

**Université De Saida– Dr. Moulay Tahar**  
**Faculté des sciences de la nature et de la vie**  
**Département de Biologie**

## **Thèse**

Présentée pour obtenir le diplôme de

## **Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle**

**Spécialité** : Microbiologie appliquée

**Filière** : Sciences biologiques

Par :

**AGUIS Hayat**

Thème

# **Recherche des enzymes à intérêt technologique chez des actinomycètes isolées à partir des écosystèmes extrêmes de l'Algérie**



Thèse soutenue le 04 /05/2026 devant le jury composé de :

<b>N°</b>	<b>Nom et prénom</b>	<b>Grade</b>	<b>Etablissement</b>	<b>Qualité</b>
01	Ghellai Lotfi	Prof.	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Président
02	Benreguiég Mokhtar	Prof.	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Rapporteur
03	Halla Noureddine	MCA	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Co-rapporteur
04	Chahrour Wassila	MCA	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Examineur
05	Side Larbi Khadidja	MCA	Université de Mascara	Examineur

## **Remerciements**

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à monsieur BENREGUIEG Mokhtar, professeur à l'université de Saida Dr Moulay Tahar, pour son encadrement compétent, son soutien et la pertinence de ses orientations tout au long de cette recherche.

J'exprime également mes sincères remerciements à monsieur HALLA Noureddine, maître de conférences A à l'université de Saida Dr Moulay Tahar, pour son accompagnement scientifique attentif, ses remarques constructives et son précieux soutien dans la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier vivement les membres du jury de thèse pour le temps et l'attention qu'ils ont consacrés à l'évaluation de mon travail :

Monsieur GHELLAI Lotfi professeur à l'université de Saida, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury.

Madame CHAHROUR Wassila, maître de conférences A à l'université de Saida, et madame SIDE LARBI Khadidja, maître de conférences A à l'université de Mascara pour l'honneur qu'elles me font en assistant au jury de soutenance.

Je souhaite également exprimer ma sincère reconnaissance à monsieur TERRAS Mohamed, professeur l'université de Saida, pour ses qualités humaines et sa précieuse contribution à mes travaux de recherche.

J'exprime aussi toute ma considération à monsieur BENABBOU Taha Ahmed, maître de conférences A à l'université de Saida, pour sa gentillesse et l'apport concret qu'il a fourni à la réalisation de ce travail.

Je tiens à adresser mes agréables remerciements à mademoiselle DJALLOULI Zahra et Madame LHRECHE Saadia, ingénieures au laboratoire de génie des procédés, Université de de Saida, pour leur gentillesse, leur encouragement constant et l'accueil chaleureux qu'elles m'ont réservé dans leur laboratoire, ce qui a grandement facilité la réalisation de mes travaux.

Je remercie tout particulièrement Monsieur BENMHAMED Hmed, ingénieur au laboratoire de chimie, université de Saida, pour son humanité et l'aide précieuse qui a considérablement facilité la réalisation de ce travail.

Enfin, je remercie également monsieur BERRAHI Ahmed pour son aide, ainsi que toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

## **Dédicaces**

Dédié à ma famille bien aimée :

Mes chers parents, mes sœurs et mon frère,  
vos encouragements, votre soutien inestimable et votre amour inconditionnel illuminent mon  
parcours académique

## Résumé

Les actinomycètes représentent une source majeure de molécules bioactives d'intérêt biotechnologique, telles que des enzymes. La présente étude a pour objectif l'isolement d'actinomycètes issus de milieux extrêmes, producteurs d'enzymes hydrolytiques d'intérêt biotechnologique.

Un total de 94 souches d'actinomycètes a été isolé à partir de sols arides (Naâma, Aïn Sefra, Béchar) et de sols rhizosphériques associés à *Fraxinus excelsior* et *Casuarina equisetifolia* dans la zone semi-aride de Saïda. Le criblage enzymatique qualitatif sur milieu solide a révélé que 75 isolats ont produit de l'amylase, 71 de la lipase et 43 de la protéase, tandis que 27 ont présenté une coproduction simultanée.

La souche AS12 (*Streptomyces* sp. AS12, GenBank : PP837824) sélectionnée pour le criblage quantitatif de lipase en milieu liquide, a présenté une activité enzymatique de  $70 \pm 2,6$  U/mL, déterminée par dosage titrimétrique. Les conditions de fermentation ont été optimisées par l'approche « une variable à la fois ». Le rendement maximal a été obtenu à 40 °C, pH 7,0, après 48 h d'incubation à 140 tr/min, avec le Tween 80 et l'extrait de levure comme sources de carbone et d'azote. La purification partielle au sulfate d'ammonium a conduit à une activité spécifique de 118,43 U/mg et à un facteur de purification de 1,36. Les paramètres cinétiques ont été déterminés ( $K_m = 6,34$  mM ;  $V_{max} = 0,21$  mM/min).

La lipase partiellement purifiée AS12 a présenté une activité optimale à 40 °C et pH 7, avec une stabilité maintenue dans les plages de pH 6–8 et de température 30–45 °C, ainsi qu'en présence de  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  et d'éthanol. L'enzyme a également conservé une stabilité dans différents détergents commerciaux, démontrant une efficacité notable dans l'élimination des taches de chocolat et soulignant son potentiel comme additif enzymatique dans les détergents.

**Mots clés :** Actinomycètes, enzymes hydrolytiques, amylase, protéase, lipase, détergents.

## **Abstract**

Actinomycetes represent a major source of bioactive molecules of biotechnological interest, such as enzymes. This study aims to isolate actinomycetes from extreme environments that produce hydrolytic enzymes of biotechnological interest.

A total of 94 actinomycete strains were isolated from arid soils (Naama, Ain Sefra, Bechar) and rhizospheric soils associated with *Fraxinus excelsior* and *Casuarina equisetifolia* in the semi-arid region of Saida. Qualitative enzymatic screening on solid media revealed amylase activity in 75 isolates, lipase in 71, and protease in 43, with 27 showing simultaneous coproduction.

Strain AS12 (*Streptomyces sp.* AS12, GenBank: PP837824) selected for quantitative lipase screening in liquid medium, showed an enzymatic activity of  $70 \pm 2,6$  U/mL, determined by titrimetric assay. Fermentation conditions were optimized using the “one-variable-at-a-time” approach. Maximum yield was obtained at 40 °C, pH 7.0, after 48 h of incubation at 140 rpm, with Tween 80 and yeast extract as carbon and nitrogen sources. Partial ammonium sulfate precipitation resulted in a specific activity of 118.43 U/mg and a purification factor of 1.36. Kinetic parameters were determined ( $K_m = 6.34$  mM;  $V_{max} = 0.21$  mM/min).

Partially purified lipase AS12 exhibited optimal activity at 40 °C and pH 7, with stability maintained across pH 6–8 and temperatures of 30–45 °C, as well as in the presence of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , and ethanol. The enzyme also remained stable in various commercial detergents, demonstrating notable efficiency in removing chocolate stains and highlighting its potential as an enzymatic additive in detergent formulations.

**Keywords :** Actinomycetes, hydrolytic enzymes, amylase, protease, lipase, detergent.

## الملخص

تمثل الأكتينومييسيتات (الفطريات الشعاعية) مصدرا رئيسيا للجزيئات النشطة حيويًا ذات الأهمية البيوتكنولوجية، مثل الإنزيمات. تهدف هذه الدراسة إلى عزل الأكتينومييسيتات من البيئات القاسية، المنتجة لإنزيمات محللة مائية ذات أهمية بيوتكنولوجية.

تم عزل مجموعه 94 سلالة من الفطريات الشعاعية من تربة جافة (نعامة، عين الصفراء، بشار) ومن التربة الجذور المرتبطة بالأشجار *Fraxinus excelsior* و *Casuarina equisetifolia* في المنطقة شبه الجافة بسعيدة. أظهر الفحص النوعي للإنزيمات على الوسط الصلب أن 75 سلالة أنتجت الأميليز، و71 سلالة أنتجت الليباز، و43 سلالة أنتجت البروتياز، بينما أظهرت 27 سلالة إنتاجا مشتركا لهذه الإنزيمات.

السلالة (*Streptomyces sp.* AS12, GenBank: PP837824) التي تم اختيارها للفحص الكمي للليباز في الوسط السائل أظهرت نشاطاً إنزيميا قدره  $2,6 \pm 70$  وحدة/مل، تم تحديده بواسطة التحليل العياري (titrimetric assay). وقد تم تحسين ظروف التخمر باستخدام منهج "متغير واحد في كل مرة". وحقق الإنتاج الأقصى عند 40 درجة مئوية، ودرجة حموضة 7.0، بعد 48 ساعة من الحضانه عند 140 دورة/دقيقة، باستخدام توين 80 ومستخلص الخميرة كمصادر للكربون والنيروجين. بعد التنقيه الجزئي باستخدام كبريتات الأمونيوم بلغ نشاط نوعي 118.43 وحدة/ملغ وعامل تنقيه قدره 1.36. وتم تحديد المعلمات الحركية ( $K_m = 6.34$  مليمول؛  $V_{max} = 0.21$  مليمول/دقيقة).

أظهر إنزيم الليباز AS12 المنقى جزئيا نشاطا مثاليا عند 40 درجة مئوية ودرجة حموضة 7، مع الحفاظ على استقراره ضمن نطاق درجة الحموضة 6-8 ودرجات الحرارة 30-45 درجة مئوية، وكذلك في وجود  $Ca^{2+}$  و  $Mg^{2+}$  والإيثانول. كما احتفظ الإنزيم بالاستقرار مع مختلف المنظفات التجارية، مظهرا فعالية ملحوظة في إزالة بقع الشوكولاتة، مما يبرز إمكاناته كمضاف إنزيمي في المستحضرات التنظيف.

**الكلمات المفتاحية:** الأكتينومييسيتات، الإنزيمات التحليلية، الأميليز، البروتياز، الليباز، المنظفات.

## Liste des abréviations

% : pourcentage

DMSO : diméthylsulfoxyde

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

g : gramme

h : heure

L : litre

M : molaire

mg : milligramme

min : minute

mL : millilitre

mM : millimolaire

mm : millimètre

N : normalité

P/V: poids par volume

rpm : rotation par minute

S : seconde

SDS : dodécyl sulfate de sodium

U : unité

UI : unité Internationale

μl : microlitre

## Liste des tableaux

N°	Tableaux	Page
1	Aperçu général des sources microbiennes des $\alpha$ - et $\beta$ -amylases.	27
2	Principaux habitats terrestres d'isolement des actinobactéries (actinomycètes)	39
3	Principaux habitats aquatiques d'isolement des actinobactéries (actinomycètes)	41
4	Applications industrielles des enzymes produites par des souches d'actinomycètes	52
5	Principales enzymes extracellulaires produites par des actinomycètes.	55
6	Criblage enzymatique qualitatif de isolats d'actinomycètes	69
7	Analyses physico-chimiques des échantillons de sols	81
8	Propriétés physiologiques et biochimiques de l'isolat AS12	85
9	Caractéristiques culturales d'isolat AS12 sur différents milieux ISP	87
10	Résumé des étapes de purification partielle de la lipase produite par la souche AS12	111
11	Effets des différents agents sur la stabilité de la lipase AS12	113

## Liste des figures

N°	Figures	Page
1	Présentation de la structure du Repli $\alpha/\beta$ -hydrolase : les flèches rouges indiquent les feuilletts $\beta$ ( $\beta 2$ antiparallèle), les spirales rouges représentent les hélices $\alpha$ connectées à $\beta 3$ – $\beta 8$ , la triade catalytique conservée (Ser-Asp/Glu-His)	09
2	Principales réactions catalysées par les lipases	16
3	Images au microscope électronique à balayage (MEB) de : (a) hyphes ramifiés de <i>Micromonospora schwarzwaldensis</i> , (b) mycélium fragmentant de <i>Nocardia asteroides</i> et (c) hyphes aériens ramifiés de <i>Streptomyces mangrovisoli</i>	44
4	Cycle de développement et sporulation chez les actinobactéries	45
5	Représentation schématique des spores et des chaînes de spores des actinobactéries. (A) sporanges sur le mycélium substratal. (B) production de spores isolées en courtes chaînes. (C) formes générales des spores. (D) morphologie de surface des spores	46
6	Relations phylogénétiques entre les différents ordres du phylum actinobacteria, établies à partir des séquences du gène <b>16S rRNA</b> . L'arbre a été construit à l'aide de l'algorithme RAxML et visualisé avec le programme en ligne interactif Tree of Life. Barre : 0,1 substitution par site nucléotidique	49
7	Localisation des zones échantillonnage	62
8	Production de lipase AS12 par fermentation submergée	70
9	Dosage de l'activité lipasique par titrage des acides gras libérés	71
10	Purification partielle de la lipase par méthode de sulfate d'ammonium	74
11	Test de lavage de tissu souillé au chocolat avec la lipase AS12 partiellement purifiée	77
12	Abondance relative des actinomycètes selon la zone d'échantillonnage, le milieu de culture et le prétraitement	82
13	Morphotypes représentatifs des colonies d'actinomycètes isolées sur les milieux culture.	83
14	Description macroscopique des colonies d'actinomycètes	84
15	Arbre phylogénétique de type Neighbour-joining basé sur des séquences de gènes d'ARNr 16S presque complètes montrant la relation entre la souche AS12_P616S (PP837824) et les espèces du genre <i>Streptomyces</i> . Au niveau	88

	des points de branchement, les valeurs de « bootstrap » sont indiquées en pourcentage sur 1000 réplicats. La barre représente 1 substitution nucléotidique pour 100 nucléotides. <i>Amycolatopsis mediterranei</i> (AJ293754.1) a été utilisée en tant groupe externe. Les numéros d'accès GenBank sont donnés entre parenthèses	
16	Nombre d'isolats d'actinomycètes producteurs d'amylase, de lipase et de protéase détectés lors du criblage primaire	98
17	Zone d'hydrolyse de la souche AS12 sur gélose au Tween 80 (1 %)	99
18	Influence des sources de carbone sur l'activité de la lipase (AS 12)	108
19	Influence des sources d'azote sur l'activité de la lipase (AS 12)	108
20	Influence de température sur l'activité de la lipase (AS 12)	109
21	Influence de pH sur l'activité de la lipase (AS 12)	109
22	Influence de temps d'incubation sur l'activité de la lipase (AS 12)	110
23	Influence de vitesse d'agitation sur l'activité de la lipase (AS 12)	110
24	Effet de la température sur la stabilité de la lipase AS12	112
25	Effet du pH sur la stabilité de la lipase AS12	112
26	Etude cinétique de la lipase de la souche AS 12 en utilisant des émulsions d'huile d'olive comme substrat.	114
27	Stabilité et compatibilité de la lipase AS12 avec les détergents à lessive commerciaux	115
28	Test de lavage de la lipase AS12 sur taches de chocolat. (a) échantillons de tissu non traités (témoin), (b) échantillons traités avec le détergent seul, (c) échantillons traités avec le détergent et la lipase AS12	115

## Table des matières

### **Recherche des enzymes à intérêt technologique chez des Actinomycètes isolées à partir des écosystèmes extrêmes de l'Algérie**

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

الملخص

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Table des matières

**Introduction générale** ..... 01

## **Partie I : Revue bibliographique**

### **Chapitre 1. Les enzymes hydrolytiques**

1.1 Généralité .....	07
1.2 Lipase .....	08
1.2.1 Structure des lipases .....	08
1.2.2 Classification des lipases.....	10
1.2.2.1 Selon les familles .....	10
1.2.2.2 Selon la spécificité et sélectivité .....	12
1.2.2.3 Selon l'origine .....	13
1.2.2.3.1 Lipases microbiennes .....	13
1.2.2.3.2 Lipases végétales.....	14
1.2.2.3.3 Lipases animales .....	15
1.2.3 Mécanismes et types de réactions catalytiques des lipases .....	15
1.2.3.1 Réaction d'hydrolyse .....	16
1.2.3.2 Réactions de synthèse.....	17
1.2.3.2.1 Estérification .....	17
1.2.3.2.2 Transestérifications.....	17
1.2.3.2.3 Autre réactions .....	18
1.2.4 Applications biotechnologiques des lipases .....	18
1.2.4.1 Détergents.....	18
1.2.4.2 Industrie alimentaire.....	19
1.2.4.3 Industrie laitière.....	19

1.2.4.4 Production de biodiesel .....	20
1.2.4.5 Bioremédiation .....	21
1.2.4.6 Industrie cosmétique .....	22
1.2.4.7 Industrie papetière .....	22
1.2.4.8 Huiles et graisses .....	23
1.2.4.9 Industrie médicale et pharmaceutique .....	23
1.2.4.10 l'industrie textile .....	24
1.2.4.11 Biosenseurs .....	25
1.3 Amylase .....	25
1.3.1 Généralités .....	25
1.3.2 Classification .....	25
1.3.3 Source microbienne .....	26
1.3.4 Applications biotechnologiques .....	28
1.3.4.1 Industrie alimentaire .....	28
1.3.4.2 Détergents .....	28
1.3.4.3 Textile .....	29
1.3.4.4 Production d'éthanol .....	29
1.3.4.5 Bioremédiation .....	29
1.3.4.6 Traitement des eaux usées .....	29
1.4 Protéase .....	30
1.4.1 Généralités .....	30
1.4.2 Classification .....	30
1.4.3 Source microbienne .....	31
1.4.4 Applications biotechnologiques .....	32
1.4.4.1 Industrie alimentaire .....	33
1.4.4.2 Détergents .....	33
1.4.4.3 Industrie photographique .....	34
1.4.4.4 Industrie pharmaceutique et médicale .....	34
1.4.4.5 Industrie de cuir .....	35
1.4.4.6 Autres applications .....	35

## **Chapitre 2. Actinomycètes**

2.1 Généralités .....	38
2.2 Ecologie et habitat des actinomycètes .....	38
2.2.1 Milieux terrestres .....	38
2.2.2 Milieux aquatiques .....	41
2.2.3 Milieux aériens .....	43
2.2.4 Milieux extrêmes .....	43
2.3 Aspects morphologiques des actinomycètes .....	44
2.3.1 Mycélium de substrat .....	44
2.3.2 Mycélium aérien .....	45
2.3.3 les spores .....	46
2.4 Classification des actinomycètes .....	47

2.4.1. Taxonomique .....	47
2.4.2 Classique .....	50
2.4.2.1 Critères morphologiques .....	50
2.4.2.2 Critères physiologiques .....	51
2.4.2.3 Critères biochimiques.....	51
2.4.2.4 Critères chimiques .....	51
2.4.3 Moléculaire .....	51
2.5 Applications biotechnologiques des actinomycètes .....	52
2.5.1 Biosynthèse des enzymes lytiques .....	52
2.5.2 Autre applications .....	56

## Partie II : Étude expérimentale

### Chapitre 3. Matériel et méthodes

<b>3.1 Actinomycètes : Habitats naturels, isolement et identification .....</b>	<b>61</b>
3.1.1 Echantillonnage des sols .....	61
3.1.1.1 Localisation et description générale des régions d'étude.....	61
3.1.1.2 Choix des régions d'étude .....	62
3.1.1.3 Profil de de sol et prélèvements .....	62
3.1.1.4 Analyses du sol.....	63
3.1.1.4.1 Mesure de pH .....	63
3.1.1.4.2 Mesure de l'humidité .....	63
3.1.1.4.3 Mesure de la matière organique .....	64
3.1.2 Isolement des actinomycètes .....	64
3.1.2.1 Prétraitement d'échantillons.....	64
3.1.2.1.1 Bicarbonate de calcium .....	64
3.1.2.1.2 Chauffage sec .....	65
3.1.2.2 Méthode de suspensions-dilutions et ensemencement.....	65
3.1.2.3 Purification et conversation des isolats .....	65
3.1.3 Identification .....	65
3.1.3.1 Caractérisation morphologique des isolats.....	66
3.1.3.1.1 Examen macroscopique.....	66
3.1.3.1.2 Examen microscopique .....	66
3.1.3.2 Caractérisation physiologique et biochimique d'isolat AS12 .....	66
3.1.3.2.1 Tests des températures et du pH .....	66
3.1.3.2.2 Test de tolérance au chlorure de sodium (NaCl) .....	66
3.1.3.2.3 Test d'utilisation des sources de carbone glucidiques .....	66
3.1.3.2.4 Caractérisation cultural .....	67
3.1.3.2.5 Production de xylanase.....	67
3.1.3.2.6 Production de cellulase .....	67
3.1.3.2.7 Test du citrate de Simmons .....	67
3.1.3.2.8 Test de catalase .....	68

3.1.3.2.9 Test d'oxydase .....	68
3.1.3.3 Identification moléculaire .....	68
<b>3.2 Actinomycètes : Criblage et sélection d'isolats producteurs d'enzymes.....</b>	<b>69</b>
3.2.1 Criblage qualitatif de la production des enzymes hydrolytiques .....	69
3.2.2 Criblage quantitatif de la production de lipase AS12.....	70
3.2.2.1 Production par fermentation submergée.....	70
3.2.2.2 Mesure de l'activité enzymatique (AE) .....	70
3.2.2.3 Mesure de l'activité spécifique (AS) .....	71
3.2.2.4 Quantification des protéines .....	72
<b>3.3 Lipase AS12 : optimisation, caractérisation biochimique et application .....</b>	<b>72</b>
3.3.1 Optimisation de la production de la lipase AS12 .....	72
3.3.1.1 Influence des sources de carbone et d'azote sur la production de lipase.....	72
3.3.1.2 Influence des conditions de culture sur la production de lipase.....	73
3.3.1.3 Conditions optimales de la production de lipase .....	73
3.3.2 Purification partielle de la lipase .....	73
3.3.3 Caractérisation biochimique de la lipase partiellement purifiée .....	74
3.3.3.1 Stabilité de la lipase à différentes températures .....	74
3.3.3.2 Stabilité de la lipase à différents pH.....	75
3.3.3.3 Stabilité de la lipase en présence de différents agents chimiques .....	75
3.3.3.4 Etude de la cinétique enzymatique .....	75
3.3.4 Application biotechnologique .....	76
3.3.4.1 Test de compatibilité et stabilité de lipase avec des détergents .....	76
3.3.4.2 Test performance de la lipase AS12 sur des taches de chocolat.....	76
3.3.5 Détermination des acides gras libres (FFA) .....	77

## Chapitre 4. Résultats et discussions

<b>4.1 Isolement, diversité des actinomycètes dans les sols arides et rhizosphériques .....</b>	<b>80</b>
4.1.1 Résultats .....	80
4.1.1.1 Paramètres physico-chimiques des échantillons de sol.....	80
4.1.1.2 Isolement et abondance des actinomycètes .....	81
4.1.1.3 Identification .....	82
4.1.1.3.1 Caractérisation morphologique des isolats.....	82
4.1.1.3.2 Caractérisation biochimique et physiologique d'isolat A12 .....	85
4.1.1.3.3 Identification moléculaire de la souche AS12.....	87
4.1.2 Discussion .....	89
4.1.3 Conclusion .....	97
<b>4.2 Criblage enzymatique et sélection des isolats d'actinomycètes.....</b>	<b>97</b>
4.2.1 Résultats .....	98
4.2.1.1 Criblage primaire de la production d'enzymes hydrolytiques .....	98
4.2.1.2 Production de lipase AS 12 par fermentation submergée.....	99
4.2.2 Discussion .....	99
4.2.3 Conclusion.....	106
<b>4.3 Etude de la lipase partiellement purifiée AS12.....</b>	<b>106</b>
4.3.1 Résultats .....	107
4.3.1.1 Optimisation des conditions de production de la lipase.....	107
4.3.1.1.1 Influence des sources de carbone et d'azote .....	107

4.3.1.1.2 Influence de la température .....	108
4.3.1.1.3 Influence du pH .....	109
4.3.1.1.4 Influence du temps d'incubation .....	109
4.3.1.1.5 Influence de la vitesse d'agitation .....	110
4.3.2 Purification partielle de lipase AS12 .....	111
4.3.3 Caractérisation biochimiques de la lipase AS12 partiellement purifiée.....	111
4.3.3.1 Stabilité thermique de la lipase AS12 .....	111
4.3.3.2 Stabilité de la lipase AS12 en fonction du pH.....	112
4.3.3.3 Stabilité enzymatique de la lipase AS12 en présence d'agents chimiques .....	113
4.3.3.4 Étude des paramètres cinétiques de la lipase AS12.....	114
4.3.4 Application biotechnologique de la lipase AS12 partiellement purifiée .....	114
4.3.4.1 Compatibilité de la lipase AS12 avec différents détergents à lessive .....	114
4.3.4.2 Evaluation de la performance de nettoyage de la lipase AS12 .....	115
4.3.2 Discussion .....	116
4.3.3 Conclusion.....	125
Conclusion générale et perspectives .....	130
Références bibliographiques .....	134
Annexe .....	186

# *Introduction générale*

## Introduction générale

L'utilisation des micro-organismes dans les procédés de production et transformation est une pratique ancestrale, reconnue depuis plusieurs siècles, qui s'est progressivement développée sous l'effet des avancées scientifiques et technologiques, ouvrant de nouvelles perspectives.

