. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 149-152.

Porter L.J., Rukhairu A.R., Ollis L.D. (2016). Directed evolution of enzymes for industrial biocatalysis. *Combining Chemistry and Biology*, 17 : 197-203.

Prabhakar A., Krishnaiah K., Janaum J., Bono A. (2005). An overview of engineering aspects of solid state fermentation. *Malaysian Journal Microbiology*, 1 : 10-16.

Qureshi M.A., Khare A.K., Pervez A. (2015). Enzymes used in dairy industries. *International Journal of Applied Research*, 1 (10) : 523–527.

Randon M.R., Goodman R.M., Handelsman J. (1999). The Earth's Bounty : Assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends Biotechnology*, 17 : 403-409.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatage M.S., Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3) : 597-635.

Rao M.A., Scelza R., Scotti R., Gianfred L. (2010). Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal Of Soil Science And Plant Nutrition*, 10(3) : 333-353.

Rakotoveloa A. (2016). Fragmentation enzymatique de la lignine pour l'obtention de syntones phénolique. Ecole doctorale des sciences chimique : Spécialités polymères, 62

Robinson P. (2015). Enzymes : Principales and biotechnological application. *Essays in Biotechnolgy*, 59 :1-41.

- Rodríguez V., Asenjo J.A., Andrews B.A. (2014).** Design and implementation of a high yield production system for recombinant expression of peptides. *Microbial Cell Factories*, 13 : 1–10.
- Roger A. Sheldon., Sander van Pelt. (2013).** Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemistry Society Review*, 42 : 6223-62.
- Saxena G., Kishor R., Bharagava R.N. (2020).** Application of Microbial Enzymes in Degradation and Detoxification of Organic and Inorganic Pollutants. Eds1, Springer Nature, Singapor, 41-51.
- Schiraldini C., De Rosa M. (2002).** The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends Biotechnology*, 20 : 515–521
- Sconlon M., Zghal M. (2001).** Bread properties and crumb structure. *Food research international*, 34(10) : 841-864.
- Selle P.H., Ravindran V. (2007).** Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 135 : 1–41.
- Seo Y.B., Park J., Huh I.Y., Hong S.K., Chang Y.K. (2016).** Agarose hydrolysis by two-stage enzymatic process and bioethanol production from the hydrolysate. *Process Biochemistry*, 51 :759–764.
- Sanchez., Demain A . (2017).** Useful microbial enzyme- An introduction. *Biotechnology Of Microbial Enzymes*, 1-11.
- Sharma R., Sharma N. (2017).** Microbial lipase mediated by health beneficial modification of cholesterol and flavorsin food products : A review. *Recent Patents on Biotechnology*, 12 (2) : 81-91.
- Sheldon R.A. (2007).** Cross-linking aggregates (CLEAs) : Stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transaction*, 35 :1583-1587.
- Sheldon R.A. (2011).** Cross-linking aggregates as industrial biocatalyst. *Organic Process Research and Development*, 15 : 213-223.
- Shu-Jen C. (2004).** Strain improvement for fermentation and biocatalysis process by genetic engineering technology. *Journal of Industrial Microbiology biotechnology*, 31 : 99-108.
- Singh J.S., Abhilash P.C., Singh H.B., Singh R.P., Singh D.P. (2011).** Genetically engineered bacteria: an emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. *Gene*, 480 : 1–9.
- Singh R., Kumar M., Mittal A., Mehta K.P. (2016).** Microbial enzymes: industrial progress in 21st Century. *Biotechnology*, 6(2), 174.

- Singh R., Singh T., Pandey A. (2019).** Microbial enzyme –An over view. *Advances in Enzyme Technology*.
- Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampoothiri KM., Soccol K., Pandey A. (2006).** α -Amylases from microbial sources-an overview on recent developments. *Food Technology Biotechnology*, 44(2) : 173–184.
- Soares I., Tavora Z., Patera R., Baroni S. (2012).** Microorganism-produced enzymes in the food industry. In: Valdez D.B (ed) Food industry, scientific, health and social aspects of the food industry, 83–94.
- Smith Y., Pharm B. (2019).** Mecanismos d'enzymes. News Medical Life Science.
- Srivastava N., Singh P. (2015).** Degradation of toxic pollutants from pulp & paper mill effluent. *Discovery*, 40(183) : 221–227.
- Steiner K., Schwab H. (2012).** Recent advances in rational approaches for enzyme engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*.
- Suenaga H. (2012).** Target Metagenomics : High-resolution Metagenomic approach for specific gene clusters in complex microbial communities. *Environmental Microbiology*, 14(1) : 13-22.
- Sumantha A., Larroche C., & Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2) : 211–220.
- Svendsen A. (2000).** Lipase protein engineering. *Biochimica Biophysica Acta*, 1543 (2) : 223–228.
- Tapre A.R., Jain R.K. (2014).** Pectinases : Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*, 21 : 447–453.
- Telke A.A., Joshi S.M., Jadhav S.U., Govindwar S.P. (2010).** Decolorization and detoxification of cango red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp.Su-EBT. *Biodegradation*, 21 : 283-296.
- Thurston C.F. (1994).** The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140 :19-26.
- Tien M., Kirt T.K. (1983).** Lignin-degrading enzyme from the hyménomycètes phameochaete chrysosporium burds. *Science*, 211 : 661-663.
- Treichel H., Deoliveira D., Mazutti M., Di luccio M., Oliveira J.V. (2010).** A review on microbial lipase productions. *Food Biopress Technology*, 3 : 182-196.

- Uchiyama T., Abe T., Ikemura T., Watanabe K. (2005).** Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nature Biotechnology*, 23 (1) : 88–93.
- Vaillant F., Millan A., Dornier M., Decloux M., Reynes M. (2001).** Strategy for economical optimization of the clarification of pulpy fruit juices using cross flow microfiltration. *Journal of Food Engineering*, 48(3) : 83–90.
- Van Den Burg B. (2003).** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Option in Microbiology*, 6 : 213-218.
- Van Kampen V., Lessmann H., Merget R. (2013).** Occupational allergies against pepsin, chymosin and microbialrennet. *Pneumologie*, 67 (5) : 260–264.
- Vinod K., Singh D., Sangwan P., Kaur P.G. (2015).** Managment of environmental phosphorus. Pollution using phytases : Current challenges and future pospects, Applied environmental biotechnology : Present scenario and futur trend, chapter7, Publisher springer india, Ed : Garima kaushik, 97-114.
- Volesky B., John H.Luong., Aunstrup K. (1984).** Microbial enzymes : Production, purification, and isolation. *Critical Review in Biotechnology*, 2(2) : 119-146.
- Yadav S., Yadav P., Yadav K.,Yadav D., Singh V. (2001).** Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry Journal*, 44(1): 1–10.
- Yang L., Lüberk M., Stöbech P. (2014).** Deletion of glucose oxydase changes the pattern of organic acid production in *Aspergillus carbonarius*. *AMPexpress*, 54-63.
- Zhang D.X., Du G.C., Chen J. (2010).** Fermentation production of microbial catalase and its application in textile industry. *Chinese Journal Of Biotechnology*, 26(11) :1473–1481.