Aujourd'hui, la biotechnologie industrielle repose essentiellement sur la biocatalyse, qui joue un rôle déterminant dans le développement d'une économie durable (**Mesbah, 2022**).

La biocatalyse enzymatique constitue l'un des domaines les plus étudiés et appliqués en biotechnologie industrielle, offrant des alternatives efficaces et respectueuses de l'environnement aux procédés chimiques conventionnels (**Vivek et al., 2022**). Environ 150 procédés industriels issus de secteurs variés exploitent des enzymes en tant que biocatalyseurs écologiques (**Bilal et Iqbal, 2020**). La majorité des enzymes industrielles sont produites à partir de micro-organismes (**Fasim et al., 2021 ; Mokrani et Nabti, 2024**), dont environ 60 % proviennent de champignons, suivis par les bactéries 24 % et les levures 4 %, tandis que les 10 % restants sont issus de sources végétales et animales (**Fasim et al., 2021**).

Les enzymes microbiennes sont privilégiées en raison de leurs rendements, activité et stabilité élevés, de leur reproductibilité, de la production économique, ainsi que de la croissance rapide des microorganismes, de l'utilisation de milieux peu coûteux, de la facilité d'optimisation et de l'amélioration des souches (**Vashist et al., 2019 ; Fasim et al., 2021 ; Xu et al., 2025**). Par ailleurs, la richesse de la biodiversité constitue également un potentiel exploitable pour la découverte de nouvelles enzymes grâce aux technologies récentes telles que la métagénomique et l'exploration génomique (**Fasim et al., 2021 ; Katsimpouras et Stephanopoulos, 2021**). Il est important de noter que près de 90 % des enzymes commerciales sont modifiées (**Fasim et al., 2021**).

Sur le marché mondial, parmi les 4 000 enzymes microbiennes identifiées, près de 200 types sont utilisés dans diverses industries, dont une vingtaine seulement sont produits à une véritable échelle industrielle (**Bhatt et al., 2022 ; Kocabaş et al., 2022**). Près de 75 % de ces enzymes appartiennent à la classe des hydrolases, responsables de la dégradation de diverses substances naturelles. En particulier, les protéases, les amylases et les lipases représentent le groupe d'enzymes le plus largement commercialisé et exploité à l'échelle industrielle (**Vashist et al., 2019 ; Fasim et al., 2021 ; Kocabaş et al., 2022**).

Les lipases (EC 3.1.1.3) sont des hydrolases à sérine catalysant diverses réactions, notamment l'hydrolyse des triacylglycérols à l'interface lipidique-aqueuse, ainsi que des réactions d'estérification et de transestérification (Verma, 2019 ; Vishnoi et al., 2020 ; Szymczak et al., 2021 ; Xu et al., 2025). Leur polyvalence biochimique, leur large spectre d'activité ainsi que leurs propriétés catalytiques, en particulier leur stabilité thermique, leur tolérance aux variations de pH et leur résistance aux solvants organiques élargissent considérablement leur champ d'application et favorisent leur utilisation dans de nombreux secteurs industriels (Vishnoi et al., 2020 ; Sharma et al., 2025), ces enzymes représentant environ 10 % du marché mondial des enzymes (Lima et al., 2019 ; Nema et al., 2019). Dans l'industrie des détergents, responsable de près de 60 % de la consommation enzymatique mondiale (Mokrani et Nabti, 2024), les lipases constituent environ 32 % des ventes mondiales d'enzymes (Yao et al., 2021 ; Akram et al., 2023). Elles sont principalement utilisées comme additifs écologiques dans les produits de lessive et de nettoyage (Akram et al., 2023 ; Al-Ghanayem, 2024). Selon les estimations, environ mille tonnes de lipases sont incorporées chaque année à près de treize milliards de tonnes de détergents (Yao et al., 2021).

De nombreux microorganismes, tels que les actinomycètes, produisent une large gamme d'enzymes extracellulaires polyvalentes, caractérisées une grande diversité structurale et un large spectre d'applications commerciales (Mokrani et Nabti, 2024). Ces bactéries à Gram positive, largement répandues dans divers environnements, en particulier dans les sols (Hernández-Bolaños et al., 2020 ; Selim et al., 2021 ; Boubekri et al., 2022 ; Ngamcharungchit et al., 2023), se distinguent par une remarquable capacité de biosynthèse d'enzymes hydrolases d'intérêt industriel et commercial (Selim et al., 2021 ; Das et al., 2021 ; Subathra Devi et al., 2022 ; Boubekri et al., 2022). Par ailleurs, ces enzymes jouent un rôle déterminant dans la décomposition de la matière organique complexe et la minéralisation des nutriments, contribuant ainsi au maintien de la fertilité et de la dynamique biogéochimique des sols (Das et al., 2021 ; Boubekri et al., 2022).

En Algérie, un total de 30 nouvelles espèces récemment identifiées appartenant au phylum *actinobacteria* ont été rapportées (Bouras et al., 2021). Par ailleurs, divers environnements (Djinni et al., 2019), tels que le sahara (Chaabane Chaouch et al., 2017 ; Meklat et al., 2020 ; Gacem et al., 2021 ; Boukelloul et al., 2024), les milieux marins (Ouchene et al., 2022 ; Matmoura et al., 2023), les forêts (Guehria et al., 2025), les grottes (Belyagoubi et al., 2018) et le compost (Oumaima et al., 2024) révèlent une diversité notable d'actinomycètes, tant sur le plan taxonomique que biotechnologique. Cette diversité

est également observée dans les sols arides et semi-arides, ainsi que dans la rhizosphère de différentes espèces de plantes et d'arbres (Aouar et al., 2019 ; Leulmi et al., 2019 ; Djemouai et al., 2022 ; Sara et al., 2022 ; Boukelloul et al., 2023). La majorité de ces travaux portent sur les activités antimicrobiennes ; toutefois, certains s'attachent également à l'étude des enzymes (Taibi et al., 2012 ; Habbeche et al., 2013 ; Habbeche et al., 2014 ; Saoudi et al., 2015 ; Gasmi et al., 2019 ; Benhadj et al., 2019 ; Ousaadi et al., 2021 ; Semache et al., 2021 ; Kerouaz et al., 2021 ; Menasria et al., 2022 ; Boughachiche et al., 2024).

La méthodologie classique couramment adoptée pour la production d'enzymes, incluant l'isolement, le criblage et l'identification des micro-organismes producteurs, l'optimisation des paramètres de fermentation, ainsi que la purification et la caractérisation, constitue une partie des étapes mises en œuvre lors de la production industrielle (Singh et Kumar, 2019 ; Niyonzima, 2019). Ces approches restent efficaces et largement utilisées, malgré les avancées scientifiques et technologiques, les exigences croissantes d'innovation et l'évolution du marché mondial des enzymes.

Dans ce contexte, la diversité écologique des écosystèmes algériens représente un réservoir encore peu exploité, offrant un fort potentiel pour l'identification d'enzymes originales à haute valeur biotechnologique. Ainsi, l'exploitation ciblée de ces écosystèmes pourrait permettre l'isolement d'actinomycètes producteurs d'enzymes aux propriétés adaptées aux exigences industrielles et aux besoins émergents du marché et de la recherche. Dans ce cadre, l'objectif de ce travail est d'isoler des souches actinomycètes à partir de sols arides et de la rhizosphère d'arbres, puis d'évaluer leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques (amylase, lipase, protéase), avec un focus particulier sur la production de lipase par la souche *Streptomyces sp.* AS12, incluant l'optimisation conventionnelle, la caractérisation biochimique de la lipase, ainsi que son évaluation en tant qu'additif dans les détergents à lessive.

Le présent travail est organisé comme suit :

Introduction générale, présentant le contexte, la problématique et les objectifs de la thèse, exposant les axes principaux de l'étude.

La première partie du manuscrit est bibliographique et comprend deux chapitres :

**Chapitre 1 :** aborde les enzymes hydrolytiques. Les lipases y sont présentées en termes de généralités, structure, classification, réactions catalysées et applications biotechnologiques, tandis que les amylases et les protéases sont exposées selon leurs généralités, classification, sources et applications.

**Chapitre 2 :** Consacré aux actinomycètes, il décrit leur écologie et habitats, leurs caractéristiques morphologiques, leur classification ainsi que leurs applications, en se concentrant principalement sur les enzymes.

La deuxième partie du manuscrit porte sur l'expérimentation ainsi que la discussion des résultats obtenus, et se structure en deux chapitres :

**Chapitre 3 :** décrit le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail, ainsi que des précisions supplémentaires fournies en annexe.

**Chapitre 4 :** présente les résultats et discussion suivantes :

- L'isolement d'actinomycètes à partir des sols arides et rhizosphériques des arbres.
- Criblage des souches pour la production d'enzymes hydrolytiques (amylase, protéase et lipase).
- L'étude et l'application de la lipase produite par la souche *Streptomyces caelestis* AS12.

Conclusion générale et perspectives, résume les principaux résultats obtenus et propose les perspectives pour les recherches futures.

# **Partie I : Revue bibliographique**

# **Chapitre 1. Les enzymes hydrolytiques**

## Chapitre 1. Les enzymes hydrolytiques

### 1.1 Généralité

Depuis les origines de l'humanité, les enzymes et les réactions qu'elles catalysent ont été utilisées dans la production, la transformation et la conservation des denrées alimentaires et fourragères, bien avant l'apparition du terme « enzyme » (**Jaeger et al., 2024**). L'histoire du terme « enzyme » est complexe : en 1836, le chimiste suédois Berzelius (1779-1848) proposa le terme « catalyse » (du grec *kata*, « entièrement », et *lyein*, « relâcher ») pour désigner les réactions chimiques et biologiques (**Punekar, 2025**). Plus tard, en 1877, Friedrich Wilhelm Kühne introduisit le mot « enzyme » (*ενζυμη*, « dans la levure » en grec), désignant ainsi un catalyseur biologique, qui fut ensuite adopté (**Jaeger et al., 2024 ; Punekar, 2025**). Aujourd'hui, la plupart des enzymes sont nommées avec le suffixe « -ase », conformément à la recommandation de Duclaux en 1898 (**Punekar, 2025**).

Les enzymes, ou biocatalyseurs, sont des protéines synthétisées par les cellules vivantes de divers organismes, incluant les animaux, les végétaux et les micro-organismes (**Kuo et al., 2022**). La biocatalyse, qui repose sur l'utilisation d'enzymes pour accélérer les réactions chimiques, se présente comme une alternative durable et efficace aux procédés chimiques classiques. Grâce à leur spécificité et à leur sélectivité élevée, les enzymes permettent de cibler des substrats précis, de limiter la formation de sous-produits, de réduire le gaspillage de ressources ainsi que la consommation énergétique, tout en simplifier les étapes de purification. Ces caractéristiques confèrent aux procédés enzymatiques un intérêt à la fois écologique et économique majeur (**Farhan et al., 2025**).

Selon la nomenclature de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB), les enzymes sont réparties en sept classes (**Jaeger et al., 2024**) : les oxydoréductases (EC 1), les transférases (EC 2), les hydrolases (EC 3), les lyases (EC 4), les isoméras (EC 5) et les ligases (EC 6) (**McDonald et Tipton, 2023 ; Jaeger et al., 2024**). Parmi elles, les hydrolases, catalysant des réactions hydrolytiques par addition d'une molécule d'eau pour cliver les substrats, constituent la classe la plus diversifiée et la plus représentée (**Shukla et al., 2022 ; Punekar, 2025**). Selon la base BRENDA elles regroupent 1 476 enzymes sur 8 149 enzymes recensées dans toutes les classes EC (**Chang et al., 2021 ; Punekar, 2025**).

Les hydrolases occupent une place importante, près de 75 % des enzymes utilisées industriellement appartiennent à cette classe, notamment les carbohydrases, protéases et lipases, qui représentent plus de 70 % du marché enzymatique (**Shukla et al., 2022**). Leur

diversité fonctionnelle et leur efficacité catalytique justifient l'intérêt scientifique et biotechnologique qu'elles suscitent, tant dans les procédés biologiques que dans les applications industrielles.

## 1.2 Lipase

La première lipase découverte était la lipase pancréatique, identifiée par Claude Bernard en 1848 (**Abdelaziz et al., 2025**), tandis que la lipase bactérienne a été signalée en 1901 chez *prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* et *Bacillus fluorescens* (**Leila et El-Hafid, 2020 ; Ferdeş et al., 2020**). Les premières indications de la production de lipases par des espèces de *Streptomyces* ont été rapportées par **Engelbrecht et Mach (1968)** à partir de *S. rimosus*. Par la suite, plusieurs études ont confirmé cette capacité enzymatique chez diverses espèces, notamment *Streptomyces sp.* M11 (**Pérez et al., 1993**), *S. albus G* (**Cruz et al., 1994**) et *S. cinnamomeus*, pour laquelle une caractérisation génétique et biochimique approfondie d'une nouvelle lipase extracellulaire a été réalisée (**Sommer et al., 1997**). Ce travail a été synthétisé par **Jaeger et Eggert (2002)**, qui ont proposé une classification actualisée des lipases bactériennes, incluant celles du genre *Streptomyces*.

Les lipases sont des hydrolases à sérine ne nécessitant aucun cofacteur. Les véritables lipases bactériennes présentent des poids moléculaires compris entre 29 et 65 kDa (**Akram et al., 2023**), tandis que la masse moléculaire des lipases microbiennes se situe généralement entre 19 et 60 kDa (**Balan et al., 2012 ; Enespa et al., 2023**)

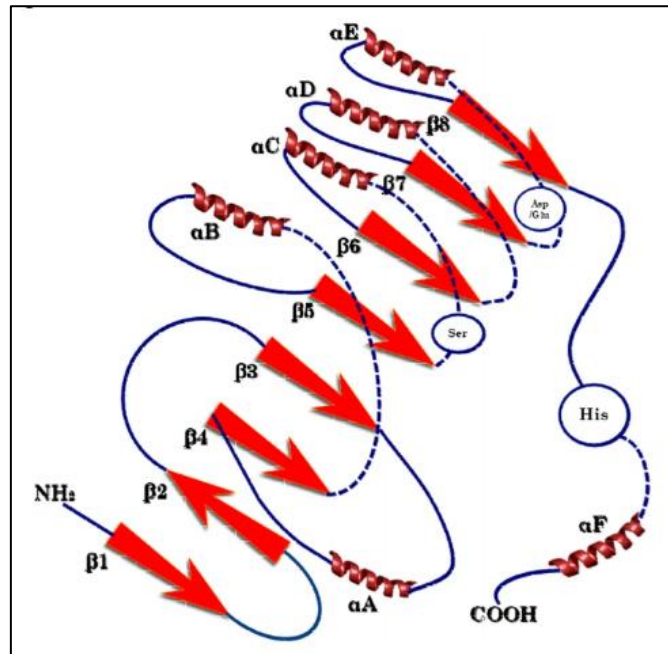
Les lipases se rencontrent chez une grande diversité d'organismes, animaux, végétaux et microbiens. Sur le plan industriel, environ 90 % de la production mondiale de ces enzymes provient de sources microbiennes (**Oyewole et al., 2022**).

La polyvalence fonctionnelle et catalytique des lipases, notamment en termes pH, de température et de solvant, ainsi que leur large spectre de substrats, leur stabilité élevée et leurs propriétés écologique en font des biocatalyseurs de référence dans des domaines tels que l'industrie agroalimentaire, la formulation de détergents, la pharmacologie, la production de biocarburants, la cosmétologie et la recherche biotechnologique (**Rodrigues et al., 2024 ; Sharma et al., 2025, Abdelaziz et al., 2025**).

### 1.2.1 Structure des lipases

Les lipases appartiennent à la famille des  $\alpha/\beta$ -hydrolases, possèdent une architecture similaire avec les protéases, estérases, peroxydases, époxydes-hydrolases et déhalogénases. Les lipases microbiennes présentent une structure tridimensionnelle typique du repli  $\alpha/\beta$ -hydrolase (figure 1), formée d'hélices  $\alpha$  ( $\alpha A$ - $\alpha F$ ) disposées de chaque côté d'une structure

central constitué de huit brins  $\beta$  parallèles ( $\beta$ 1- $\beta$ 8), à l'exception de  $\beta$ 2 antiparallèle. Des variations relevées dans le nombre d'hélices  $\alpha$ , de feuillets  $\beta$  et dans l'architecture des sites de liaison au substrat. Les ponts disulfures participent à la stabilité et l'efficacité catalytique de l'enzyme (Qiu et al., 2021 ; Adetunji et Olaniran, 2021 ; Szymczak et al., 2021 ; Shah et al., 2024).



**Figure 1** : Présentation de la structure du Repli  $\alpha/\beta$ -hydrolase : les flèches rouges indiquent les feuillets  $\beta$  ( $\beta$ 2 antiparallèle), les spirales rouges représentent les hélices  $\alpha$  connectées à  $\beta$ 3- $\beta$ 8, la triade catalytique conservée (Ser-Asp/Glu-His) (Akram et al., 2023).

Les lipases possèdent une compétence catalytique particulière liée à la présence d'une triade catalytique conservée (Ser-Glu (or Asp) -His), analogue à celle des sérine-protéases mais avec une composition distincte : sérine nucléophile, histidine basique et aspartate/glutamate acide. Dans le repli  $\alpha/\beta$ -hydrolase, la sérine catalytique est localisée dans un coude de type  $\gamma$ , après le feuillet  $\beta$ 5 et avant l'hélice  $\alpha$  suivante, constituant un motif structural hautement conservé. L'aspartate/glutamate se situe dans une boucle après le feuillet  $\beta$ 7, tandis que l'histidine apparaît après le feuillet  $\beta$ 8. La majorité des lipases présentent également le motif consensus G-X1-S-X2-G (G = glycine, S = sérine, X1 = histidine, X2 = acide glutamique/aspartique), formant un coude  $\beta$ - $\alpha$  caractéristique dit « coude nucléophile » (Costantini et Califano, 2021 ; Fatima et al., 2021 ; Shah et al., 2024). Toutefois, ce motif pentapeptidique n'est pas conservé chez la lipase B de *Candida antarctica* (CalB), contrairement à la plupart des autres lipases. Par ailleurs, une sous-classe d'estérases/lipases a été identifiée, où le motif G-X1-S-X2-G est remplacé par une séquence GDSL localisée près

de l'extrémité N-terminale de la protéine. Dans les  $\alpha/\beta$ -hydrolases, les principaux éléments structuraux complètent le noyau actif : poche de liaison, couvercle, ponts disulfures et trou oxyanionique. Le couvercle, formé d'hélices  $\alpha$  amphiphiles, régule l'accès du substrat au site actif, tandis que le trou oxyanionique stabilise l'ion oxygène par liaisons hydrogène, renforçant l'efficacité catalytique. Les ponts disulfures, particulièrement dans les lipases riches en cystéines, augmentent la stabilité conformationnelle en réduisant l'entropie protéique. Ensemble, ces éléments favorisent l'optimisation de la fonctionnalité et de l'efficacité des  $\alpha/\beta$ -hydrolases (Shah et al., 2024).

### 1.2.2 Classification des lipases

Les carboxylestérases (EC 3.1.1.X, carboxyl ester hydrolases) constituent un groupe hétérogène d'hydrolases capables de cliver les liaisons esters dans des esters d'acides carboxyliques variés (Ghodke et Punekar, 2022 ; Chai et al., 2025). Parmi ces enzymes, deux sous-groupes majeurs d'enzymes lipolytiques se distinguent en fonction de leur spécificité de substrat et de leur mécanisme catalytique : les estérases (EC 3.1.1.1), actives sur les esters à chaînes courtes (<10 atomes de carbone) solubles dans l'eau, et les véritables lipases (EC 3.1.1.3), spécifiques des triglycérides à longues chaînes insoluble ( $\geq 10$  atomes de carbone) (Ramnath et al., 2017 ; Maester et al., 2020 ; Akram et al., 2023 ; Chai et al., 2025).

Les véritables lipases se distinguent des autres enzymes lipolytiques par l'activation interfaciale et la présence d'un « couvercle » (lid) recouvrant le site actif, qui ne devient accessible aux substrats qu'une fois l'enzyme activée. Elles se caractérisent également par des valeurs de  $K_m$  plus élevées sur des esters solubles et par des différences dans leur composition en acides aminés et la distribution électrostatique de leur surface, bien que ces critères se sont révélés peu fiables pour les classer, certaines exceptions ayant été observées au cours des dernières décennies (Albayati et al., 2020).

#### 1.2.2.1 Selon les familles

La classification des lipases a d'abord été établie comme bactérienne, fondée sur leur topologie protéique, car ces enzymes présentent une diversité marquée de séquences et de propriétés physiologiques (Mahfoudhi et al., 2022).

Sur la base de motifs conservés, de séquences en acides aminés et de caractéristiques physiologiques, Arpigny et Jaeger (1999) ont établi une classification de référence en huit familles (I–VIII) des enzymes lipolytiques. Les véritables lipases appartiennent à la famille I des enzymes lipolytiques, la plus vaste, subdivisée en huit sous-familles (Albayati et al., 2020 ; Rozi et al., 2022 ; Akram et al., 2023).

Cette classification a connu diverses révisions et regroupe actuellement 15 familles dans la base de données ESTHER (Mahfoudhi et al., 2022).

**Famille I :** la plus large et représentée des enzymes lipolytiques ( $\approx 27$  membres, 8 sous-familles I.1–I.8), présente la séquence consensus GX SXG et catalyse principalement des acyles à longue chaîne ( $\geq 10$  C) (Ramesh et al., 2020). La classification originale d'Arpigny et Jaeger a été révisée par Jaeger et Eggert, 2002, qui ont scindé l'ancienne sous-famille I.5 en I.5 et I.6 et intégré les membres de l'ancienne I.6 dans I.7. Les lipases véritables de cette famille proviennent de *Pseudomonas* (Gram négatif) ainsi que de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* et *Propionibacterium* (Gram positif) (Ramesh et al., 2020 ; Jo et al., 2021 ; Akram et al., 2023)

**Famille II :** Les lipases et estérases de cette famille, dits enzymes GD SL/SGNH, possèdent à l'extrémité N-terminale un motif térapeptidique modifié GDS(L) à la place du motif pentapeptidique conservé GX SXG (Pérez et al., 2019 ; Akram et al., 2023). Elles sont nommées hydrolases SGNH car elles comportent quatre blocs structuraux homologues, chacun contenant un acide aminé conservé indispensable à l'activité catalytique (la sérine, la glycine, l'asparagine et l'histidine. Contrairement aux lipases classiques, ces enzymes se caractérisent par l'absence de coude nucléophile et par la flexibilité de leurs sites actifs, leur conférant une large spécificité de substrats. Elles comprennent notamment les lipases de *Streptomyces rimosus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas putida* (Akram et al., 2023).

**Famille III :** ces enzymes possèdent le motif pentapeptidique conservé GX SXG, le repli  $\alpha/\beta$ -hydrolase et la triade catalytique. Elles présentent une activité élevée à basse température ( $< 15$  °C), une masse moléculaire de 32–35 kDa (Akram et al., 2023). Parmi elles figurent des enzymes de *Moraxella* sp., *Streptomyces albus*, *Streptomyces exfoliatus*, *Thermobifida fusca* et *Kineococcus radiotolerans* (Pérez et al., 2019 ; Akram et al., 2023).

**Famille IV :** dite famille lipolytique HSL en raison de son homologie avec les lipases hormono-sensibles des mammifères (Pérez et al., 2019 ; Akram et al., 2023)., elle possède une sérine catalytique située dans le motif conservé GX SXG. Certains membres présentent une structure particulière dite « capuche », composée de deux hélices et distincte du domaine « couvercle » des lipases classiques. Les représentants incluent des enzymes de *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Alicyclobacillus acidocaldarius* et *Ralstonia solanacearum* (Akram et al., 2023).

**Famille V** : ces enzymes lipolytiques, issues de micro-organismes psychrophiles, mésophiles et thermophiles (Pérez et al., 2019 ; Akram et al., 2023), possèdent un PTL commun, le motif conservé GX SXG et le motif HGGG en amont de GDSAG. Parmi les membres figurent les enzymes de *Psychrobacter immobilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia proteamaculans* et *Helicobacter pylori* (Akram et al., 2023).

**Famille VI** : ces enzymes  $\alpha/\beta$ -hydrolases à triade Ser-Asp-His, spécifiques des substrats à chaîne courte (Akram et al., 2023), comprennent de petites estérases de 23–26 kDa (Pérez et al., 2019). Les représentants incluent des enzymes de *Anabaena variabilis*, *Xanthomonas campestris* et *Bordetella avium* (Akram et al., 2023).

**Famille VII** : ces estérases (50–65 kDa) (Pérez et al., 2019), au motif pentapeptidique GX SXG et homologues des acétylcholinestérases et carboxylestérases hépatiques/intestinales, regroupent des enzymes provenant de *Bacillus* sp., *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* et *B. stearothermophilus* (Akram et al., 2023).

**Famille VIII** : ces enzymes (~42 kDa), similaires aux  $\beta$ -lactamases de classe C (Pérez et al., 2019 ; Akram et al., 2023), possèdent un motif consensus GX SXG supplémentaire et le gène *ampC*. Parmi elles figurent les estérases de *Pseudomonas fluorescens*, *Arthrobacter aureus*, *Pseudomonas syringae* et *Pseudomonas gingeri* (Akram et al., 2023).

Parallèlement à de la classification d'Arpigny et Jaeger, une classification récente dans la base données Lipase Engineering Database LED repose sur une version simplifiée des données de séquence et de structure des lipases et protéines  $\alpha/\beta$  hydrolases. Cette classification répartit les enzymes en trois classes selon le motif de l'oxyanion hole : GX, GGGX et Y. Sur la base de l'homologie de séquence des acides aminés, les lipases fongiques ont été divisées en cinq sous-classes : deux dans la classe GX, deux dans la classe GGGX et une dans la classe Y (Mahfoudhi et al., 2022).

### 1.2.2.2 Selon la spécificité et sélectivité

La spécificité des lipases est déterminée par la géométrie et les caractéristiques chimiques de leur site actif et de leurs poches de liaison. Les différences dans la composition en résidus d'acides aminés des poches de liaison expliquent les variations d'affinité et de sélectivité pour les substrats observées entre les lipases (Oliveira et al., 2025)

On distingue plusieurs formes de spécificité (Park et Park, 2022 ; Oliveira et al., 2025) :

- **La spécificité de substrat**, correspond à la sélectivité de l'enzyme vis-à-vis de substrats lipidiques particuliers. Les lipases présentent une spécificité variable, pouvant agir sur une large gamme de triglycérides ou cibler spécifiquement certaines chaînes ou positions d'acides gras sur le squelette glycérol.
- **La régiospécificité**, traduit la spécificité des lipases à catalyser des réactions sur des sites précis d'un substrat. Ainsi, la sélectivité des lipases résulte à la fois de la structure de leur site actif et de la complémentarité spatiale avec leurs substrats. Par exemple, la tendance des nombreuses lipases à hydrolyser préférentiellement les liaisons esters en positions sn-1 et sn-3 plutôt qu'en sn-2 du squelette glycérol.
- **L'énantiospécificité**, liée à la capacité des lipases à différencier les énantiomères (molécules chirales, chacune étant l'image miroir de l'autre) et à catalyser sélectivement la réaction de l'un d'eux, propriété particulièrement valorisée dans la synthèse de composés optiquement purs pour l'industrie pharmaceutique.

### 1.2.2.3 Selon l'origine

Les lipases sont omniprésentes dans la nature et se retrouvent chez l'homme, les animaux, les insectes, les plantes, les champignons ainsi que chez les microorganismes (**Lim et al., 2022**).

#### 1.2.2.3.1 Lipases microbiennes

Les lipases microbiennes, issues de moisissures, levures et bactéries, sont les plus étudiées et commercialisées. Elles présentent de nombreux avantages : abondance, possibilité de modification génétique des micro-organismes producteurs et diversité de caractéristiques et de spécificités. La majorité est extracellulaire et provient de bactéries ou de champignons (**Filho et al., 2019**).

- **Bactéries**

Les genres bactériens les plus utilisés pour les applications des lipases sont *Bacillus*, *Arthrobacter* et *Pseudomonas* (**Darwish et al., 2022 ; Rodrigues dos Santos et al., 2022**). Parmi les *Bacilles* producteurs de lipases, on distingue *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* et *B. alcalophilus* (**Prayogo et al., 2020 ; Darwish et al., 2022**). D'autres bactéries capables de produire des lipases incluent *Pseudomonas* spp., *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* spp., *Chromobacterium*, ainsi que *Serratia marcescens* et *Staphylococcus warneri* (**Oyewole et al., 2022 ; Rodrigues dos Santos et al., 2022**).

- **Moisissures**

Parmi les micro-organismes, les champignons sont l'une des principales sources de lipases. Les genres et espèces les plus représentatifs incluent *Aspergillus* (notamment *A. niger*), *Rhizopus* (comme *R. arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus*, *R. oryzae*), *Mucor*, *Penicillium* (tels que *P. cyclopium*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. crustosum*, *P. roqueforti*, *P. verrucosum*), *Humicola lanuginosa* (Rana et al., 2019 ; Darwish et al., 2022 ; Mahfoudhi et al., 2022), *Lipomyces starkeyi*, *Cunninghamella verticillata*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Stachybotrys*, *Sclerotinia*, *Phyllosticta*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Pestalotiopsis*, *Lasiodiplodia*, *Drechslera*, *Curvularia*, *Chalaropsis*, *Chaetomium*, *Isaria*, *Mycelia sterilia*, et *Xylaria* (Rana et al., 2019). Certains endophytes, comme *Rhizopus oryzae*, *Candida guilliermondii* et *Curvularia brachyspora*, ont été isolés de plantes telles qu'*Adhatoda vasica* (Shankar Naik et al., 2019).

- **Levures**

Parmi les principales espèces productrices de lipases figurent *Candida* (Mehta et Sehgal, 2019 ; Mahfoudhi et al., 2022 ; Darwish et al., 2022) (notamment *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. antarctica*, *C. cylindracea*, *C. parapsilosis*, *C. deformans*, *C. curvata*, *C. valida*, *C. guilliermondii*), *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula pilimornae*, *Pichia* (dont *P. bispora*, *P. mexicana*, *P. silvicola*, *P. xylosa*, *P. burtonii*), *Saccharomycopsis crataegenesis*, *Torulaspora globosa*, *Trichosporon asteroides*, et *Sporidiobolus pararoseus*. Les gènes codant les lipases chez *Candida*, *Geotrichum*, *Trichosporon* et *Y. lipolytica* ont été clonés et surexprimés, ce qui facilite leur production et leur étude biotechnologique (Darwish et al., 2022).

### 1.2.2.3.2 Lipases végétales

Les lipases végétales sont présentes dans différentes parties des plantes, notamment les fruits, les feuilles, les racines et, de manière particulièrement abondante, les graines en raison de leur richesse en triacylglycérols. Parmi ces graines on trouve celles de ricin, tournesol, amande, blé, jatropha, cumin, noisette, avoine, riz, orge, maïs, sorgho, colza, noix de coco et sésame (Oliveira et al., 2025). D'autres exemples incluent les graines de *Jatropha mahafalensis*, *Carica papaya*, arachide (*Arachis hypogaea*) et courge (*Cucurbita* spp.) En outre, les lipases végétales ont été extraites d'une large variété de plantes, incluant céréales, graines, légumes, légumineuses, fruits, ainsi que du latex de certaines espèces telles que *Euphorbia unispina*. Ces enzymes peuvent également être obtenues à partir de déchets alimentaires, particulièrement lors de la transformation des fruits, où l'écorce ou la pulpe

constituent des matrices enzymatiques intéressantes. Certaines espèces végétales ont été identifiées comme particulièrement riches en lipases, notamment *Adansonia* spp., *Moringa* spp., *Jatropha* spp., tournesol et lin. Ces enzymes se localisent principalement dans les tissus ou organes riches en lipides, reflétant leur rôle physiologique dans le métabolisme des graisses et le stockage énergétique des graines lors de la germination (**do Nascimento et al., 2025**).

### 1.2.2.3.3 Lipases animales

Chez les animaux, la majorité des lipases est issue du pancréas, de la paroi intestinale, de l'estomac et du foie de porcs, de bovins et de moutons (**Oliveira et al., 2025**). D'origine humaine proviennent du pancréas et des cellules gastriques. Chez les oiseaux, des cellules adipeuses de poulet. Parmi les poissons, on retrouve *Cyprinion macrostomus*, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, la raie pastenague (*Dasyatis pastinaca*), le foie de bar (*Dicentrarchus labrax*) (**Sarmah et al., 2018**), ainsi que *Totoaba macdonaldi*, *Morone saxatilis* et *Thunnus orientalis*. En outre de *Hexaplex trunculus*, Hépatopancréas de crevette (**Rodrigues dos Santos et al., 2022**). Enfin, le scorpion (**Sarmah et al., 2018**) et *Gryllus bimaculatus* (**Rodrigues dos Santos et al., 2022**).

### 1.2.3 Mécanismes et types de réactions catalytiques des lipases

Les lipases sont des enzymes polyvalentes, capables de catalyser à la fois des réactions d'hydrolyse en milieu aqueux et des réactions de synthèse en milieu non aqueux, et se caractérisent par une spécificité ainsi qu'une sélectivité élevée (**Prayogo et al., 2020** (**Nimkande et Bafana, 2022** ; **Suhaimi et al., 2025**)).

#### 1.2.3.1 Réaction d'hydrolyse (mécanisme classique)

La lipolyse désigne l'hydrolyse enzymatique des triglycérides ou d'autres esters lipidiques, catalysée par les lipases. Cette réaction conduit à la libération d'acides gras libres et de glycérol (ou de l'alcool correspondant dans le cas d'esters simples) (figure 2) (**Sarmah et al., 2018** ; **Pérez et al., 2019**).

Les lipases catalysent l'hydrolyse des triglycérides par un mécanisme complexes en plusieurs étapes, qui requiert des conditions cinétiques et thermodynamiques spécifiques. L'enzyme possède un couvert mobile (« lid ») qui s'ouvre pour permettre l'accès du site actif au substrat lipidique, un phénomène appelé activation interfaciale. Lorsque le substrat, typiquement un triglycéride, se lie au site actif, une liaison ester du glycérol s'aligne avec la

triade catalytique (sérine, histidine, acide aspartique/glutamique) (Oliveira et al., 2025). La sérine du site actif attaque le carbone carbonyle de la liaison ester en tant que nucléophile, formant ainsi un intermédiaire tétraédrique, stabilisé par un oxyanion hole. L'histidine, jouant le rôle de base générale, transfère un proton au groupe alcool sortant, entraînant l'effondrement de l'intermédiaire tétraédrique et la libération d'un acide gras libre. Enfin, une molécule d'eau activée par l'histidine attaque l'acyl-enzyme, générant un second intermédiaire tétraédrique qui se décompose pour libérer le glycérol et régénérer l'enzyme (Oliveira et al., 2025 ; Suhaimi et al., 2025). Comme la réaction lipolytique se produit à l'interface entre les lipides et l'eau, a cinétique de cette réaction peut être décrite par un modèle non michaelien. Ce modèle implique un processus en deux étapes : (1) l'activation de la lipase par un changement conformationnel, et (2) la formation du complexe enzyme-substrat suivie de la réaction d'hydrolyse (Bredai et al., 2021).

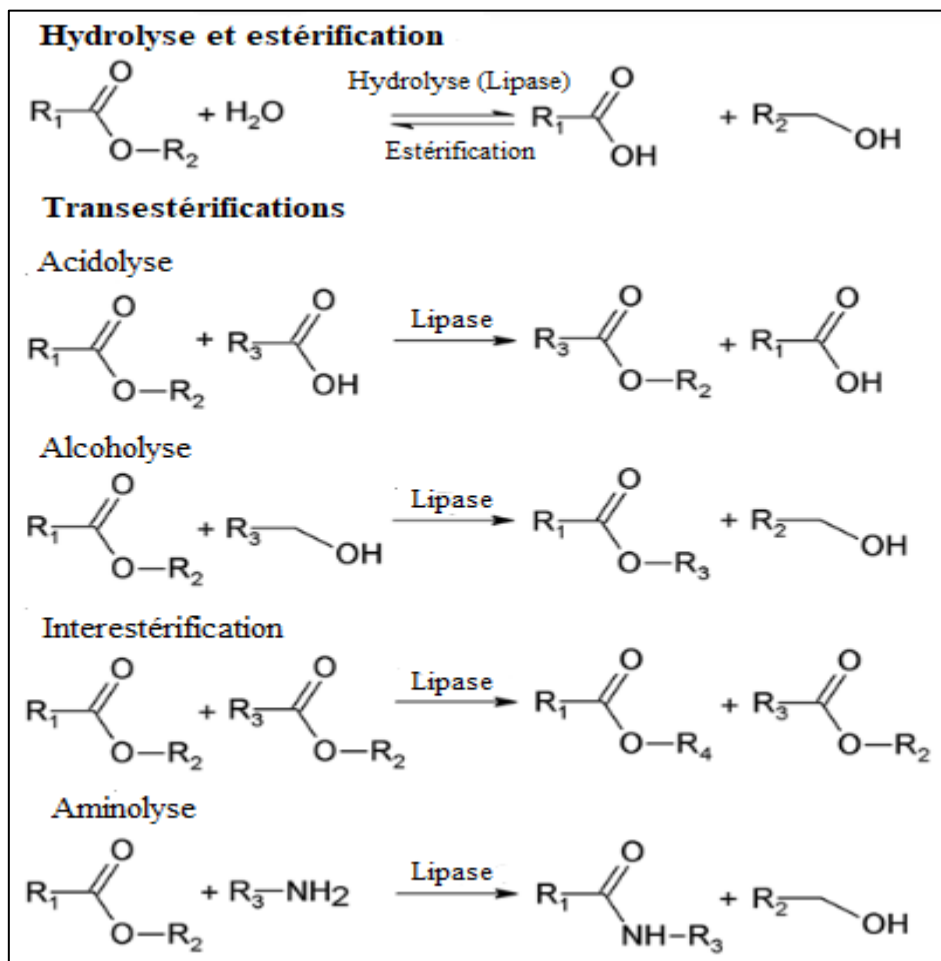


Figure 2 : Principales réactions catalysées par les lipases

### 1.2.3.2 Réactions de synthèse

#### 1.2.3.2.1 Estérification

L'estérification catalysée par les lipases est une réaction de condensation réversible entre un alcool et un acide carboxylique, produisant un ester et de l'eau (figure 2). Cette réaction est particulièrement importante en raison des multiples applications des esters. Elle suscite un intérêt croissant pour la production d'esters organiques, car elle génère uniquement de l'eau comme sous-produit, évite les solvants dangereux utilisés dans les procédés classiques, et permet d'atteindre des conversions élevées grâce à l'élimination in situ de l'eau. Par exemple, la catalyse par lipase est largement utilisée pour la production de biodiesel par estérification d'acide oléique, d'huiles végétales et de microalgues (**Sarmah et al., 2018**).

#### 1.2.3.2.2 Transestérifications

La transestérification constitue une réaction fondamentale de transfert de groupes acyle, impliquant divers substrats et conduisant à la formation d'esters ou d'amides. Selon le substrat initial, la réaction est désignée comme acidolyse lorsque le groupe acyle est transféré entre un ester et un acide carboxylique, alcoololyse dans le cas d'un ester réagissant avec un alcool, ou interestérification entre deux esters, sans formation ni consommation d'eau (figure 2). D'autres transformations synthétiques apparentées comprennent l'aminolyse (synthèse d'amides) et la lactonisation (esterification intramoléculaire) (**Sarmah et al., 2018 ; Pérez et al., 2019 ; Darwish et al., 2022**)

La transestérification catalysée par les lipases constitue une méthode efficace et écologique pour produire du biodiesel, notamment à partir d'huiles usagées issues de l'industrie alimentaire. Elle réduit la consommation d'énergie, facilite la récupération des produits et permet de convertir les monoacylglycérols saturés en esters méthyliques d'acides gras, améliorant ainsi les propriétés du biodiesel (**Sarmah et al., 2018**).

#### 1.2.3.2.3 Autre réactions

Les lipases catalysent également des isomérisations intramoléculaires de triglycérides en mono- et diglycérides spécifiques, des acylations régiosélectives de sucres et de polyols, ainsi que des oxydations stéréospécifiques de lipides.

### 1.2.4 Applications biotechnologiques des lipases

Les lipases constituent des biocatalyseurs majeurs en biotechnologie en raison de leur activité élevée sur de larges plages de température et de pH, de leur spécificité envers différents substrats, ainsi que de leur capacité à catalyser des réactions dans des milieux aqueux et non aqueux. De plus, leur sélectivité chimique, régio- et énantiosélective confère à ces enzymes un intérêt particulier pour des applications industrielles (Verma, 2019).

#### 1.2.4.1 Détergents

L'application des enzymes dans l'industrie des détergents, initiée par le brevet d'Otto Röhm en 1913, a progressivement acquis une importance majeure au cours du XX<sup>e</sup> siècle (Nguyen et al., 2025). En 1988, Novo Nordisk a commercialisé Lipolase®, premier détergent enzymatique contenant des lipases fongiques. Depuis, des améliorations notables ont été obtenues à partir de champignons tels que *Thermomyces lanuginosus* et *Aspergillus oryzae* (Zhu et Hua, 2019 ; Al Ghanayem and Joseph, 2020). Les lipases d'origine bactérienne ont également été intégrées dans des formulations de lessive, notamment Lumafast® et Lipomax® (Genencor International), dérivées respectivement de *Pseudomonas mendocina* et *Pseudomonas glumae* (Zhu et Hua, 2019 ; Nguyen et al., 2025). Les détergents représentent le principal domaine d'application des surfactants synthétiques et des biosurfactants, ceux-ci constituant 15 à 40 % des formulations modernes et en demeurant la composante principale (Nguyen et al., 2025).

L'utilisation de lipase dans les détergents favorise la dégradation des taches grasses (Konwar et Sagar, 2018), principalement constituées d'acyles gras (Darwish et al., 2022), telles que celles issues de graisses alimentaires (friture, huiles de salade, beurre, sauces à base de lipides, soupes), du sébum humain ou encore de certains produits cosmétiques comme le rouge à lèvres (Konwar et Sagar, 2018 ; Darwish et al., 2022). Chaque année, environ 1 000 tonnes de lipases sont incorporées à près de 13 milliards de tonnes de détergents produits dans le monde (Darwish et al., 2022). L'utilisation de ces enzymes contribue à réduire le temps de lavage, à préserver la durabilité des textiles et à diminuer la quantité de tensioactifs requise (Rodrigues dos Santos et al., 2022). À titre exemple, des lipases produites par *Candida*, *Chromobacterium* et *Acinetobacter* ont été exploitées dans des formulations enzymatiques (Zhu et Hua, 2019), tandis que des lipases de *Serratia marcescens* ont démontré leur efficacité pour l'élimination de triacylglycérides d'huile d'olive sur coton (Rodrigues dos Santos et al., 2022).

#### 1.2.4.2 Industrie alimentaire

Dans l'industrie alimentaire, les lipases trouvent de multiples applications, notamment dans la fabrication du beurre de cacao, des jus de fruits et des produits de boulangerie, la fermentation des légumes, l'élimination des graisses de la viande et du poisson, l'affinage de la saveur du riz, la modification du lait de soja et l'amélioration des arômes (**Sarmah et al., 2018**). Elles sont principalement utilisées comme biocatalyseurs pour la synthèse et la modification de lipides, en particulier pour la production d'esters, de triglycérides structurés et de composés aromatiques. Elles contribuent à l'amélioration de la texture, du goût, de la digestibilité et de la stabilité des aliments, tout en offrant des procédés sélectifs et durables (**Ortega-Requena et al., 2024**). Par ailleurs, elles favorisent l'affinement des saveurs, la prolongation de la durée de conservation des produits de boulangerie par la libération d'acides gras à chaîne courte, ainsi qu'à l'optimisation des propriétés rhéologiques, notamment l'homogénéité de la mie des gâteaux en association avec des émulsifiants (**Vyas et Yakubu, 2020**). Elles sont utilisées également pour le dégommeage des huiles végétales, la synthèse de formules infantiles et de produits nutraceutiques, l'enrichissement des huiles végétales en acides gras polyinsaturés, ainsi que pour améliorer la digestibilité des lipides naturels (**Vashist et al., 2019**).

Dans les produits de boulangerie, les lipases sont utilisées pour améliorer le traitement de la pâte, sa tenue, son volume, sa structure et sa souplesse, tout en réduisant son collant et en prolongeant la durée de conservation. Leur action, reposant sur l'hydrolyse des galactolipides et des lipides endogènes de la farine, génère des produits enzymatiques qui expliquent notamment l'augmentation du volume du pain et l'amélioration globale de sa qualité (**Reyes-Reyes et al., 2022**).

#### 1.2.4.3 Industrie laitière

Les lipases sont utilisées pour hydrolyser les graisses du lait, modifier les chaînes d'acides gras et améliorer les arômes des fromages. Elles servent également à accélérer l'affinage des fromages et à favoriser la lipolyse du beurre, de la crème et des graisses. (**Konwar et Sagar, 2018 ; Oyewole et al., 2022**). Elles sont également utilisées pour l'intensification des arômes de la margarine et le beurre (**Oyewole et al., 2022**). L'action des lipases et des estérases, provenant notamment de *Penicillium roqueforti* et du lait, entraîne la formation d'acides gras libres et de méthylcétones responsables des saveurs piquantes caractéristiques du Roquefort, tandis que l'hydrolyse des triglycérides à longue chaîne génère

des arômes plus doux. (Selamoglu, 2020). Ces enzymes participent également au développement des arômes typiques de fromages tels que le cheddar, le provolone et le Romano, principalement par la libération d'acides gras à chaîne courte (Reyes-Reyes et al., 2022).

Par ailleurs, les lipases jouent un rôle positif dans l'affinage du fromage en contribuant au développement de la saveur (principalement par les lipases endogènes et indigènes), de la texture et de la structure du fromage. Les acides gras libres constituent par ailleurs les précurseurs de divers composés aromatiques : esters (notes sucrées, fruitées, florales), lactones (caractère beurré), cétones méthyliques (arômes fruités, floraux, légèrement moisissés) et alcools secondaires (arômes typiques des fromages à pâte molle et bleus). Sur le plan industriel, l'ajout de YieldMAX® (Chr. Hansen), une préparation de lipases produite par fermentation submergée d'*Aspergillus oryzae*, avant le caillage, a permis d'augmenter le rendement de la mozzarella d'environ 2 %, grâce à une meilleure rétention des graisses et des protéines. (Kocabaş et al., 2022).

#### 1.2.4.4 Production de biodiesel

Le biodiesel constitue un carburant renouvelable, alternatif au diesel fossile, et présente l'avantage d'une combustion plus propre (Sharma et al., 2019). Sa production repose notamment sur l'utilisation de lipases, enzymes capables de catalyser les réactions d'estérification et de transestérification nécessaires à la formation des esters alkylés d'acides gras (FAAE) (biodiesel) à partir de graisses et d'huiles (Abdelaziz et al., 2025).

La production de biodiesel par catalyse enzymatique se développe à l'échelle mondiale. Plus de dix entreprises ont adopté cette technologie pour des applications industrielles. Novozymes (Danemark) est le principal fournisseur de lipases, et Viesel Biofuel (États-Unis) applique des lipases liquides dans la production commerciale de biodiesel enzymatique. (Bhan et Singh, 2020).

Parmi les exemples rapportés, l'utilisation de la lipase commerciale Novozyme® 435 a permis de produire du biodiesel à partir d'huile usagée comestible via une régénération catalysée par des enzymes (Sorte et al., 2020), tandis que la production de biodiesel par méthanolyse d'huiles végétales ou de graisses non comestibles a été réalisée grâce à l'emploi de lipases immobilisées ou de cellules productrices (Priji et al., 2016).

### 1.2.4.5 Bioremédiation

Les enzymes hydrolytiques microbiennes, telles que les lipases, estérases, amylases et protéases, présentent un large potentiel pour la gestion des déchets issus de l'industrie alimentaire, la dégradation des plastiques et des insecticides, le traitement des dépôts de biofilm et la dépollution des sols contaminés par des huiles. En particulier, les lipases microbiennes trouvent des applications commerciales complètes dans la biorémédiation des résidus pétroliers, des contaminants issus du pétrole, des effluents industriels et dans la restauration des sols. Les hydrocarbures, principaux contaminants des sols, peuvent être dégradés grâce à des lipases produites par des isolats bactériens provenant de sols pollués par des huiles de moteurs automobiles (**Bhandari et al., 2021**).

Les lipases ont trouvé diverses applications dans les procédés de biorémédiation, notamment pour le traitement des polluants organiques hydrocarbonés (**Theerachat et al., 2017**), la déshydratation des boues (**Kang et al., 2023**) et digestion (**Rashvanlou et al., 2021**) ainsi que la dégradation des graisses, huiles et matières grasses dans les stations d'épuration (**Baena et al., 2022**). Leur utilisation contribue à réduire la charge polluante des eaux usées, tout en diminuant le temps de traitement et les coûts associés (**Vyas & Yakubu, 2020**). L'efficacité de ces enzymes dépend toutefois de plusieurs paramètres, incluant leur nature, la composition des effluents traités, ainsi que les conditions environnementales et physicochimiques telles que la température, le pH, la présence de solvants organiques, de métaux ou de sels (**Nimkande et Bafana, 2022**).

Plusieurs micro-organismes producteurs de lipases, incluant bactéries, champignons et levures, ont été mobilisés seuls ou en consortium pour la biorémédiation des huiles et graisses. Chez les bactéries, les espèces du genre *Pseudomonas*, notamment *P. aeruginosa*, se distinguent par leur efficacité. Du côté fongique, des genres tels que *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mortierella*, *Beauveria* et *Engyodontium* ont été identifiés comme tolérants à divers polluants et prometteurs pour la dépollution des sols. Les lipases d'*Aspergillus niger* et *A. terreus* ont été utilisées respectivement pour dégrader des films d'alcool polyvinylique et pour remédier à des sols pollués, tandis que l'enzyme lipolytique d'*A. niger*, isolée de sols contaminés par des hydrocarbures, a montré une capacité à dégrader des hydrocarbures polyaromatiques présents dans les sols pétrolifères (**Darwish et al., 2022**).

#### 1.2.4.6 Industrie cosmétique

Les lipases occupent une place importante dans l'industrie cosmétique, principalement en tant que biocatalyseurs, avec un rôle avant tout technologique et industriel. Elles contribuent de manière significative à la synthèse d'esters, de molécules aromatiques et d'autres ingrédients actifs qui constituent des composants majeurs des formulations de nombreux produits cosmétiques tels que les savons, lotions, crèmes, shampoings et parfums (Nawal et al., 2019 ; Ali et al., 2023 ; Ortega-Requena et al., 2024). Ces esters sont largement utilisés comme agents de texture, solvants doux, émoullissants, humectants, stabilisateurs et composants de parfums. Ainsi que, les lipases assurent la production d'ingrédients de haute valeur ajoutée employés dans les soins de la peau, les produits capillaires, les lotions et les formulations parfumées (Ortega-Requena et al., 2024). Elles interviennent également dans l'estérification des glycérols pour la production de tensioactifs et de parfums, avec *Rhizomucor miehei* identifié comme un micro-organisme clé producteur de lipases pour ce secteur (Sonali et Arora, 2020).

Sur le plan fonctionnel, les lipases sont intégrées comme ingrédients actifs dans certaines formulations, où elles facilitent le nettoyage cutané, l'élimination des impuretés et des squames, et sont utilisées dans des applications spécifiques telles que les soins anticellulite, les traitements amincissants, les produits capillaires, les masques de beauté ou encore le nettoyage nasal (Ali et al., 2023). Par ailleurs, elles influencent certaines fonctions cutanées, notamment la régulation de la sécrétion sébacée, le contrôle de la kératinisation et l'amélioration de la teinte et de l'apparence de la peau (Nawal et al., 2019). Enfin, afin d'améliorer leur stabilité et de prolonger leur efficacité, elles sont fréquemment encapsulées dans des nanoparticules de silice ou d'autres supports (Ali et al., 2023).

#### 1.2.4.7 Industrie papetière

Dans l'industrie de la pâte et du papier, les lipases sont principalement utilisées pour le désencrage (Liaqat et al., 2025), en particulier dans le traitement du papier recyclé, ainsi que pour la résolution du problème de « pitch ». Leur action repose sur l'hydrolyse des triglycérides, ce qui améliore la blancheur, la stabilité et la qualité du papier, tout en constituant une alternative plus respectueuse de l'environnement par rapport aux procédés chimiques conventionnels (Nawal et al., 2019).

En tant que biocatalyseurs, les lipases permettent d'accélérer le taux de fabrication de la pâte, de réduire l'utilisation de produits chimiques, de limiter la pollution des eaux usées, de

prolonger la durée de vie des équipements, d'économiser l'énergie et le temps, et de diminuer les coûts de production. Certaines souches, telles que *Pseudomonas sp.* KWI-56, se distinguent par leur efficacité dans l'amélioration de la blancheur et la réduction des taches d'encre persistantes. Par ailleurs, des méthodes enzymatiques de traitement du « pitch » exploitent également les lipases afin d'optimiser les procédés à grande échelle (**Liaqat et al., 2025**).

#### 1.2.4.8 Huiles et graisses

Les lipases sont utilisées pour l'enrichissement en acides gras spécifiques, l'hydrolyse des triglycérides et la synthèse de cires (wax esters) à partir d'huiles peu coûteuses. Elles contribuent également à l'augmentation de la teneur en acides gras polyinsaturés oméga-3 dans les huiles de poisson (**Priji et al., 2016**). Ces enzymes jouent un rôle central dans la modification des huiles et graisses, en améliorant à la fois leurs propriétés fonctionnelles et nutritionnelles. Elles catalysent des réactions d'estérification et d'intérêtérification permettant la production de lipides structurés équilibrés en acides gras essentiels (oméga-3 et oméga-6). Par ailleurs, elles favorisent la conversion des huiles végétales en biolubrifiants par transestérification (**Sarmah et al., 2018**). Enfin, à titre d'exemple, des lipases immobilisées issues de *Candida antarctica* (CALB), *Candida cylindracea* AY30 et *Geotrichum candidum* ont été appliquées à l'estérification de phénols fonctionnalisés, conduisant à la synthèse d'antioxydants lipophiles dans l'huile de tournesol (**Darwish et al., 2022**).

#### 1.2.4.9 Industrie médicale et pharmaceutique

La lipase joue un rôle crucial dans l'industrie pharmaceutique et médicale en catalysant la synthèse de composés médicamenteux. *Candida rugosa* est utilisée pour la production de lovastatine, un agent hypocholestérolémiant, tandis que *Serratia marcescens* intervient dans la fabrication du diltiazem hydrochloride via l'hydrolyse asymétrique d'intermédiaires clés. Ces lipases permettent également la synthèse d'alcools, d'amides, d'esters et d'acides carboxyliques énantiopurs, utilisés dans la production de médicaments anti-inflammatoires, anticancéreux, antiviraux, antihypertenseurs, hypocholestérolémiants et anti-Alzheimer (**Sonali et Arora, 2020**).

D'un autre part, les lipases peuvent être utilisées comme aides digestives et comme activateurs des lipases du nécrose tumorale. Elles ont été employées antérieurement comme agents thérapeutiques dans le traitement des troubles gastro-intestinaux, des dyspepsies, et des manifestations cutanées liées aux allergies digestives (**Darwish et al., 2022**). Selon de

nombreuses études, les lipases constituent la classe d'enzymes la plus largement exploitée dans la synthèse d'alcools, d'acides, de lactones et d'esters optiquement actifs (**Vashist et al., 2019**).

#### 1.2.4.10 l'industrie textile

Les lipases agissent comme des biocatalyseurs écologiques dans le désencollage et le bioscouring des fibres, en éliminant lubrifiants, cires et lipides. Ce processus améliore l'absorbance, la teignabilité et la qualité des tissus, tout en réduisant les dommages oxydatifs, l'utilisation de produits chimiques ainsi que la consommation d'eau et d'énergie (**Liaqat et al., 2025**). En effet, les lipases sont utilisées pour éliminer les agents d'encollage, ce qui confère aux tissus une meilleure capacité d'absorption et assure une plus grande régularité de la teinture. Leur action permet également de limiter l'apparition de craquelures et de stries lors des procédés d'abrasion du denim. En outre, combinées aux alpha-amylases, elles sont appliquées à grande échelle pour le désencollage du denim ainsi que d'autres textiles en coton (**Mehta et al., 2021**).

#### 1.2.4.11 Biosenseurs

Les biosenseurs comportent deux éléments principaux aux fonctions distinctes : (i) le transducteur physico-chimique, qui produit un signal physiquement mesurable, et (ii) l'élément biologique (biocapteur), qui identifie spécifiquement l'analyte ciblé. La lipase constitue un exemple de biocapteur. Dans les biosenseurs électrochimiques, la lipase agit comme élément de reconnaissance de l'analyte, utilisant des techniques telles que la chronoamperométrie, la voltamétrie à impulsion et la potentiométrie. Sa capacité à hydrolyser les esters en alcool et en acide organique permet une détection indirecte par variation de pH. Par exemple, la lipase de *Candida rugosa* immobilisée sur une électrode de verre a été utilisée pour l'hydrolyse de la tributyrine. De même, la lipase de *Burkholderia cepacia* a été immobilisée sur des nanoparticules de type zeolitic imidazole framework fonctionnalisées aux amines, intégrées dans du chitosan sur une électrode en carbone vitreux, pour la détection de pesticides contenant le groupe p-nitrophényl, tels que le méthyl-parathion. Les biocapteurs optiques représentent une alternative directe aux biocapteurs électrochimiques. Par exemple, un biosenseur colorimétrique utilisant la lipase de *Psychrobacter* sp. a été employé pour la mesure du paraoxon éthyl, reposant sur une technique d'analyse par caméra pour détecter le pesticide (**Pohanka, 2019**).

Les biosenseurs sont actuellement très utilisés en raison du faible coût, de la rapidité, de l'efficacité, de la sensibilité et de la sélectivité des enzymes pour un analyte donné. Les biosenseurs à base de lipases permettent de détecter des polluants environnementaux tels que les pesticides. Dans l'industrie alimentaire, ils servent à contrôler la qualité des aliments, notamment la teneur en triacylglycérols. En médecine, les capteurs de lipase et phospholipase sont employés comme outils diagnostiques pour mesurer les niveaux de triglycérides, cholestérol et phospholipides dans le sang (**Filho et al., 2019**).

## 1.3 Amylase

### 1.3.1 Généralités

Les enzymes amylolytiques forment une vaste classe d'enzymes appartenant à la famille des glyco-hydrolases (GH) (**Bhatt et al., 2020 ; Saeid et al., 2024**) capables de décomposer divers polysaccharides tels que l'amylose (amidon non ramifié), l'amylopectine (amidon ramifié), le glycogène et d'autres polymères de glucose apparentés (**Saeid et al., 2024**).

Les amylases sont des enzymes hydrolases majeures, appartenant à la famille des glycoside hydrolases 13 (GH-13), catalysent l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques de l'amidon pour former des dextrans et des oligosaccharides. La première amylase (diastase) a été isolée par Anselme Payen en 1833 (**Farooq et al., 2023**). La production industrielle d'amylase a débuté en 1894 à partir de sources fongiques. Par la suite, diverses techniques de fermentation, notamment celles utilisant *Bacillus subtilis* et *B. mesentericus* (1917), ont été développées. Le terme  $\alpha$ -amylase a été introduit en 1925, et la structure tridimensionnelle de l'enzyme a été élucidée dans les années 1990 (**Jujjavarapu et Dhagat, 2019**).

### 1.3.2 Classification

Plusieurs auteurs ont proposé différentes classifications des amylases. Selon **Samanta (2022)**, elles peuvent être regroupées selon trois critères principaux :

- Selon le mode d'action (classification fonctionnelle)
  - Les endo-amylases hydrolysent de manière aléatoire les liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques internes des chaînes de polysaccharides, produisant des oligosaccharides et des dextrans.
  - Les exo-amylases agissent de façon progressive à partir des extrémités non réductrices des chaînes, libérant principalement du maltose, du maltotriose ou du glucose.

- Selon le type de réaction catalysée (classification basée sur le produit formé)
  - $\alpha$ -Amylases (EC 3.2.1.1) : endo-hydrolases coupant les liaisons  $\alpha$ -1,4 internes.
  - $\beta$ -Amylases (EC 3.2.1.2) : exo-hydrolases libérant du maltose à partir des extrémités non réductrices.
  - Glucoamylases (EC 3.2.1.3) : exo-hydrolases capables d'hydrolyser les liaisons  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 pour libérer du glucose.
  - Enzymes débranchantes (pullulanase, isoamylase) : hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,6 présentes dans l'amylopectine ou le glycogène.
  - Cyclodextrine-glycosyltransférases (CGTases) : catalysent des réactions de transglycosylation conduisant à la formation de cyclodextrines.
- Selon l'homologie de séquence et la structure tridimensionnelle (classification CAZy / familles GH)
  - Les amylases appartiennent à plusieurs familles de glycoside hydrolases (GH) répertoriées dans la base de données CAZy (Carbohydrate-Active enZymes).
  - Les principales familles associées à l'activité amylolytique sont :
    - GH13 :  $\alpha$ -amylases, pullulanases, CGTases, maltogénases (famille la plus diversifiée).
    - GH14 :  $\beta$ -amylases.
    - GH15 : glucoamylases.
    - GH31 :  $\alpha$ -glucosidases.
    - GH57, GH119 et GH126 :  $\alpha$ -amylases thermostables, souvent d'origine archéenne.

### 1.3.3 Source microbienne

Divers micro-organismes, appartenant à des genres bactériens et fongiques, ont été identifiés comme sources efficaces d'amylases, principalement de type  $\alpha$ -amylase. Le tableau 1 suivant présente les principales espèces productrices.

**Tableau 1** : Aperçu général des sources microbiennes des  $\alpha$ - et  $\beta$ -amylases.

Source	Type d'amylase	Genre /Espèce	Références
Bactéries	$\alpha$ amylase	<i>Bacillus Geobacillus</i> sp., <i>Nesterenkonia</i> sp. <i>Pseudoalteromonas</i> sp. M175, <i>Nocardiopsis aegyptia</i> , <i>Streptomyces fragilis</i> ,	(Far et al., 2020)
		<i>Bacillus</i> spp. ( <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. mesentericus</i> , <i>B. coagulans</i> )  <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Geobacillus thermoleovorans</i> ,	(Farooq et al., 2023)
		<i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , and <i>B. amyloliquefacien</i>	(Putri et Nakagawa, 2020)
		<i>Streptomyces rimosus</i>	(Farooq et al., 2023)
	$\beta$ -amylase	<i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>Clostridium thermosulfurogenes</i> , <i>Thermoactinomyces</i> sp.	(Das et Kayastha, 2019)
Champignons	$\alpha$ amylase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> et <i>Aspergillus flavus</i>	(Far et al., 2020)
		<i>Aspergillus</i> ( <i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> , and <i>A. flavus</i> ), <i>Mucor</i> sp. <i>Penicillium</i> ( <i>P. brunneum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. camemberti</i> , <i>P. olsonii</i> ), <i>Thermomyces lanuginosus</i>	(Putri et Nakagawa, 2020 ; Farooq et al., 2023)

### 1.3.4 Applications biotechnologiques

Les amylases d'origine microbienne suscitent un intérêt particulier en raison de leur résistance à un large éventail de conditions environnementales, notamment la salinité, la température, le pH et divers types de stress (Tatta *et al.*, 2022).

#### 1.3.4.1 Industrie alimentaire

L' $\alpha$ -amylase modifie divers amidons utilisés en agroalimentaire. Elle produit des sirops de maïs à haute teneur en fructose en hydrolysant l'amidon de maïs, stabilise et augmente la viscosité des crèmes glacées à l'amidon de taro ou de maïs, et améliore la texture, le volume et la conservation du pain en retardant le rassissement. Elle réduit la rétrogradation de l'amidon, améliore la stabilité au stockage à froid et agit comme agent anti-rassissement, tout en convertissant l'amidon en dextrans fermentescibles qui favorisent la fermentation, le volume et la texture du pain. Les  $\alpha$ -amylases thermostables et mésophiles optimisent la cuisson et la texture des nouilles de blé, la MS- $\alpha$ A à 1,6 % étant la plus efficace. L'association  $\beta$ -amylase/transglucosidase appliquée à l'amidon de pois accroît la digestibilité et réduit la rétrogradation, produisant des pains plus légers et volumineux (Saeid *et al.*, 2024).

Les  $\beta$ -amylases sont largement utilisées dans l'industrie pour la production de sirops de maltose, dont la couleur est stable et l'absorption d'humidité élevée par rapport aux sirops de glucose. Elles sont également employées dans la confiserie et les desserts glacés en raison de leur faible cristallisation et adhérence. En outre, leur action enzymatique retient l'humidité dans les aliments à base d'amidon, contribuant à la tendreté et à l'inhibition de la rétrogradation, comme dans les gâteaux de riz. Dans la panification, la  $\beta$ -amylase issue de la farine de blé limite efficacement la rétrogradation, tandis que celle d'orge est moins utilisée en raison de sa thermostabilité limitée (Das et Kayastha, 2023).

#### 1.3.4.2 Détergents

Les amylases constituent le deuxième type d'enzymes utilisées dans les détergents enzymatiques et représentent 90 % de l'ensemble des détergents liquides. Elles sont employées pour dégrader les résidus d'amidon en dextrans et oligosaccharides plus petits, améliorant ainsi l'élimination des taches difficiles et contribuant à l'efficacité des détergents à lessive (Far *et al.*, 2020 ; Farooq *et al.*, 2023 ; Ali *et al.*, 2025). Par exemple, les détergents pour lave-vaisselle contiennent souvent des amylases et des lipases en proportions variables afin d'éliminer les résidus d'amidon et de graisses (Vashist *et al.*, 2019).

### 1.3.4.3 Textile

Dans l'industrie textile, les enzymes sont actuellement utilisées dans plusieurs procédés spécifiques. Elles interviennent notamment dans le biopolissage et le bioscouring des tissus, dans l'anti-feutrage de la laine, ainsi que dans l'assouplissement et le décapage du coton. Elles sont également appliquées pour la finition des articles en denim et en laine et pour la modification des fibres synthétiques, domaines où l'accent est mis sur l'utilisation des hydrolases, telles que l'amylase, la cellulase, la protéase, la pectinase et lipase/esterase (**Vashist et al., 2019**).

L'amylase représente environ 30 % de la production enzymatique et est utilisée pour la conversion de l'amidon en sirops de sucre et la production de cyclodextrines pour l'industrie pharmaceutique. L'hydrolyse enzymatique offre des avantages par rapport à l'hydrolyse acide, tels que la spécificité, la stabilité des produits, une consommation énergétique réduite et l'élimination des étapes de neutralisation (**Salwan et Sharma, 2018**). Plus spécifiquement, l' $\alpha$ -amylase permet d'éliminer sélectivement l'amidon appliqué comme couche protectrice sur les fils, sans provoquer de dommages aux fibres (**Far et al., 2020**).

### 1.3.4.4 Production d'éthanol

L'éthanol est produit à partir de l'amidon, qui est d'abord solubilisé puis hydrolysé par l' $\alpha$ -amylase lors de la liquéfaction. Cette enzyme convertit l'amidon en sucres fermentescibles, ensuite transformés en éthanol par fermentation (**Paul et al., 2021 ; Far et al., 2020 ; Farooq et al., 2023**).

### 1.3.4.5 Bioremédiation

L' $\alpha$ -amylase trouve une application potentielle en bioremédiation, notamment pour la dégradation des n-alcanes et du polyéthylène basse densité. Chez *Bacillus subtilis* TB1, elle peut dénaturer les n-alcanes C10–C14, et la présence d'amidon favorise la croissance bactérienne et la production enzymatique, facilitant ainsi la dégradation des polluants (**Paul et al., 2021 ; Ali et al., 2025**).

### 1.3.4.6 Traitement des eaux usées

L' $\alpha$ -amylase, provenant de sources bactériennes et fongiques, est utilisée pour traiter les eaux usées riches en matière organique issues de secteurs tels que les industries pharmaceutiques, alimentaires et textiles. Elle hydrolyse l'amidon présent dans ces effluents, notamment celui provenant des déchets de cuisine et des fabricants d'amidon de sagou,

réduisant ainsi la charge organique (Paul *et al.*, 2021 ; Ali *et al.*, 2025). Cette dégradation améliore la concentration en oxygène dissous, essentielle à la survie des organismes aquatiques et à la préservation de l'écosystème (Ali *et al.*, 2025).

## 1.4 Protéase

### 1.4.1 Généralités

Les protéases, incluant les protéinases, peptidases et amidases (Naveed *et al.*, 2021 ; Ashraf *et al.*, 2023), constituent un groupe complexe d'enzymes responsables de l'hydrolyse des protéines (Matkawala *et al.*, 2021). Leur masse moléculaire varie généralement entre 18 et 90 kDa (Ojo-Omoniyi *et al.*, 2024).

Les protéases représentent une catégorie majeure d'enzymes industrielles, occupant environ 60 % du marché mondial des enzymes (Naveed *et al.*, 2021 ; Matkawala *et al.*, 2021 ; Ojo-Omoniyi *et al.*, 2024) et correspondant à près de 40 % des ventes globales. En raison du large spectre d'application, le génie des protéines cherche à améliorer leurs performances catalytiques et leur stabilité thermique. Dans cette optique, l'immobilisation des protéases constitue une stratégie efficace et économiquement avantageuse pour leur utilisation en biocatalyse industrielle (Ashraf *et al.*, 2023).

### 1.4.2 Classification

Le Comité de Nomenclature de l'IUBMB indique que les protéases peuvent être classées dans le sous-groupe 4 du groupe 3 (hydrolases). Cette classification repose sur plusieurs critères, tels que le type de réaction catalysée, les caractéristiques chimiques du site actif, ainsi que l'évolution de la structure des protéases et leurs relations. L'organisation des protéases en fonction de leur spécificité ou de leur mécanisme catalytique a également été abordée par Agarwal. Les protéases (E.C. 3.4) qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques se divisent en exopeptidases (E.C. 3.4.11-3.4.19) et endopeptidases (E.C. 3.4.21-3.4.24, 3.4.99), selon le type de réaction qu'elles réalisent (Gurumallesh *et al.*, 2019 ; Matkawala *et al.*, 2021, Gimenes *et al.*, 2021).

#### ➤ Exopeptidases

Les exopeptidases exercent leur activité enzymatique en hydrolysant spécifiquement les terminaux azoté ou carboné de chaînes polypeptidiques. Elles sont classées selon plusieurs critères, tels que la taille du fragment libéré, l'identité du fragment, le type de terminal et la restriction de la longueur de la chaîne peptidique. Ces enzymes se présentent sous deux

formes principales : l'aminopeptidase et la carboxypeptidase (**Gurumallesh et al., 2019 ; Gimenes et al., 2021**).

Les aminopeptidases agissent sur le terminal libre N de la protéine, permettant la libération d'un résidu d'acide aminé, d'un dipeptide ou d'un tripeptide (**Gurumallesh et al., 2019 ; Gimenes et al., 2021**).

Les carboxypeptidases, de leur côté, agissent principalement sur les terminaux C des chaînes protéiques. Selon le type d'acide aminé résiduel à leur site actif, elles se divisent en trois catégories : carboxypeptidases sérines, cystéines et métalliques (**Gurumallesh et al., 2019 ; Gimenes et al., 2021**).

### ➤ Endopeptidases

Les endopeptidases sont responsables du clivage des acides aminés non terminaux dans la chaîne peptidique. Leur classification se base sur la nature chimique du groupe chargé de leur activité catalytique. On distingue six classes principales de protéases : (i) les protéases à cystéine (EC 3.4.22), (ii) les protéases à sérine (EC 3.4.21), (iii) les protéases à thréonine (EC 3.4.25), (iv) les protéases à acide glutamique, (v) les protéases à acide aspartique (EC 3.4.23) et (vi) les métalloprotéases (EC 3.4.24) (**Gurumallesh et al., 2019 ; Gimenes et al., 2021 ; Kieliszek et al., 2021 ; Ashraf et al., 2023**).

### 1.4.3 Source microbienne

Les micro-organismes constituent une excellente source de protéases et représentent les principaux producteurs de ces enzymes (**Sandhya et al., 2020**). Les protéases d'origine microbienne comptent pour environ 40 % des ventes mondiales totales d'enzymes (**Naveed et al., 2021 ; Gimenes et al., 2021**).

#### • Origine bactérienne

Diverses bactéries ont été identifiées comme producteurs efficaces de protéases. Parmi eux figurent plusieurs espèces du genre *Streptomyces* telles que *Streptomyces sp.* CN902, *Streptomyces fungicidicus* MML1614, *Actinomycete* MA1-1 (**Banerjee et Ray, 2017**), *Streptomyces sp* et *Streptomyces nogalator* AC80 (**dos Santos Aguilar et Sato, 2018**).

Le genre *Bacillus* représente également une source majeure, incluant notamment *Bacillus horikoshii*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. lentus*,

*B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. safensis*, *B. cereus* (souche RS3) et *B. amovivorus* (Naveed et al., 2021).

D'autres bactéries, telles que *Stenotrophomonas maltophilia* (souche SK), *Serratia liquefaciens*, *Micrococcus* sp. (Banerjee et Ray, 2017), *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas veronii*, *Bacillus sphaericus* et *Xenorhabdus nematophila*, ont également démontré un potentiel protéolytique notable (dos Santos Aguilar et Sato, 2018).

- **Origine fongique**

Les principaux champignons producteurs de protéases comprennent *Aspergillus niger*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. melleus*, *A. nidulans*, *A. sojae*, *A. terreus*, *A. oryzae*, ainsi que des espèces de *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus* et *Penicillium italicum*. Parmi eux, le genre *Aspergillus* est le plus réputé pour la production de protéases, tandis que d'autres genres comme *Myxococcus*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Ophiostoma* et *Rhizopus* sont également producteurs fréquents (Naveed et al., 2021). Ainsi que, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Beauveria felina*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium* sp. (dos Santos Aguilar et Sato, 2018).

- **Origine levurienne**

Des levures psychrophiles produisant des protéases adaptées au froid ont été identifiées, notamment *Cryptococcus victoriae*, *Yamadazyma* spp., *Sporobolomyces roseus*, *Glaciozyma antarctica*, *Goffeauzyma gilvescens*, *Naganishia globosa*, *Naganishia adeliensis* et *Naganishia albida* (Furhan, 2020). D'autres souches de levures telles que *Rhodotorula mucilaginosa* (KKU-M12c), *Cryptococcus albidus* (KKU-M13c), *Pichia membranifaciens* (KKU-M18c), *Hanseniaspora uvarum* (KKU-M19c) et *Candida alifornica* (KKU-M20c) ont également été rapportées comme productrices de protéases (Mukherjee et al., 2020).

#### 1.4.4 Applications biotechnologiques

Les protéases constituent une classe majeure d'enzymes hydrolytiques, essentielles tant sur le plan physiologique qu'industriel. Celles d'origine microbienne occupent une place centrale dans de nombreuses applications biotechnologiques. Parmi elles, les protéases bactériennes se distinguent par leur efficacité catalytique élevée, leur remarquable stabilité dans des conditions optimales de pH et de température, ainsi que par leur large spécificité de substrat (Adetunji et al., 2023).

#### 1.4.4.1 Industrie alimentaire

Les protéases interviennent dans de nombreux procédés alimentaires et biotechnologiques grâce à leur capacité d'hydrolyse des protéines. Dans la fromagerie, elles dégradent la  $\kappa$ -caséine pour stabiliser les micelles et prévenir la coagulation du lait. En boulangerie, une protéase fongique thermolabile hydrolyse partiellement le gluten, accélérant la préparation des pâtes. Les protéases microbiennes alcalines servent à produire des hydrolysats protéiques à haute valeur nutritionnelle, utilisés dans les aliments infantiles et les boissons enrichies (**Razzaq et al., 2019**).

Outre ces applications, les protéases contribuent à l'amélioration de la digestibilité et de la solubilité des protéines, à l'optimisation de la saveur, à l'extraction d'huile à partir de produits de la mer, à l'attendrissement des viandes, ainsi qu'à la réduction du potentiel allergénique de certains aliments (**Ojo-Omoniyi et al., 2024**).

Dans le secteur laitier, les protéases occupent une place essentielle dans la transformation des produits. Celles de *Rhizomucor pusillus* possèdent une forte activité coagulante du lait, utilisée pour la production de présure microbienne. Les protéases des bactéries lactiques, indispensables à leur croissance dans le lait, dégradent les protéines en peptides et acides aminés nécessaires à leur métabolisme. L'activité protéolytique complexe inclut des aminopeptidases, tri-peptidases, endo-peptidases, protéases extracellulaires et proline-peptidases de type sérine. Les aminopeptidases contribuent à l'amélioration de la saveur des produits fermentés, à la réduction des propriétés allergéniques du lait et à l'accélération du processus fromager (**Abada, 2019**).

#### 1.4.4.2 Détergents

Les protéases jouent un rôle essentiel dans l'industrie des détergents en remplaçant les composés chimiques toxiques traditionnellement utilisés, tels que les agents blanchissants et tensioactifs nocifs, par des alternatives enzymatiques sûres et écologiques. Employées depuis la fin des années 1990, elles représentent environ 20 % des ventes mondiales d'enzymes et 30 % du chiffre d'affaires du secteur, avec une croissance annuelle prévue de 15,5 % entre 2020 et 2025 (**Fatima et al., 2025**).

Les protéases alcalines, principalement de type sérine, sont privilégiées pour leur stabilité à de larges plages de pH et de température, ainsi que leur résistance aux agents tensioactifs et aux métaux lourds. Produites majoritairement par des souches de *Bacillus*, elles

permettent d'éliminer efficacement des taches organiques telles que le sang, les œufs ou la sauce. *Bacillus licheniformis* domine la production industrielle, tandis que des enzymes issues de *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. brevis*, *B. subtilis*, *Streptomyces* sp., *Aspergillus flavus* et *A. niger* présentent une excellente compatibilité avec des stabilisateurs tels que le CaCl<sub>2</sub> et la glycine (Fatima et al., 2025).

Aujourd'hui, les protéases destinées aux détergents représentent environ 30 % du marché mondial des enzymes et sont considérées comme des composants majeurs dans la formulation des produits détergents (Gemechu et al., 2020). Par ailleurs, souvent associées aux amylases, elles sont couramment intégrées aux détergents pour lave-vaisselle afin de dégrader efficacement les résidus alimentaires contenant des protéines et des glucides (Singh et al., 2016).

Ces enzymes facilitent la dégradation de diverses taches (lait, œuf, sang, viande, poisson), tout en améliorant l'efficacité des détergents en réduisant le temps de lavage. Leur activité à faible concentration, combinée à leur stabilité sur de larges plages de pH et de température, offrant une meilleure performance et une longue durée de conservation des produits (Solanki et al., 2021).

#### 1.4.4.3 Industrie photographique

Les protéases alcalines jouent un rôle essentiel dans l'industrie photographique, notamment dans la récupération écologique de l'argent à partir des films radiographiques. Des enzymes produites par *Bacillus subtilis*, *Streptomyces avermectinus* et *Conidiobolus coronatus* ont démontré une efficacité notable dans ce processus, offrant une alternative durable aux méthodes chimiques traditionnelles (Razzaq et al., 2019).

#### 1.4.4.4 Industrie pharmaceutique et médicale

Les protéases sont employées dans les crèmes cutanées pour favoriser l'élimination des cellules mortes, contribuant ainsi à nettoyer et à lisser la peau. En raison de leurs propriétés digestives et anti-inflammatoires, elles présentent un potentiel pour de multiples applications médicales. Par ailleurs, ces enzymes sont régulièrement intégrées dans les solutions de nettoyage pour lentilles de contact afin d'éliminer les dépôts protéiques (Vashist et al., 2019).

Les protéases constituent des cibles thérapeutiques majeures en raison de leur implication dans de nombreux processus biologiques et pathologiques, notamment dans le traitement des tumeurs, du SIDA, du paludisme et des infections bactériennes. D'origine

microbienne, certaines sont utilisées pour soigner des affections telles que les ulcères cutanés, le cancer, la fibrose kystique, les troubles cardiovasculaires et digestifs ainsi que les inflammations. Plusieurs médicaments à base de protéases ont déjà été approuvés par la FDA ou sont en cours d'évaluation clinique. Les avancées en ingénierie enzymatique et en systèmes de délivrance ciblée ont amélioré leur spécificité et leur efficacité. Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont administrées oralement pour pallier les déficits digestifs, tandis que les protéases alcalines, notamment celles de *Bacillus* CK 11-4, montrent une activité fibrinolytique prometteuse pour le traitement des thromboses. Enfin, les protéases alcalines d'*Aspergillus niger* trouvent des applications croissantes dans le secteur pharmaceutique (Naveed et al., 2021).

#### 1.4.4.5 Industrie du cuir

Les protéases microbiennes alcalines constituent une alternative écologique et efficace, car elles catalysent la dégradation des protéines non collagéniques et non fibrillaires de la peau, facilitant ainsi le trempage, le déchaulage et le dépilage. L'usage de ces enzymes permet d'améliorer la qualité du cuir et de réduire la pollution (Banerjee et Ray, 2017). En outre, ces enzymes facilitent la réhydratation efficace des peaux, éliminent les protéines non collagéniques et les chlorures, améliorent l'ouverture des fibres et la souplesse de la matière, tout en réduisant la consommation d'eau et le temps de traitement (Ammasi et al., 2020).

Les protéases sont par ailleurs intégrées dans des stratégies « one-bath » pour le tannage et la séparation des fibres de collagène, contribuant ainsi à l'obtention d'un cuir plus souple et de meilleure qualité (Liu et al., 2025).

#### 1.4.4.6 Autres applications

Les protéases ont de nombreuses applications industrielles et biotechnologiques : elles servent au déséricinage de la soie sans altérer la fibroïne, au biopolissage de la laine pour la rendre infroissable, à l'élimination des biofilms et à la synthèse peptidique. Elles possèdent aussi une activité nématocide utile en biocontrôle, sont intégrées aux nettoyants enzymatiques pour lentilles et aux débrideurs médicaux, et améliorent, dans les aliments pour animaux, la digestibilité des protéines et la biodisponibilité des nutriments (Solanki et al., 2021).

## **Chapitre 2. Actinomycètes**

## Chapitre 2. Actinomycètes

### 2.1 Généralités

Le terme « Actinomycètes » dérive du grec « atkis » (rayon) et « mykes » (champignon) (Castañeda-Cisneros *et al.*, 2020 ; Devanshi *et al.*, 2021 ; Oli *et al.*, 2022). Une distinction doit être établie entre les actinomycètes (terme morphologique) et les actinobactéries (terme phylogénétique) (Bouras *et al.*, 2021).

Ces microorganismes appartiennent au phylum des actinobacteria, l'un des phyla bactériens les plus vastes et les plus diversifiés sur les plans morphologique, physiologique, biochimique et métabolique (Castañeda-Cisneros *et al.*, 2020). Ils sont largement répandus dans la nature, notamment dans les écosystèmes aquatiques, continentaux et atmosphériques, ainsi que dans des habitats extrêmes tels que les déserts, les sédiments profonds des océans et les régions polaires antarctiques (Ibrahim *et al.*, 2025).

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif, filamenteux et sporulants (Khalifa *et al.*, 2022 ; Ibrahim *et al.*, 2025), riches en bases G + C (Hungund *et al.*, 2022). Principalement aérobies, chimiohétérotrophes et mésophiles, ils représentent l'un des groupes microbiens les plus abondants du sol (Khalifa *et al.*, 2022), en particulier dans les sols et les sédiments riches en matière organique, où leurs populations atteignent généralement entre  $10^4$  et  $10^8$  cellules par gramme. En plus, ces micro-organismes prospèrent dans des milieux caractérisés par une faible teneur en humidité, des températures modérées (25–30 °C) et un pH compris entre 6 et 8 (Ibrahim *et al.*, 2025).

Par ailleurs, les actinomycètes sont réputés pour leur capacité à produire une large variété de métabolites secondaires bioactifs, ainsi que des enzymes, offrant de nombreuses perspectives d'application dans les domaines environnemental, agricole, industriel, pharmaceutique et clinique (Helmi, 2025).

### 2.2 Ecologie et habitat des actinomycètes

#### 2.2.1 Milieux terrestres

Le sol constitue un réservoir majeur de diversité microbienne, renfermant jusqu'à  $10^{10}$ – $10^{11}$  bactéries par gramme (Verma *et al.*, 2018). Les actinobactéries, décrites pour la première fois en 1903 à partir du sol, représentent un groupe dominant, avec une densité variant de  $10^6$  à  $10^9$  cellules par gramme (Narsing Rao *et Li*, 2022), soit en moyenne environ  $10^7$  cellules (Verma *et al.*, 2018). Plus particulièrement, les espèces d'actinomycètes sont largement distribuées dans la nature, présentes dans les environnements terrestres et aquatiques. Elles participent à divers processus biologiques et métaboliques, notamment à la

production d'enzymes extracellulaires. Près de 90 % des genres d'actinomycètes ont été isolés du sol, *Streptomyces* étant le genre prédominant (Savitha et al., 2022). Ce tableau 2 indique la diversité des actinobactéries isolées de différents habitats terrestres, ainsi que les genres les plus fréquemment identifiés.

**Tableau 2** : Principaux habitats terrestres d'isolement des actinobactéries (actinomycètes)

Habitat	Actionobacteria	Références
Sol	<i>Cellulomonas, Nocardia, Micromonospora</i>	(Hungund et al., 2022)
	<i>Streptomyces</i> <i>Micromonospora Actinomycetes,</i> <i>Actinoplanes, Streptosporangium,</i> <i>Streptomyces marokkonensis</i> <i>Streptomyces hygroscopicus subsp.</i> <i>Amycolatopsis orientalis</i> <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	(Verma et al., 2018)
Rhizosphère (sol)	<i>Streptomyces griseorubens, Frankia</i>	(Hungund et al., 2022)
	<i>Streptomyces, Microbispora sp, Nocardia,</i> <i>Dactylosporangium solaniradicis,</i> <i>Actinomadura sp, Nocardia sp,</i> <i>Micromonospora sp, Nonomuraea sp</i>	(Prathyusha et Bramhachari, 2018)
Compost	<i>Thermobifida, Saccharomonospora</i> <i>Thermobispora</i>	(Hungund et al., 2022)
	<i>Streptomyces sp., Micropolyspora sp.,</i> <i>Thermomonospora sp.,</i> <i>Saccharomonospora sp.,</i>	(Savitha et al., 2022)

Endophytes	<p><i>Streptomyces, Microbispora, Micromonospora, Nocardioides, Actinomadura, Streptovarticillium, Streptosporangium, Nocardia Nocardioforme, Actinoplanes, Actinomadura, Kitasatospora, Nonomuraea, Actinomadura, Pseudonocardia, Saccharopolyspora, A Promicromonospora, Brevibacterium, Microbacterium, Tsukamurella, Arthrobacter, Brachybacterium, Nocardia, Rhodococcus, Kocuria, Nocardioides, and Pseudonocardia</i></p>	<b>(Passari et al., 2018)</b>
	<p><i>Actinomadura sp., Cellulosimicrobium sp., Glycomyces sp., Gordonia sp., Janibacter sp., Jiangella sp., Microbacterium sp., Micromonospora sp., Mycobacterium sp., Nocardia sp., Nocardiosis sp., Nonomuraea sp., Plantactinospora sp., Polymorphospora sp., Promicromonospora sp., Pseudonocardia sp., Saccharopolyspora sp., Streptomyces sp., Streptosporangium sp., Tsukamurella sp., Streptomyces thermocarboxydus, Streptomyces olivochromogenes, Streptomyces albidoflavus, Streptomyces globosus Streptomyces longisporoflavus Streptomyces kebangsaanensis sp. nov</i></p>	<b>(Tanvir, et al., 2019)</b>
	<p><i>Streptomyces (mainly) Actinocorallia; Actinomadura; Agromyces; Alloactinosynnema; Amycolatopsis; Beutenbergia; Cellulosimicrobium;</i></p>	<b>(Farda et al., 2022)</b>

Grottes	<i>Gordonia</i> ; <i>Isoptericola</i> ; <i>Jiangella</i> ; <i>Knoellia</i> ; <i>Kocuria</i> ; <i>Krasilnikoviella</i> ; <i>Kribbella</i> ; <i>Microbacterium</i> ; <i>Micromonospora</i> ; <i>Mumia</i> ; <i>Mycobacterium</i> ; <i>Nocardia</i> ; <i>Nocardioides</i> ; <i>Nocardiosis</i> ; <i>Nonomuraea</i> ; <i>Oerskovia</i> ; <i>Pseudokineococcus</i> ; <i>Pseudonocardia</i> ; <i>Rhodococcus</i> ; <i>Saccharothrix</i> ; <i>Streptosporangium</i> ; <i>Tsukamurella</i> ; <i>Nocardioides</i> ; <i>Amycolatopsis</i> ; <i>Saccharothrix</i> ; <i>Brevibacterium</i> ; <i>Microbispora thailandensis sp. nov.</i>	
---------	--	--

### 2.2.2 Milieux aquatiques

La richesse spécifique et la diversité génétique des actinobactéries dans différents milieux aquatiques ont été rapportées par de nombreuses études (**Kumari et Rao, 2022** ; **Chakraborty et al., 2022** ; **Savitha et al., 2022** ; **Yaradoddi et al., 2022**). Le tableau ci-après présente certains des habitats principaux.

**Tableau 3** : Principaux habitats aquatiques d'isolement des actinobactéries (actinomycètes)

Habitat	Source	Actinobacteria	Références
Marin	Eponges	<i>Theonella</i> , <i>Rhopaloeides</i> , <i>Aplysina</i> , <i>Xestospongia</i> , <i>Gordonia</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Salinospora</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Streptomyces</i>	<b>(Yaradoddi et al., 2022)</b>
		<i>Actinomycetales bacterium</i> <i>Nocardiosis alba</i> <i>Nocardiosis dassonvillei</i> <i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	<b>(Kamarudheen et Bhaskara Rao, 2022)</b>

		<i>Nocardia xestospongiae</i>	
	Sous-fond marin	<i>Corynebacterineae, Frankineae, Streptomyicineae,</i>	<b>(Yaradoddi et al., 2022)</b>
	Marin	<i>Streptomyces chinaensis</i> <i>Streptomyces tropica</i> <i>Streptomyces sp</i> <i>Nocardia dassonvillei</i> <i>Micromonospora sp. L-13-ACM2-092</i> <i>Streptomyces hygrosopicus</i> <i>Streptomyces venezuelae</i> <i>Streptomyces sp. M491</i>	<b>(Verma et al., 2018)</b>
	Crevettes	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Streptomyces fradiae</i>	<b>(Shijila Rani et al., 2022)</b>
	Récif corallien	<i>Nocardiosis alba</i> <i>Streptomyces sp.</i> <i>Saccharothrix espanaensis</i>	<b>(Babu et al., 2022)</b>
	Algue	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> <i>Streptomyces sp. YM5-799</i> <i>Actinomycetes SW A4</i> <i>Actinomycete DMS 3</i>	<b>(Babu et al., 2022)</b>
Eau douce	Eau	<i>Streptomyces, Streptomyces sp., Streptomyces parvus, Actinoplanes, Micromonospora, Actinopolyspora, Saccharopolyspora, Actinomadura, Microbispora</i>	<b>(Passari et al., 2018)</b>
	Sédiment aquatique	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> <i>Micromonospora sp, Streptomyces</i>	

		<i>sp, Nocardiosis</i> <i>Saccharopolyspora,</i> <i>Actinomadura Microbispora</i>	
	Macrophytes d'eau douce	<i>Streptomyces, Nocardiodes</i> <i>Pseudonocardia, Nocardia,</i> <i>Streptoalloteichus</i> <i>Micromonospora and</i> <i>Actinoplanes</i> <i>Actinomadura Microbiospora</i>	
	Ruisseau, rivière	<i>Streptomyces, Micromonospora</i> <i>Saccharopolyspora</i> <i>Actinosynnema, Streptomyces sp</i>	

### 2.2.3 Milieux aériens

Les Actinobactéries aérotransportées, telles que *Streptomyces griseus*, *S. albidoflavus* et *S. coelicolor*, constituent d'importants contaminants de l'air par leurs spores. De nombreux autres taxons, comme *Streptomyces albus*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Micropolyspora faeni* et *Saccharomonospora viridis*, produisent également des spores susceptibles d'être dispersées par voie aérienne (Kontro et Yaradoddi, 2022).

### 2.2.4 Milieux extrêmes

Les environnements extrêmes se caractérisent par des conditions environnementales spécifiques, telles que des températures, des pressions, des pH ou des concentrations salines extrêmes, ainsi qu'une faible disponibilité en nutriments ou en eau (Singh et al., 2019 ; Shu et al., 2022) ou encore une exposition à des radiations intenses, à des métaux lourds toxiques ou à des composés organiques nocifs. En 1968, le professeur K. Horikoshi a introduit la notion « alkaliphiles » pour désigner les micro-organismes adaptés aux milieux à pH alcalin. Les thermophiles et les alkaliphiles constituent aujourd'hui deux exemples représentatifs des extrémophiles, un ensemble de micro-organismes capables de croître et de se multiplier dans des conditions environnementales extrêmes ((Das, 2012). Ce groupe comprend également les acidophiles, les barophiles, les psychrophiles et les halophiles (Das, 2012 ; Shu et al., 2022),

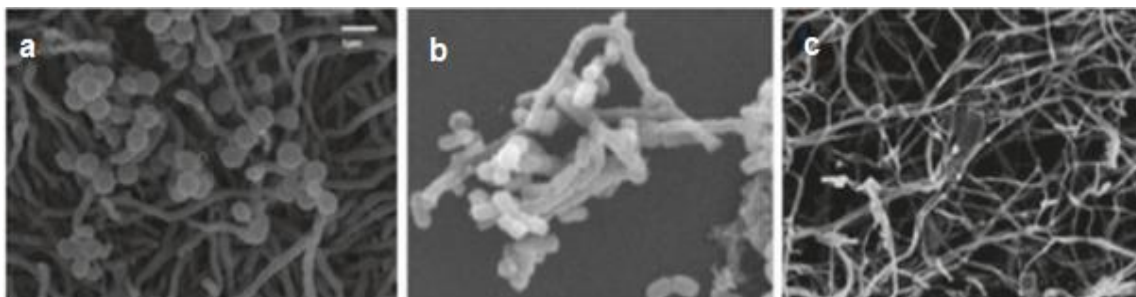
hyperthermophiles, thermophiles, thermoacidophiles, cryophiles, osmophiles, xérophiles, polyextrêmophiles (Singh *et al.*, 2019)

Les actinomycètes se développent non seulement dans des environnements typique, mais également dans des milieux extrêmes et peu étudiés, tels que les déserts, grottes, sources chaudes et volcaniques, mangroves, zones montagneuses, rejets industriels thermiques, ainsi que les régions arctiques et antarctiques, Leur aptitude à s'adapter à ces habitats s'explique par leur flexibilité physiologique et métabolique, associée à la formation d'arthrospores résistantes et à la production de métabolites secondaires (Helmi, 2025).

Plusieurs études ont rapporté des observations similaires. Par exemple, dans l'étude de **Trenozhnikova et al. (2024)**, 556 isolats d'actinomycètes (soit 83,4 % sur un total de 667) se sont révélés capables de croître dans l'ensemble des habitats étudiés : neutres, salins et alcalins. Selon **Sivalingam et al. (2019)**, divers milieux extrêmes, notamment les environnements cryophiles, les zones désertiques, les profondeurs marines et les régions volcaniques, constituent des habitats pour des espèces de *Streptomyces*.

### 2.3 Aspects morphologiques des actinomycètes

Les actinomycètes possèdent un mycélium radial bien développé, subdivisé en mycélium substrat et aérien (figure 3). Certaines espèces forment des structures complexes telles que spores, chaînes de spores, sporanges et sporangiospores (figure 4).

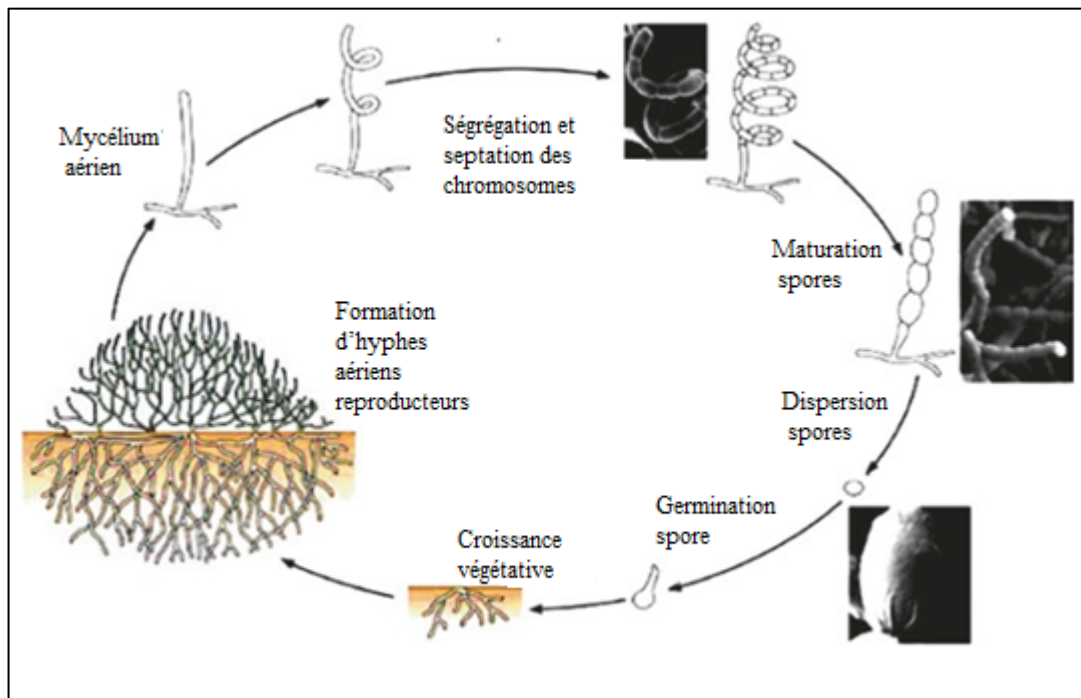


**Figure 3 :** Images au microscope électronique à balayage (MEB) de : (a) hyphes ramifiés de *Micromonospora schwarzwaldensis*, (b) mycélium fragmentant de *Nocardia asteroides* et (c) hyphes aériens ramifiés de *Streptomyces mangrovisoli* (Wink *et al.*, 2017).

#### 2.3.1 Mycélium de substrat

Le mycélium du substrat ou végétatif, constitue la première phase du développement du réseau mycélien (figure 4). Il se forme à partir de la germination des spores et assure la croissance ainsi que l'absorption des nutriments. Sa morphologie varie selon les espèces,

notamment en taille, couleur et épaisseur, et il présente le plus souvent une ramification monopodiale, parfois dichotomique chez certaines espèces comme *Thermoactinomyces*. Ce mycélium peut également libérer des pigments hydrosolubles ou liposolubles, responsables de la coloration du milieu ou des colonies. Au microscope à contraste de phase, il apparaît transparent, fin, faiblement contrasté et présente un degré de ramification plus élevé que celui observé chez les hyphes aériens (Li et al., 2016 ; Hazarika et Thakur, 2020).



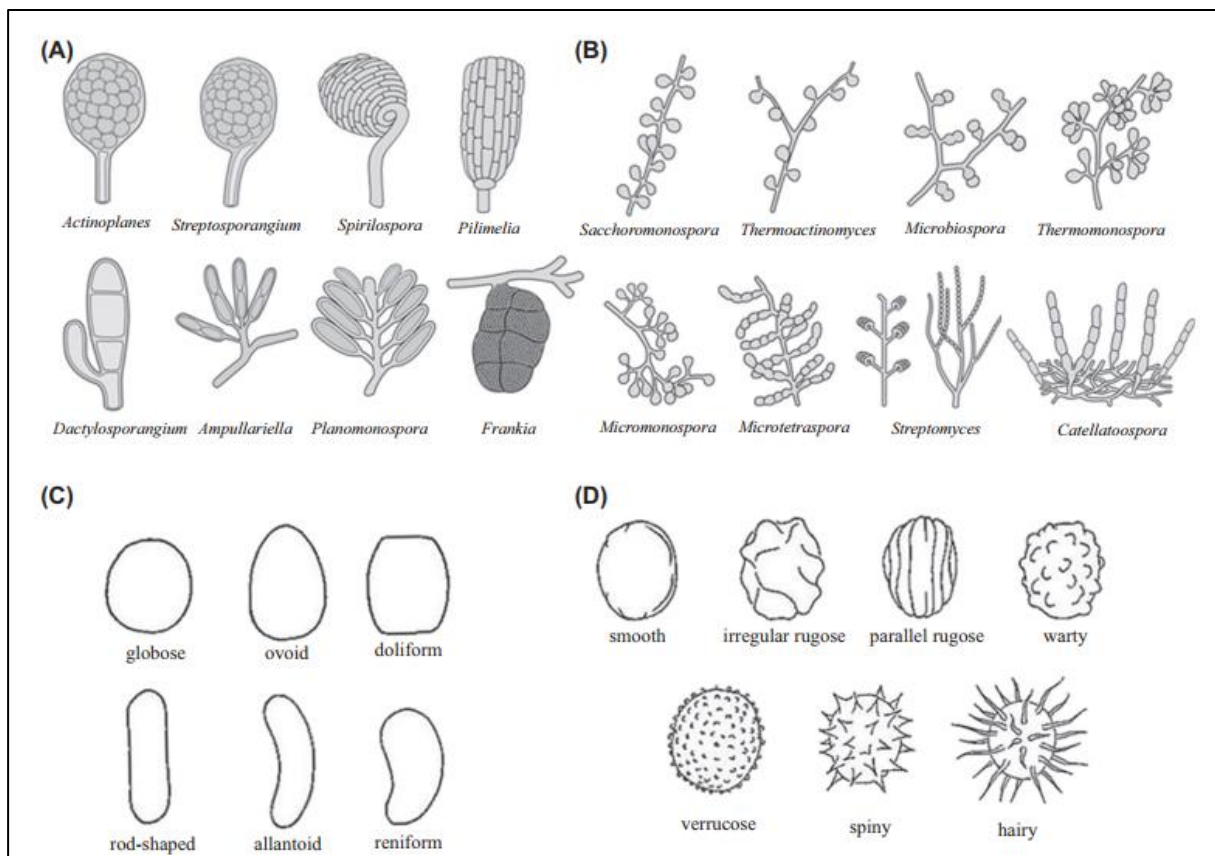
**Figure 4** : Cycle de développement et sporulation chez les actinobactéries (Hamedi et Poorinmohammad, 2017).

### 2.3.2 Mycélium aérien

Lorsque le mycélium du substrat atteint un certain stade, un réseau d'hyphes aériennes se différencie dans le milieu aérien (figure 4), conférant à la colonie une morphologie tridimensionnelle caractéristique. Le développement de ces hyphes casse lors de la sporulation, processus dont la formation des spores dépend des conditions nutritionnelles, des facteurs environnementaux et des caractéristiques propres à chaque espèce. Les hyphes aériens sont généralement plus épais, moins ramifiées et plus hydrophobes que le mycélium du substrat (Li et al., 2016 ; Hazarika et Thakur, 2020).

## 2.3.3 les spores

Les spores se forment à partir du mycélium substrat ou aérien, sont généralement immobiles et varient selon les espèces (figure 5) : isolées (*Micromonospora*), en paires longitudinales (*Microbispora*), en courtes (*Nocardia*, *Catellatospora*) ou longues chaînes (*Streptomyces*), simples ou ramifiées, droites, hélicoïdales, rigides ou flexibles, avec une surface plissée, ridée, épineuse ou velue. Certaines espèces présentent des structures spécialisées distinctes, telles que sporanges 2–50  $\mu\text{m}$  (*Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Dactylosporangium*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Streptosporangium*), sclérotés (*Chainia*), vésicules (*Frankia*) et synnèmes (*Actinosynnema*) (Li et al., 2016 ; Hazarika et Thakur, 2020).



**Figure 5 :** Représentation schématique des spores et des chaînes de spores des actinobactéries. (A) sporanges sur le mycélium substratal. (B) production de spores isolées en courtes chaînes. (C) formes générales des spores. (D) morphologie de surface des spores (Hazarika et Thakur, 2020).

## 2.4 Classification des actinomycètes

### 2.4.1. Taxonomique

Actuellement, la taxonomie des *actinobacteria* repose sur une approche polyphasique intégrant des méthodes phénotypiques, chimiotaxonomiques et génotypiques. Les méthodes phénotypiques taxonomiques englobent l'étude de la morphologie, des propriétés antigéniques, des caractéristiques de croissance, du métabolisme, de la pathogénicité et de l'écologie des micro-organismes. (Subathra Devi et al., 2022).

Selon le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2<sup>e</sup> édition, volume 5, 2012), la classification de ce phylum s'appuie principalement sur les arbres phylogénétiques dérivés des séquences du gène 16S rRNA, complétés par des données phénotypiques et chimiotaxonomiques.

D'après Ludwig et al. (2012), le phylum *actinobacteria* est confirmé par les analyses des gènes 16S et 23S rRNA, la présence conservées (indels) et de réarrangements géniques spécifiques. Cette classification, fondée sur les travaux de Zhi et al. (2009) et Stackebrandt et al. (1997), a supprimé les rangs de sous-classe et de sous-ordre, en élevant les clades correspondants aux rangs de classe et d'ordre. Ainsi, le phylum est structuré en une seule classe, *Actinobacteria*, subdivisée en six classes principales : Acidimicrobiales, Actinobacteriales, Coriobacteriales, Nitriliruptoriales, Rubrobacteriales et Thermoleophilales (Barka et al., 2016 ; Mohammadipanah et Dehghani, 2017 ; Subathra Devi et al., 2022).

Par conséquent, 43 des 53 familles appartenant au phylum Actinobacteria sont rattachées à une seule classe, actinobacteria, tandis que les cinq autres classes ne regroupent ensemble que 10 familles (Barka et al., 2016 ; Mohammadipanah et Dehghani, 2017 ; Subathra Devi et al., 2022).

La classe des *Actinobacteria* comprend 15 ordres :

- Le premier grand clade regroupe les ordres Actinopolysporales, Corynebacterales, Glycomycetales, Jiangellales, Micromonosporales, Propionibacterales et Pseudonocardiales ;
- Le second comprend les ordres Actinomycetales, Bifidobacterales, Kineosporiales et Micrococcales.

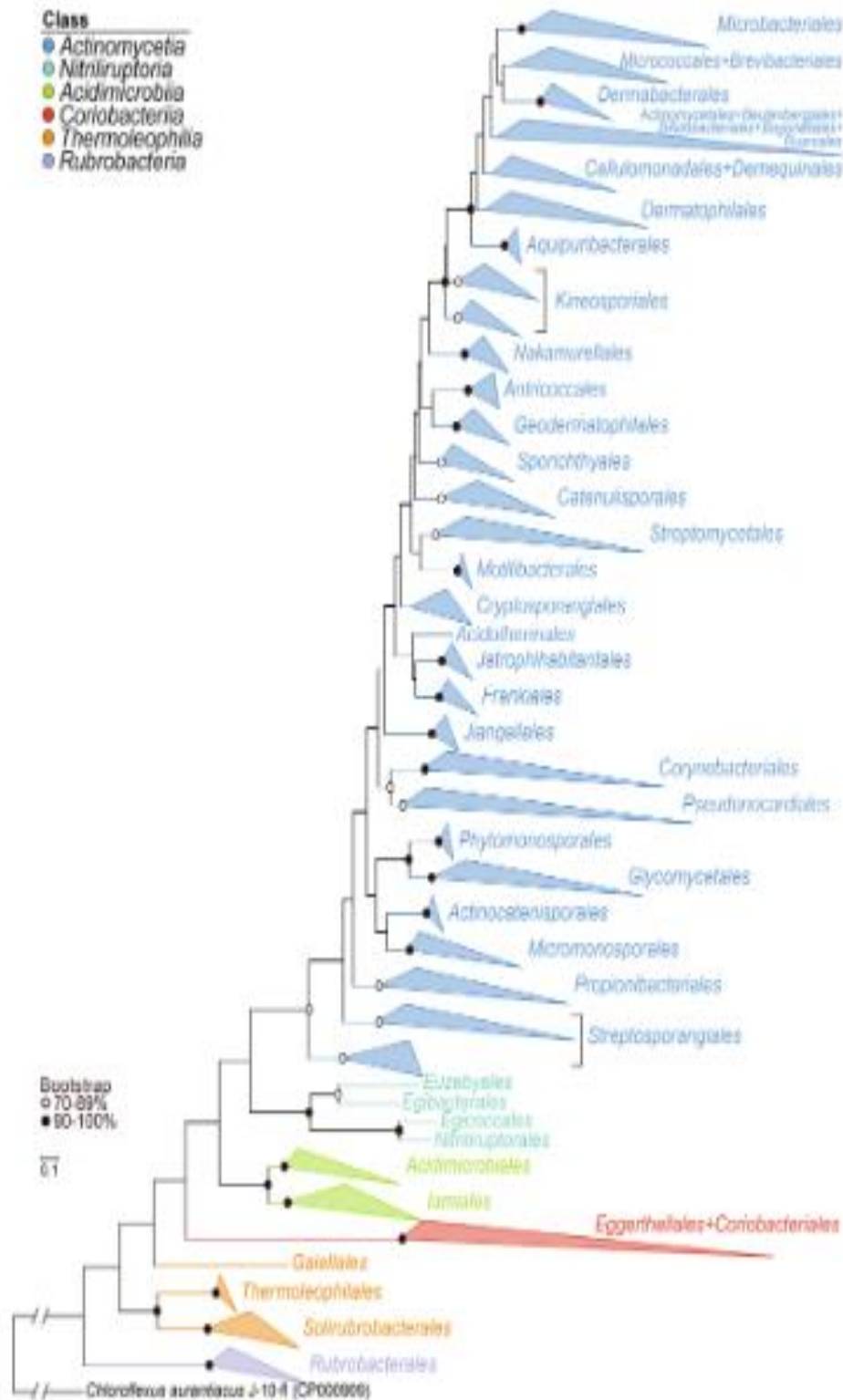
Les ordres Catenulesporales, Streptomycetales et Streptosporangiales constituent des lignées basales, tandis que les familles de Frankiales ne forment pas de clade distinct

(Ludwig et al., 2012 ; Mohammadipanah et Dehhaghi, 2017 ; Subathra Devi et al., 2022).

En revanche, Salam et al. (2020) ont proposé une révision majeure de la taxonomie des rangs supérieurs du phylum (figure 6). Cette réorganisation repose sur des analyses combinant les données génomiques (identité moyenne des acides aminés, AAI), les phylogénies basées sur le gène 16S rRNA, ainsi que sur les séquences génomiques complètes. Dans ce cadre, les séquences 16S rRNA de toutes les souches types du phylum *Actinobacteria* (ayant une nomenclature valide jusqu'en 2018) ont été extraites de la base de données EzBioCloud, et complétées par celles issues du NCBI pour les souches récemment publiées.

Les principaux apports de cette révision sont les suivants :

- **Révision nomenclaturale** : le nom de la classe *Actinobacteria* a été remplacé par *Actinomycetia*, dont l'ordre type est *Actinomycetales* ;
- **Nouvelle structuration taxonomique** : les 425 genres du phylum ont été redistribués en six classes (dont *Actinomycetia*), 46 ordres et 79 familles ;
- **Introduction de nouveaux taxons** : création de 16 ordres et 10 familles nouveaux, reflétant la diversité révélée par les analyses génomiques.



**Figure 6** : Relations phylogénétiques entre les différents ordres du phylum actinobacteria, établies à partir des séquences du gène **16S rRNA**. L'arbre a été construit à l'aide de l'algorithme RAxML et visualisé avec le programme en ligne interactif Tree of Life. Barre : 0,1 substitution par site nucléotidique (Salam et al., 2020).

## 2.4.2 Classique

La classification des actinobactéries s'établit initialement sur des critères phénotypiques, se limitant à l'étude de leurs caractéristiques morphologiques, chimiques et physiologiques.

### 2.4.2.1 Critères morphologiques

La classification des actinobactéries repose principalement sur des critères morphologiques. Ces caractéristiques constituent encore des éléments fondamentaux dans la description des différents taxons, bien qu'elles ne permettent pas de distinguer fiablement les genres en raison de leur forte variabilité. Ces microorganismes présentent une diversité morphologique remarquable, allant des formes coccoïdes observées chez *Micrococcus*, aux formes bacillaires chez *Mycobacterium*, aux hyphes ramifiées sporulées chez *Micromonospora*, ainsi qu'aux mycéliums se fragmentant en cellules coccoïdes ou bacillaires chez *Nocardia*. Certaines espèces, telles que *Streptomyces*, se caractérisent par des hyphes aériens ramifiées de 0,5 à 2 µm de diamètre (Hamedi et Poorinmohammad, 2017 ; Costa-Gutierrez et al., 2021).

Les actinomycètes or actinobactéries mycéliennes, se caractérisent généralement par le développement de deux types de mycélium : aérien et de substrat, avec la capacité de former des spores (spore, chaîne de spores, sporanges et sporangiospor) et de produire des pigments (Li et al., 2016 ; Wink et al., 2017 ; Jose et al., 2021). Ces caractéristiques constituent des marqueurs importants pour l'identification morphologique des espèce (Li et al., 2016 ; Wink et al., 2017 ; Xie et al., 2022).

De manière générale, les milieux standardisés de l'International Streptomyces Project (ISP) (Shirling et Gottlieb, 1966) représentent une référence méthodologique pour la caractérisation des propriétés culturelles et morphologique. Ils permettent de décrire le mode de croissance, la coloration et le développement des mycéliums aérien et substrat, ainsi que la production de pigments diffusibles et les caractéristiques associées à la sporulation. Par ailleurs, l'observation microscopique a permis d'examiner la présence de chaînes de spores, de sporanges ou de spores isolées, la fragmentation éventuelle du mycélium aérien ou substrat, ainsi que le type de morphologie des chaînes des spores (Wink et al., 2017 ; Li et al., 2016).

### 2.4.2.2 Critères physiologiques

Les propriétés physiologiques et métaboliques constituent des paramètres essentiels pour l'identification et la différenciation des espèces d'actinomycètes. Les principaux critères pris en compte incluent (**Wink et al., 2017 ; Hamedi et Poorinmohammad, 2017 ; Hazarika et al., 2020**) :

- Les exigences nutritionnelles (sources de carbone et d'azote utilisées) ;
- Les conditions de croissance (température, pH, concentration en NaCl) ;
- La production d'enzymes extracellulaires ;
- La sensibilité aux antibiotiques ;
- La tolérance à certains composés inhibiteurs.

Ces caractéristiques reflètent l'adaptation physiologique et la diversité métabolique de ce groupe bactérien.

### 2.4.2.3 Critères biochimiques

Les caractéristiques biochimiques des actinomycètes peuvent être évaluées classiquement ou à l'aide de systèmes automatisés, l'utilisation de microplaques et de galeries commerciales standardisées, notamment les systèmes API® (par exemple API Coryne, API ZYM ou API 20E) (**Wink et al., 2017 ; Hamedi et Poorinmohammad, 2017**).

### 2.4.2.4 Critères chimiques

La chimotaxonomie consiste à analyser les constituants chimiques des cellules afin de classer les micro-organismes. Chez les actinobactéries, cette approche a joué un rôle central dans leur classification parmi les bactéries à Gram positif. Les principaux marqueurs chimiques utilisés sont acides aminés, lipides (acides gras, lipopolysaccharides, acides mycoliques, lipides polaires), les polysaccharides et sucres de paroi, ainsi que les menaquinones (**Bora, 2014 ; Wang et Jiang, 2016 ; Hamedi et Poorinmohammad, 2017**).

## 2.4.3 Moléculaire

L'identification moléculaire joue un rôle central dans la taxonomie microbienne. Les techniques les plus couramment utilisées comprennent l'analyse de la séquence génétique de l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), l'hybridation ADN-ADN, la détermination du pourcentage de guanine-cytosine (GC%), le séquençage du génome entier, ainsi que l'étude

des séquences de protéines ribosomiques (Bora, 2014 ; Chen et al., 2016 ; Hamedi et Poorinmohammad, 2017). Ces approches offrent des critères fiables et reproductibles pour identifier et différencier les espèces, établir leurs relations phylogénétiques et proposer la description de nouvelles espèces. L'utilisation combinée de ces méthodes permet une résolution taxonomique plus fine et complète que les seules méthodes classiques basées sur la morphologie ou la physiologie.

## 2.5 Applications biotechnologiques des actinomycètes

### 2.5.1 Biosynthèse des enzymes lytiques

Les actinobactéries, et plus particulièrement les actinomycètes, constituent l'un des groupes microbiens les plus étudiés en raison de leur capacité à synthétiser une grande diversité de des métabolites bioactifs. Elles représentent également une source majeure d'enzymes d'intérêt pour diverses applications biotechnologiques (Mehnaz et al., 2017 ; Vashist et al., 2019 ; Al-Agamy et al., 2021 ; Mondal et al., 2023 ; Al-Quwaie, 2024).

Les actinomycètes d'origine terrestre et marine produisent une large gamme d'enzymes extracellulaires, notamment des lipases, des amylases et des protéases, qui agissent comme biocatalyseurs dans de nombreuses procédés bio-industriels (Sarkar et Suthindhiran, 2022 ; Al-Quwaie, 2024). Le tableau 4 ci-dessous regroupe plusieurs exemples illustrant les intérêts des enzymes synthétisées par des souches d'actinomycètes.

**Tableau 4** : Applications industrielles des enzymes produites par des souches d'actinomycètes

Enzyme	Actinomycètes	Utilisation	Secteur d'application	Référence
Lipase	<i>Streptomyces griseus</i>	Élimination des taches	Fabrication de détergents	(Anandan et al., 2016)
		Stabilité et conditionnement de la pâte	Boulangerie	
		Arôme du fromage	Industrie laitière	
		Désencrage et nettoyage	Textile	
	<i>Streptomyces exfoliatus</i>		Papier et pâte à papier	(Mehnaz et al., 2017 ;

	<i>Nocardiopsis alba</i>		Détergents	<b>Hazarika et Thakur, 2020)</b>
Amylase	<i>Streptomyces spp.</i> <i>Streptomyces erumpens</i>		Boulangerie Production d'alcool Détergents	<b>(Gohain et al., 2020)</b>
	<i>Nocardiopsis spp</i>		Boulangerie industrie papetière	
	<i>Streptomyces erumpens</i>		Détergents	<b>(Mehnaz et al., 2017 ; Hazarika et Thakur, 2020)</b>
	<i>Thermobifida fusca</i>		Papier et pâte à papier	
	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Streptomyces erumpens,</i> <i>Nocardiopsis sp.</i> <i>Thermobifida fusca,</i> <i>Nocardiopsis sp.</i>	Élimination des taches	Fabrication de detergents	<b>(Anandan et al., 2016)</b>
		Amélioration du moelleux et du volume du pain	Boulangerie	
		Désencrage et amélioration du drainage	Papier et pâte à papier	
		Production de sirops de glucose et de fructose	Industrie de l'amidon	
		Élimination de l'amidon des tissus tissés	Textile	
	<i>Streptomyces sp. F-3</i> <i>Streptomyces sp.</i> <i>Saccharomonospora viridis SJ-21</i>	Dégradation de protéines de levure	Valorisation des déchets (agro-industriels)	<b>(Liu et al., 2025)</b>
Coagulation du lait		Industrie laitière	<b>(Zerizer et al., 2024)</b>	
Nettoyage des textiles		Fabrication de detergents	<b>(Salwan et Sharma,</b>	

Protéase	<i>Nocardioopsis sp.</i>			<b>2018)</b>
	<i>Streptomyces speibonae</i>	Préparation d'antioxydants	Valorisation des déchets (pêche)	<b>(Tran et al., 2022)</b>
	<i>Nocardioopsis spp</i>	Dépeçage des peaux	Détergents Industrie du cuir	<b>(Prakash et al., 2013 ; Gohain et al., 2020)</b>
	<i>Streptomyces spp</i>	Dépoilage des peaux de chèvre		
	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	Dissolution du sang coagulé de bovins		<b>(Al-Dhabaan, 2024).</b>
	<i>Streptomyces sp. GIIC</i>	Dégradation de keratine	Recyclage des déchets	<b>(González et al., 2020)</b>
	<i>Thermoactinomyces sp.</i>	Élimination des taches	Fabrication de détergents	<b>(Anandan et al., 2016)</b>
	<i>Nocardioopsis sp.</i>	Fabrication du fromage	Agroalimentaire	
	<i>Streptomyces pactum</i>	Dépeçage (ou décollement des peaux)	Tannerie	
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>			
<i>Streptomyces sp.</i>	Traitement des caillots sanguins	Médical		

De plus, les protéases des actinomycètes, parfois associées à des enzymes d'autres origines, sont utilisées pour la récupération d'antioxydants à partir de déchets de coquillages. De plus, les protéases de *Streptomyces* présentent une activité kératinolytique, exploitée pour la dégradation des plumes, poils, ongles et corne. Les produits d'hydrolyse des protéines ainsi obtenus, riches en acides aminés et peptides, constituent des aliments animaux à faible coût **(Prakash et al., 2013 ; Gohain et al., 2020)**.

Sur le plan industriel, le genre *Streptomyces* est particulièrement dominant et suscite un intérêt croissant en tant que biosource. Ces bactéries à Gram positif produisent de nombreuses enzymes essentielles à leur métabolisme, dont la diversité reflète un fort potentiel d'application dans divers procédés biotechnologiques (Al-Agamy *et al.*, 2021 ; Zerizer *et al.*, 2024). Parmi les espèces les plus étudiées figurent *Streptomyces griseus*, *S. clavuligerus*, *S. thermoviolaceus*, *S. rimouses* et *S. thermovulgaris* (Al-Agamy *et al.*, 2021). Comme le montre le tableau 5 suivant, diverses souches d'actinomycètes présentent une capacité à produire des enzymes hydrolytiques, notamment des lipases, des amylases et des protéases.

**Tableau 5** : Principales enzymes extracellulaires produites par des actinomycètes.

Enzyme	Actinomycètes	Référence
Lipase	<i>Streptomyces parvulus</i>	(Sarkar et Suthindhiran, 2022)
	<i>Actinomycetales bacterium PV7</i>	
	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	
	<i>Streptomyces fungicidicus</i> MML1614	
Amylase	<i>Streptomyces</i> sp. MSC702	(Singh <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Streptomyces fragilis</i> DA7-7	(Nithya <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Nocardiosis sp</i>	(Stamford <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Streptomyces brasiliensis</i>	(Abirami, <i>et al.</i> , 2022)
	<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	(Rathore <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Streptomyces griseorubens</i> , <i>S. rochei</i> , <i>S. parvus</i> , <i>Streptomyces</i> sp., <i>Streptomyces</i> <i>griseorubens</i> KR133201, <i>Streptomyces rochei</i> KR108310 <i>Streptomyces parvus</i> KP675949 <i>Streptomyces</i> sp. MK388207	(Al-Agamy <i>et al.</i> , 2021)

	<i>Streptomyces parvulus</i> , <i>sankarensis</i> -A10 <i>Streptomyces gancidicus</i> - <i>ASD_KT852565</i> <i>Streptomyces sp.</i> VITMK1 <i>Streptomyces sp.</i> S6 <i>Streptomyces sp.</i> SNAJSM6 <i>Nocardioopsis dassonvillei</i> KaS11 <i>Streptomyces lopnurensis</i> KaM5 <i>Streptomyces albus</i>	<b>(Sarkar et Suthindhiran, 2022)</b>
Protéase	<i>Streptomyces sp.</i> 2M21	<b>(Deniz et al., 2019)</b>
	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> <i>Nocardioopsis</i> , <i>Microbispora sp.</i> <i>Streptomyces griseus</i>	<b>(Hazarika et Thakur, 2020 ; Prakash et al., 2013)</b>
	<i>Streptomyces thermovulgaris</i>	<b>(Mushtaq et al., 2020)</b>
	<i>Streptomyces sp.</i> BTS 205 <i>Streptomyces carpaticus</i> <i>Nocardioopsis alba</i> OK-5 <i>Actinopolyspora sp.</i> VITSDK2 <i>Actinomycetales bacterium</i> PV7 <i>Streptomyces parvulus</i> <i>Sankarensis</i> -A10 <i>Streptomyces lopnurensis</i> KaM5 <i>Streptomyces sp.</i> GS-1 <i>Nocardioopsis dassonvillei</i>	<b>(Sarkar et Suthindhiran, 2022)</b>

### 2.5.2 Autre applications

En plus de leur intérêt dans la production enzymatique, les actinomycètes se distinguent par une remarquable polyvalence biotechnologique, se manifestant dans divers domaines grâce à leur métabolisme secondaire exceptionnellement riche et à leur capacité d'adaptation à des environnements variés. La bioremédiation, la pharmacologie des médicaments et leur

utilisation comme agents de biocontrôle en constituent quelques exemples illustratifs, témoignant de l'étendue de leur potentiel pour des applications industrielles, environnementales et biomédicales.

- **Bioremédiation**

La capacité à dégrader une large gamme de polluants, notamment les pesticides, les hydrocarbures pétroliers, les matières plastiques et divers polymères complexes. Ces micro-organismes produisent également des biosurfactants qui facilitent la biodégradation des contaminants, y compris des métaux lourds, en favorisant leur mobilisation et leur transformation. Ainsi, les actinomycètes constituent des agents clés de la dépollution biologique des sols et des eaux contaminés (Devanshi et al., 2021).

- **Pharmacologie des médicaments**

Outre leurs effets anti-infectieux, anticancéreux et immunosuppresseurs, les métabolites secondaires produits par les actinobactéries présentent une diversité d'activités biologiques dans le domaine de la santé, incluant des effets anti-angiogéniques, antioxydants, antiviraux, antibactériens, antifongiques, antiparasitaires, antipaludiques, anti-inflammatoires, cytotoxiques, cytostatiques, antitumoraux et anticancéreux. Ils constituent également une source antibiotique et de nouveaux antibiotiques, tels que les glycopeptides, macrolides, aminoglycosides, rifamycines, tétracyclines et  $\beta$ -lactamines, dotés d'une activité antibactérienne. Ainsi que des molécules approuvées par la FDA produite par *Streptomyces* notamment : tigécycline, everolimus, télithromycine, miglustat, daptomycine, amrubicine, biapénem, ertapénem, pimécrolimus et gemtuzumab (Ma et Karthik 2022 ; Oli et al., 2022).

- **Bioagents ou agents de biocontrôle**

Les espèces d'actinobactéries sont couramment employées comme agents de biocontrôle contre un large éventail de phytopathogènes, tels que *Rhizoctonia*, *Alternaria* et *Verticillium*, ainsi que contre diverses maladies végétales. Plusieurs actinobactéries présentent un potentiel de biocontrôle : *Streptomyces* sp. contre les champignons du riz, *Actinomadura* sp. et *Micromonospora carbonacea* contre *Phytophthora cinnamomi*, *S. netropsis* contre *Verticillium* du coton, *S. griseus* contre *Pythium ultimum*, *M. globosa* contre *Fusarium udum*, *Actinoplanes* sp. contre *Pythium aphanidermatum*, *A. utahensis* contre *Phytophthora megasperma* du soja et *S. violarius* contre *Alternaria alternata* de l'arachide (Kontro et al., 2022).



## **Partie II : Étude expérimentale**

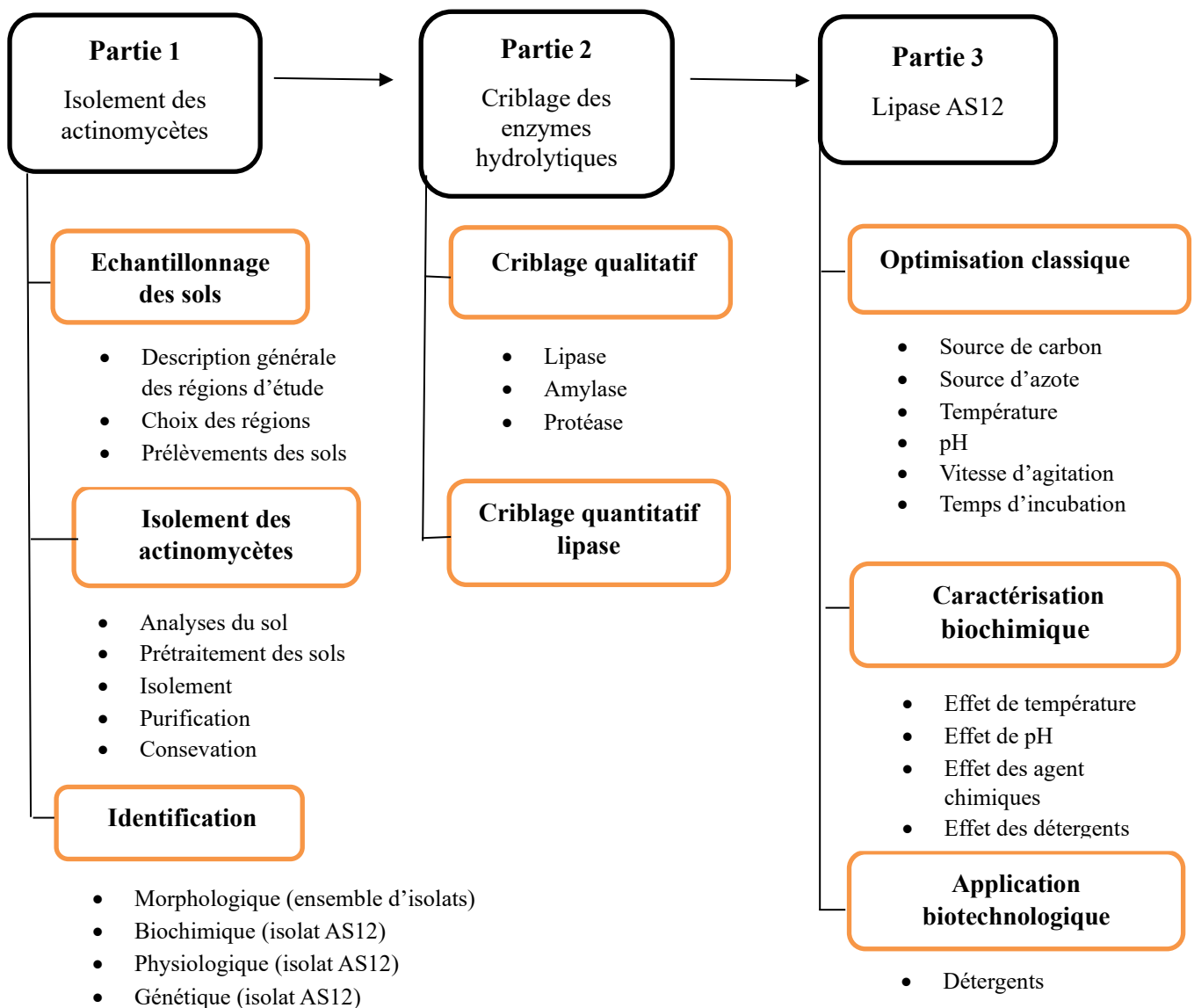
## **Chapitre 3. Matériel et méthodes**

### Chapitre 3. Matériel et méthodes

Ce chapitre présente le protocole expérimental mis en œuvre pour :

- L'isolement d'actinomycètes.
- La recherche d'enzymes hydrolytiques, notamment amylase, protéase et lipase.
- L'étude et l'application de la lipase produite par la souche *Streptomyces sp.* AS12.

## Protocole expérimental général



### 3.1 Actinomycètes : Habitats naturels, isolement et identification

#### 3.1.1 Echantillonnage des sols

##### 3.1.1.1 Localisation et description générale des régions d'étude

➤ **Aperçu sur la wilaya de Saïda :**

La wilaya de Saïda, située au nord-ouest de l'Algérie (0°29'34" N, 4°74'37" E, altitude : 832m), est délimitée au nord par la wilaya de Mascara, au sud par d'El Bayadh, à l'est par Tiaret et à l'ouest par Sidi Bel Abbès (figure 7) (**Djebbouri et Terras, 2019**). Le climat de la région de Saïda est de type semi-aride au nord et aride froid au sud (**Khiami et al., 2021 ; Bentabet et al., 2019**), avec des précipitations moyennes d'environ 400 mm. Les températures présentent une forte amplitude thermique, avec des minimales atteignant 0°C et des maximales dépassant 36°C (**Bentabet et al., 2019**).

➤ **Aperçu sur la wilaya de Naâma :**

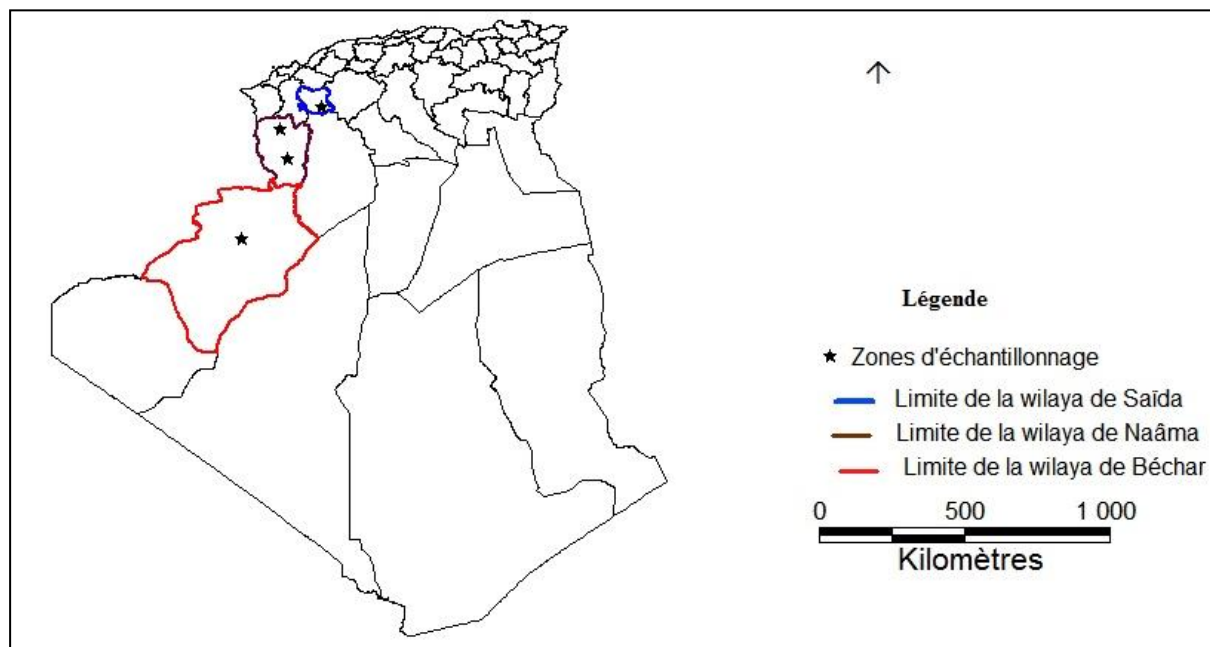
La wilaya de Naâma, située dans l'ouest de l'Algérie (0°29'00" N, 33°31'30" E, altitude : 1229m), est bordée à l'ouest par le Maroc, au nord par les wilayas de Tlemcen et Sidi-Bel-Abbès, à l'est par El-Bayadh, et au sud par Béchar (figure 7) (**Benaradj et al., 2021 ; Hafidha et al., 2024**). La géomorphologie de la région présente une diversité homogène. Au nord, la majeure partie du territoire est constituée de hautes plaines steppiques, représentant 74 %, tandis que la zone présaharienne au sud constitue les 14 % restants. Le climat de la wilaya est de type aride et saharien (**Benaradj et al., 2021**), caractérisé par une pluviométrie annuelle faible et irrégulière (entre 200 et 213,2 mm), et par des hivers froids. La période humide est courte, durant environ trois mois, tandis que la période sèche prédomine le reste de l'année (de 6 à 7 mois) (**Benaradj et al., 2021 ; Hafidha et al., 2024**).

**Aïn Sefra**, commune de la wilaya de Naâma, située dans le sud-ouest de l'Algérie (0°78'32" N, 33°23'53" E, altitude : 1070m) (figure 7), dans la région des Ksour, et se caractérise par un climat généralement semi-aride à aride (**Abdessamed et Abderrazak, 2019**).

➤ **Aperçu sur la wilaya de Béchar :**

La wilaya de Béchar, située dans le sud-ouest de l'Algérie (2°55'70" N, 29°85'80" E, altitude : 998m). (**Bekhira et al., 2019 ; Kharfia, 2022**), est délimitée à l'est par la wilaya d'Adrar, à l'ouest par le Maroc, au nord par les wilayas de Naâma et d'El Bayadh, et au sud par les wilayas de Tindouf et d'Adrar (figure 7) (**Kharfia, 2022**). La wilaya présente un climat désertique de type continental (**Oubadi et al., 2020 ; Kharfia, 2022**), classé BWh

(Classification de Köppen), les températures maximales atteignent en moyenne 40 °C en juillet, tandis que les minimales hivernales descendent jusqu'à 1 °C en janvier (Oubadi et al., 2025). La ville de Béchar est située en zone aride, avec des hivers froids et des étés chauds et sec (Kendouci et al., et al 2019 ; Lekhal et al., 2021 ; Mebarki et al., 2024).



**Figure 7 :** Localisation des zones d'échantillonnage

### 3.1.1.2 Choix des régions d'étude

L'échantillonnage des sols en zones arides et semi-arides repose sur leurs conditions écologiques extrêmes (faible pluviométrie, températures élevées, pauvreté en matière organique et pH souvent alcalin), qui favorisent la sélection de micro-organismes adaptés, notamment les actinomycètes. Ces environnements, reconnus pour leur richesse en actinomycètes en Algérie, constituent un réservoir important de biodiversité et de souches autochtones à potentiel enzymatique et biotechnologique. Dans ce contexte, l'isolement de ces micro-organismes présente un intérêt majeur sur les plans taxonomique, moléculaire, biotechnologique et économique. Dans ce cadre, les régions arides et semi-arides de Saïda, Naâma et Béchar ont été sélectionnée pour cette étude.

### 3.1.1.3 Profil de sol et prélèvements

Les échantillons de sol utilisés pour l'isolement des actinomycètes ont été collectés dans les régions spécifiées précédemment (figure 7), à partir de deux zones distinctes : une vaste étendue de terrain aride située dans les régions de Naâma, Aïn Sefra et Béchar, ainsi que la rhizosphère de deux espèces d'arbres, *Fraxinus excelsior* et *Casuarina equisetifolia*, dans la

région semi-aride de Saïda, au mois de janvier 2021. Selon la méthode de **(Balagurunathan et al., 2020 ; Messaoudi et al., 2020 ; Savitha et al., 2022 ; Antido et al., 2022)** les 3 premiers centimètres de la couche superficielle ont été éliminés. Ensuite, trois échantillons ont été prélevés pour chaque site à une profondeur de 10-15 cm et placés dans des bocaux en verre et des sachets stériles, puis transférés au laboratoire dans une glacière.

#### 3.1.1.4 Analyses du sol

##### 3.1.1.4.1 Mesure de pH

Le pH du sol est un indicateur déterminant qui influence la diversité microbienne, le potentiel de croissance, les activités métaboliques et les processus de décomposition, ainsi que la disponibilité et la solubilité des nutriments, des éléments toxiques et la dégradation des substances dans le sol **(Naz et al., 2022)**.

Pour mesurer le pH des échantillons, une suspension a été préparée en mélangeant 10 g de sol sec avec 10 mL d'eau distillée, puis agitée toutes les 10 minutes pendant 30 minutes **(George et al., 2013)**.

##### 3.1.1.4.2 Mesure de l'humidité

Dans les zones arides et semi-arides, l'eau est considérée comme un facteur limitant. La détermination de l'humidité du sol est importante, car elle influence de manière significative la croissance et la dispersion des microorganismes, tout en affectant également la disponibilité des nutriments, ainsi que les processus de transformation des nutriments et le comportement biologique du sol, etc **(Cui et al., 2020)**.

Pour cette analyse, 10 g de sol sec ont été pesés dans un bocal en verre muni d'un couvercle, préalablement séché à 105 °C et pesée. Les échantillons ont été ensuite séchés au four, couvercle retiré, à 105 °C pendant 24 heures. Après, les bocaux ont été retirés du four, et immédiatement fermés, puis laissés à refroidir dans un dessiccateur pendant au moins 30 minutes **(George et al., 2013 ; He et al., 2023)**. L'humidité a été calculée en pourcentage selon la formule suivante.

$$H\% = (P2 - P3 / P3 - P1) \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

P1 : poids du bocal vide, séché à 105 °C.

P2 : poids du bocal avec terre avant séchage.

P3 : poids du bocal avec terre après séchage à 105 °C.

### 3.1.1.4.3 Mesure de la matière organique

La matière organique du sol (MOS) se caractérise par une teneur élevée en carbone et présente une composition variable (Angst et al., 2021). Bien que présente en quantités relativement faibles, la matière organique (MO) joue un rôle important dans l'agrégation du sol, les réserves et la disponibilité des nutriments, la rétention d'humidité, et l'activité biologique (Irfan et al., 2019).

La détermination de sa quantité dans les sols prélevés repose sur la mesure de la fraction organique par calcination, selon laquelle 5 g de sol sec ont été calcinés dans un four à moufle à haute température (500°C) pendant 7 heures (Pietrzak, 2021).

$MO \% = (\text{Poids du sol avant calcination} - \text{Poids du sol après calcination}) / \text{Poids du sol avant calcination}$  (Eq. 2) (Benslama et al., 2024)

### 3.1.2 Isolement des actinomycètes

Il existe différentes stratégies d'isolement des actinomycètes à partir divers environnements, incluant plusieurs techniques spécialisées et adaptées. Cette étude vise à isoler ces bactéries en combinant des traitements physiques et chimiques, ainsi que l'utilisation de milieux sélectifs.

#### 3.1.2.1 Prétraitement d'échantillons

Avant de procéder à l'isolement sélectif des actinomycètes, un prétraitement des échantillons de sol a été réalisé afin de faciliter et favoriser la croissance des actinomycètes en éliminant ou réduisant la majorité des bactéries et champignons indésirables (Balagurunathan et al., 2020). Deux méthodes ont ainsi été adoptées :

##### 3.1.2.1.1 Bicarbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>)

Les échantillons de sol sec issus de la rhizosphère de *Fraxinus excelsior* (FRP) et de *Casuarina equisetifolia* (CEq) ont été prétraités selon la technique présentée par El-Nakeeb et Lechevalier (1963), dans laquelle 10 g de chaque échantillon ont été enrichis par l'ajout de 1 g de carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>). Ensuite, ces mélanges ont été incubés à 30 °C pendant 7 jours dans une atmosphère saturée d'humidité (Singh et al., 2019 ; Tiwari et al., 2021 ; Bellebcir et al., 2023).

### 3.1.2.1.2 Chauffage sec

Les échantillons de sol sec recueillis dans les régions de Naâma (NS), Aïn Sefra (AS) et Béchar (BEC) ont été chauffés à 55 °C pendant 10 minutes (**Daigham et al., 2020 ; Khoshakhlagh et al., 2022**).

### 3.1.2.2 Méthode de suspensions-dilutions et ensemencement

Les actinomycètes ont été isolés à l'aide de la méthode des suspensions-dilutions (**Charousová et al., 2019 ; Sapkota et al., 2020 ; Momin et al., 2021 ; Trabelsi et al., 2022**). Pour préparer la solution mère, 1 g de sol prétraité a été suspendu dans 9 ml d'eau physiologique stérile. Après deux périodes d'agitation de 10 minutes chacune au vortex, la suspension a été diluée en série jusqu'à une dilution de  $10^{-4}$ . Ensuite, 100 µl de chaque dilution a été étalé sur la surface des milieux caséine-d'amidon agar (SCA) (**Singh et al., 2019 ; Sapkota et al., 2020 ; Zhang et al., 2021 ; Radhakrishnan et al., 2022 ; Ayoib et al., 2024**), glucose-extrait de levure-extrait de malt agar (GYM) (**Van Nam et al., 2019 ; Sara et al., 2022 ; Hozzein, 2022**) et Bennett agar (**Singh et al., 2020 ; Maiti et al., 2019**) (annexe n°1), en trois répétitions. Enfin, les boîtes ont été maintenues à température ambiante pendant environ 10 minutes pour l'absorption du liquide, puis incubées à 30 °C pendant 21 à 30 jours et examinées régulièrement.

### 3.1.2.3 Purification et conversation des isolats

Les colonies présentant les caractéristiques des actinomycètes ont été sélectionnées pour être purifiées par l'ensemencement par épuisement sur les mêmes milieux d'isolement. Après incubation à 30 °C pendant 7 à 10 jours, les souches pures ont été conservées à la fois à 4 °C (**Ayoib et al., 2024**) et à -80 °C dans du glycérol à 30 % (**Fatima et al., 2019 ; Charousová et al., 2019**).

### 3.1.3 Identification

L'identification des souches isolées s'est appuyée sur une série de méthodes classiques visant à rechercher des caractéristiques spécifiques. À cet effet, une étude morphologique a été réalisée sur l'ensemble des souches, tandis que les études biochimiques, physiologiques et génétiques ont été menées sur l'isolat sélectionné AS12.

### 3.1.3.1 Caractérisation morphologique des isolats

#### 3.1.3.1.1 Examen macroscopique

L'examen permet d'apprécier la croissance de la souche, l'aspect de la colonie (forme, texture, élévation), ainsi que la couleur du pigment diffusible. Ces critères ont été observés aux 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours d'incubation à 30°C sur les milieux précédemment cités. En parallèle, la couleur du mycélium aérien et du substrat a été notée de manière simple (**Wink et al., 2017 ; Charousová et al., 2019 ; Sapkota et al., 2020 ; Rozirwan et al., 2020 ; Sarika et al., 2021 ; Das et al., 2021 ; Antido et al., 2022 ; Ayoib et al., 2024**).

#### 3.1.3.1.2 Examen microscopique

L'examen inclut des observations de la sporulation ainsi que de la fragmentation éventuelle du mycélium aérien et du substrat, réalisées avec des grossissements de x40 et x100 à l'aide d'un microscope optique (Optika C-P6) (**Shrestha et al., 2021 ; Das et al., 2021 ; Khoshakhlagh et al., 2022 ; Naligama et al., 2022 ; Ayoib et al., 2024**).

### 3.1.3.2 Caractérisation physiologique et biochimique d'isolat AS12

#### 3.1.3.2.1 Tests des températures et du pH

L'influence de la température sur la croissance de l'isolats AS12 a été évaluée pendant 21 jours à différentes températures (25, 30, 35, 40, 45 et 50 °C), en utilisant respectivement le milieu solide ISP2. Par ailleurs, la croissance de cet isolat a également été examinée à différents valeurs de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10) sur le même milieu à 30 °C pendant 7jours (**Wink et al., 2017 ; Charousová et al., 2019 ; Messaoudi et al., 2020**).

#### 3.1.3.2.2 Test de tolérance au chlorure de sodium (NaCl)

L'effet du NaCl sur la croissance de l'isolat AS12 a été observé sur le milieu ISP2 à diverses concentrations (0 %, 2,5 %, 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 50%) pendant 10 jours à 30 °C. (**Wink et al., 2017 ; Charousová et al., 2019 ; Ezeobiora et al., 2022 ; Ayoib et al., 2024**).

#### 3.1.3.2.3 Test d'utilisation des sources de carbone glucidiques

La capacité de l'isolat AS12 à utiliser divers composés glucidiques (glucose, galactose, fructose, maltose, mannose, saccharose, arabinose, lactose, rhamnose) comme seules sources de carbone a été réalisée conformément à la méthode de **Shirling et Gottlieb (1966)**. Des solutions stock à 10 % (w/v) des composés glucidiques mentionnés précédemment ont été préparées avec de l'eau distillée, stérilisées par filtration à travers un filtre à seringue (0,22 µm), puis ajoutées au milieu minéral de base ISP9 stérile (annexe n°1) après refroidissement à

50 °C, afin d'obtenir une concentration finale de 1 %. Le milieu a ensuite été coulé dans des boîtes de Pétri etensemencé avec la souche à tester. Après incubation à 30 °C pendant 10 jours, la croissance a été évaluée en fonction du tableau (annexe n°2). La boîte contenant uniquement le milieu de base sans source de glucides a été considérée comme le témoin négatif, et celle contenant le milieu ISP9 enrichi en glucose a été prise comme témoin positif. **(Wink et al., 2017 ; Charousová et al., 2019 ; Khosravi et al., 2021 ; Ayoib et al., 2024).**

#### 3.1.3.2.4 Caractérisation cultural

La souche a été cultivée et examinée morphologiquement sur différents milieux, en suivant la méthode de Shirling et Gottlieb (1966) dans le cadre du Projet International des *Streptomyces* (ISP). Pour cela, 100 µl d'une culture liquide ont été étalés sur la surface des milieux suivants : glucose-extrait de levure-extrait de malt (GYM), extrait de levure-extrait de malt (ISP 2), flocons d'avoine (ISP 3), Amidon-sels inorganiques agar (ISP 4), glycérol-asparagine (ISP 5) (annexe n°1), puis incubés de 10 à 14 jours à 30 °C **(Das et al., 2021 ; Khosravi et al., 2021 ; David et al., 2022).**

#### 3.1.3.2.5 Production de xylanase

La souche a étéensemencée aseptiquement par touches sur un milieu xylane (1%) (annexe n°1). Après 7 jours d'incubation 30°C, la boîte ont été recouverte d'une solution de rouge Congo à 0.2% pendant 10 minutes, puis rincée avec une solution de NaCl 1 M. Une activité xylanolytique positive a été mise en évidence par l'apparition d'un halo jaune clair autour des colonies, contrastant avec le fond rouge **(Castañeda-Cisneros et al., 2020).**

#### 3.1.3.2.6 Production de cellulase

L'isolat a été cultivé sur un milieu carboxyméthylcellulose (CMC) (1%) pendant 7 jours à 30 °C (annexe n°1). Ensuite, la boîte a été inondée avec une solution de colorant Congo rouge à 1 % (p/v) pendant 15 minutes, suivies d'un rinçage avec une solution de NaCl 1M (décolorant). La présence de zones claires autour des colonies indique la décomposition de la CMC et la production de cellulase **(Fitri et al., 2021 ; Naligama et al., 2022).**

#### 3.1.3.2.7 Test du citrate de Simmons

Ce test permet d'examiner l'aptitude de certaines bactéries à utiliser le citrate comme seule source de carbone. La souche AS12 a été cultivée sur un milieu de citrate de Simmons, incubées à 30 °C et suivie pendant 14 jours. Un changement de couleur du milieu en bleu indique que le citrate a été utilisé par la souche. ; **Rozirwan et al., 2020 ; Das et al., 2021 ; Saikia et al., 2021 ; Ayoib et al., 2024).**

### 3.1.3.2.8 Test de catalase

C'est un test couramment utilisé pour identifier la présence de l'enzyme catalase chez de nombreuses bactéries, y compris les Gram positives. L'enzyme catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ) et en dioxygène ( $O_2$ ). La détection de la catalase a été réalisée en étalant une colonie d'isolat AS12 (7jours) sur une lame propre, puis en déposant une goutte d'eau oxygénée (10 volumes) à l'aide d'une pipette. La présence de catalase a été vérifiée par l'observation directe de la formation de bulles d'air, tandis que son absence a été confirmée par l'absence de bulles (Sapkota et al., 2020 ; Rozirwan et al., 2020 ; Das et al., 2021 ; Saikia et al., 2021 ; Naligama et al., 2022 ; Ayoib et al., 2024).

### 3.1.3.2.9 Test d'oxydase

Le test est principalement utilisé pour détecter la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase, généralement chez les bactéries aérobies à Gram négatives. La recherche de l'oxydase a été réalisée à l'aide de disques prêts à l'emploi, sur lesquels un fragment de la colonie (7jours) a été transféré et étalé. Le test a été considéré comme positif si un changement de couleur du disque en violet a été immédiatement observé, dû à l'indophénol produit par l'oxydation du réactif p-phénylènediamine en présence de cytochrome c et d'oxygène. En revanche, si aucun changement de couleur ne se produit, le test a été considéré comme négatif (Sapkota et al., 2020 ; Saikia et al., 2021 ; Ezeobiora et al., 2022).

### 3.1.3.3 L'identification moléculaire

L'identification moléculaire de la souche a été effectuée par séquençage du gène de l'ARNr 16S au laboratoire GENE LIFE SCIENCES (Algérie), selon le protocole suivant. L'ADN a été extrait à l'aide du kit GF-1 Nucleic Acid Extraction (Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Selangor, DE, Malaisie). L'amplification du gène 16S rRNA a été effectuée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), en utilisant les amorces spécifiques ACTF243 (5'-GGATGAGCCCGCGGCCT-3') et Act704R (5' TCTGCGCATTTCACCGCTA-3'). Les produits PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis purifiés à l'aide du kit Clean-Up (Vivantis). Les fragments purifiés ont ensuite été soumis au séquençage (Apical Scientific Sdn. Bhd.). Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide de l'outil BLASTn (National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Un arbre phylogénétique a été construit selon la méthode du Neighbor-Joining, avec 1000 réplicats de bootstrap.

### 3.2 Actinomycètes : Criblage et sélection d'isolats producteurs d'enzymes

Le criblage initial de la production d'enzymes extracellulaires microbiennes est généralement effectué par inoculation ponctuelle (spot) ou en trait sur un milieu solide enrichi en substrat spécifique ou en indicateurs (**Balagurunathan et al., 2020**).

Les méthodes qualitatives sur gélose offrent une évaluation préliminaire rapide de l'activité enzymatique et facilitent l'identification des souches les plus prometteuses. Ensuite, la quantification de la production enzymatique en milieu liquide repose sur des méthodes titrimétriques ou spectrophotométriques.

#### 3.2.1 Criblage qualitatif de la production des enzymes hydrolytiques

La capacité des isolats à produire des enzymes hydrolytiques, notamment la lipase, l'amylase et la protéase, a été évaluée sur des milieux sélectifs appropriés, en utilisant la méthode d'ensemencement par point (spot inoculation). L'activité enzymatique a été mise en évidence par la présence d'un halo autour des colonies, indiquant l'hydrolyse du substrat, comme décrit dans le tableau 6. Les diamètres des halos d'hydrolyse ainsi que des zones de croissance des colonies ont été mesurés (en mm) afin d'enregistrer les résultats. L'activité enzymatique relative (AER) a ensuite été calculée selon la formule indiquée ci-dessous (Eq. 3) (**Putri et al., 2019 ; Chauhan et al., 2021 ; Fitri et al., 2021**) :

$$\text{AER} = \frac{\text{Diamètre de la zone d'hydrolyse}}{\text{Diamètre de la colonie}} \quad (\text{Eq. 3})$$

**Tableau 6** : Criblage enzymatique qualitatif de isolats d'actinomycètes

Enzyme	Milieu	Incubation	Indication de la présence d'activité enzymatique	Références
Lipase	Tween 80 agar (1% p/v)	7 jours /30°C	Observation d'un halo blanc constitué de cristaux de sel de calcium entourant la colonie.	<b>Panyachanakul et al., 2020;</b> <b>Angelin et Kavitha, 2022 ;</b> <b>Chakraborty et al., 2022</b>
Protéase	Milieu de base avec lait écrémé (1% p/v)	7 jours /30°C	Apparition d'une zone incolore entourant la colonie.	<b>Al-Dhabi et al., 2019</b>

Amylase	Milieu basal avec amidon (1 % p/v)	5 jours/30°C	Formation d'un halo jaune clair autour de la colonie après l'ajout d'une solution d'iode (1%)	<b>Al-Dhabi et al., 2019 ;</b> <b>Kherouf et al., 2021</b>
---------	------------------------------------	--------------	---	---

### 3.2.2 Criblage quantitatif de la production de lipase AS12

#### 3.2.2.1 Production par fermentation submergée

L'isolat lipolytique AS 12 a été sélectionné pour étudier la production de lipase extracellulaire au cours d'une fermentation submergée agitée (figure 8). Dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml, contenant chacun 50 ml de milieu de production composé de 10 g de peptone, 2 g de sulfate de magnésium heptahydraté ( $MgSO_4$ ), 0,1 g de chlorure de calcium ( $CaCl_2$ ) et 10 % (p/v) de Tween 80 utilisé comme seule source de carbone, avec un pH de 6,7. Les flacons ont ensuite été inoculés avec  $10^6$  spores/mL et incubés à 30 °C pendant 48 heures sous agitation à 140 rpm. Après, le surnageant a été collecté par centrifugation à 10 000 tr/min pendant 15 minutes à 4 °C et utilisé comme extrait enzymatique brut. (Kumar et al., 2017).



Figure 8 : Production de lipase AS12 par fermentation submergée

#### 3.2.2.2 Mesure de l'activité enzymatique (AE)

Dans cette étude, l'activité lipasique a été mesurée par la méthode de titrage en utilisant des triglycérides d'huile d'olive comme substrat (figure 9) (Adetunji et al., 2021, Angelin et Kavitha, 2022). La solution réactionnelle et le témoin ont été préparés en mélangeant 1 ml de tampon Tris-HCl (200 mM, pH 7,7 à 37 °C), 2,5 ml d'eau distillée et 3 ml d'émulsion d'huile d'olive dans des Erlenmeyer de 50 ml. Ensuite, 1 ml d'extrait enzymatique brut a été ajouté à la solution réactionnelle (ajustée au préalable à 37 °C). Le mélange a été vigoureusement agité puis incubé à 37 °C pendant 30 minutes, tandis que la solution témoin, préparée sans ajout d'enzyme, a été conservée à 4 °C. Finalement, 3 ml d'éthanol à 95 % et 4 gouttes de

phénolphtaléine (Phph) ont été ajoutés à chaque solution. Le titrage a été effectué par ajout progressif de NaOH 50 mM jusqu'à l'obtention d'une coloration rose pâle. Une unité d'activité lipasique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1  $\mu\text{mol}$  d'acide gras par heure, à pH 7,7 et à 37 °C, à partir d'un substrat triglycéridique. (Kumar et al., 2017 ; Putri et al., 2020 ; Dev et al., 2020 ; Anbalagan et al., 2021 ; Akhter et al., 2022). L'activité lipasique a été calculée selon la formule suivante (Eq. 4) :

$$\text{Units/mL enzyme} = (\text{NaOH})(\text{Molarité de NaOH}) (1000)(2)(\text{df})/1 \quad (\text{Eq. 4})$$

(NaOH) = Volume de NaOH utilisé pour le test moins le volume de NaOH utilisé pour le témoin.

1000 = Facteur de conversion des milliéquivalents en microéquivalents.

2 = Facteur de conversion du temps de 30 minutes à 1 heure (Définition de l'unité).

df = Facteur de dilution.

1 = Volume (en millilitres) d'enzyme utilisé.



**Figure 9** : Dosage de l'activité lipasique par titrage des acides gras libérés

### 3.2.2.3 Mesure de l'activité spécifique (AS)

L'activité spécifique est définie comme le rapport entre l'activité enzymatique (généralement exprimée en (U/mL) et la concentration totale en protéines (mg/mL). Elle s'exprime en U/mg de protéines, selon la formule ci-dessous (Eq. 5) (Kuepethkaew et al., 2017 ; Tan et al., 2018 ; Poornima et al., 2020 ; Helal et al., 2021) :

$$(\text{AS}) = \frac{\text{Activité enzymatique}}{\text{Quantité totale de protéines}} \quad (\text{Eq. 5})$$

### 3.2.2.4 Quantification des protéines

La concentration en protéines dans les extraits enzymatiques bruts a été mesurée selon la méthode de Bradford (Goldring, 2019 ; Boran *et al.*, 2019 ; Kielkopf *et al.*, 2020). La méthode repose sur l'interaction spécifique du colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 avec les résidus aromatiques et basiques des protéines. La formation du complexe induit un changement de couleur vers le bleu (forme anionique), dont l'absorbance maximale à 595 nm est proportionnelle à la concentration en protéines. (Kurien *et al.*, 2021 ; Kummari *et al.*, 2022 ; Moreira, 2022 ; Campion *et al.*, 2023).

Pour le dosage, 100 µl d'échantillon ont été mélangés avec le réactif de Bradford. La réaction a été laissée à se stabiliser pendant 5 minutes, puis l'absorbance a été mesurée à 595 nm par rapport au blanc (eau distillée) à l'aide d'un spectrophotomètre (UV 1240/1280). La concentration totale en protéines a été déterminée indirectement grâce à une courbe d'étalonnage établie avec le sérum albumine bovine (SAB) à une concentration de 0,1 mg/mL (annexe n° 2). La quantité de protéines a été exprimée en mg/mL (Semache *et al.*, 2021).

## 3.3 Lipase AS12 : optimisation, caractérisation biochimique et l'essai application

### 3.3.1 Optimisation de la production de la lipase AS12

La biosynthèse de lipase dépend fortement de la composition du milieu de culture ainsi que des conditions de production (Adetunji et Olaniran, 2021). L'optimisation de la production de lipase par l'isolat AS12 a été réalisée en évaluant l'influence de divers paramètres de culture, notamment la température, le pH, le temps d'incubation, la vitesse d'agitation, ainsi que les sources de carbone et d'azote. Ces facteurs ont été étudiés selon l'approche classique "une variable à la fois" (OVAT) (Bharathi *et al.*, 2019 ; Melani *et al.*, 2020 ; Ktata *et al.*, 2020 ; Adetunji et Olaniran, 2021), qui permet d'examiner l'effet individuel de chaque paramètre en maintenant les autres conditions constantes. L'activité lipasique (exprimée en U/mL) a été mesurée par titrage, conformément au protocole décrit précédemment.

La production initiale de lipase a été réalisée par fermentation, sans optimisation, comme décrit précédemment (section 3.2.2.1 de ce chapitre).

#### 3.3.1.1 Influence des sources de carbone et d'azote sur la production de lipase

Les sources de carbone et d'azote ont été ajustées à une concentration de 1 % (p/v) dans le milieu initial de production de lipase. Le Tween 80 a été remplacé par le Tween 20, ainsi

que par de l'huile d'amande, de l'huile de sésame, de l'huile d'arachide et de l'huile d'olive. En revanche, la peptone a été substituée par divers composés azotés : extrait de levure, tryptone, extrait de viande, extrait de malt, peptone, nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ), nitrate de potassium ( $\text{KNO}_3$ ).

### 3.3.1.2 Influence des conditions de culture sur la production de lipase

Dans des conditions initiales standardisées, chaque paramètre a été optimisé individuellement en maintenant les autres variables constantes. La température a été testée entre 25 et 60 °C, le pH du milieu ajusté de 5,5 à 9. La vitesse d'agitation a varié de 100 à 200 rpm et la durée d'incubation de 24 à 120 heures.

### 3.3.1.3 Conditions optimales de la production de lipase

La production maximale de lipase a été obtenue en cultivant l'isolat AS12 dans des conditions optimales. L'extrait enzymatique brut a été récupéré par centrifugation du milieu à 13 000 tr/min pendant 15 minutes à 4 °C. L'activité lipolytique a été déterminée selon la méthode décrite précédemment.

### 3.3.2 Purification partielle de la lipase

La précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium est une méthode de séparation différentielle des protéines fondée sur leur solubilité en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium. Lorsque la concentration en sel s'accroît, la force ionique du milieu augmente, perturbant ainsi les interactions hydrophobes et réduisant la solubilité des protéines, ce qui conduit à leur agrégation puis à leur précipitation. (Du el *al.*, 2022 ; Jedidi'ah et *al.*, 2024).

Le sulfate d'ammonium solide a été ajouté progressivement au surnageant filtré jusqu' à 80 % de saturation (p/v) à 4 °C. Après, une agitation légère pendant 2 heures, Le précipité a ensuite été récupéré par centrifugation dans des tubes de type eppendorf (1,5 ml de volume) à 13 000 tr/min pendant 10 minutes à 4 °C, puis remises en suspension dans un volume minimal de tampon Tris-HCl 0,02 M (pH 7,4) (figure 10). Le culot et le surnageant ont été dialysés à 4 °C pendant 24 heures, avec trois changements de tampon afin d'éliminer les sels (Kumar et *al.*, 2017 ; Boran et *al.*, 2019).



**Figure 10** : Purification partielle de la lipase par méthode de sulfate d'ammonium

➤ **Expression et calcul des résultats**

- **L'activité spécifique (AS)** : correspond au nombre d'unités enzymatiques (UI) par milligramme de protéines totales. Elle permet d'estimer la pureté relative d'une préparation enzymatique.

$$(AS) = \frac{\text{Activité enzymatique}}{\text{Quantité totale de protéines}} \quad (\text{Eq. 5})$$

- **Facteur de purification (PF)** : c'est le rapport entre l'activité spécifique d'une enzyme après une étape de purification et l'activité spécifique initiale de l'extrait brut.

$$(PF) = \frac{\text{activité spécifique d'enzyme partiellement purifiée}}{\text{activité spécifique d'enzyme brute}} \quad (\text{Eq. 6})$$

- **Rendement (R)** : Le rendement de purification correspond au pourcentage d'activité enzymatique totale récupérée après purification, par rapport à l'activité initiale présente dans l'extrait brut.

$$(R\%) = \frac{\text{Activité enzymatique totale après purification}}{\text{Activité enzymatique totale avant purification}} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

### 3.3.3 Caractérisation biochimique de la lipase partiellement purifiée

Cette partie vise à caractériser les propriétés catalytiques de la lipase après purification, en étudiant notamment l'effet du pH, de la température et des effecteurs chimiques sur sa stabilité enzymatique.

#### 3.3.3.1 Stabilité de la lipase à différentes températures

La thermostabilité de la lipase produite par la souche AS12 a été déterminée en incubant l'enzyme à différentes températures comprises entre 25°C et 60°C, avec des intervalles de

10°C pendant 1h. Après refroidissement des échantillons sur glace, l'activité résiduelle a été mesurée et exprimée en pourcentage par rapport à l'activité enzymatique mesurée dans des conditions optimales. (Kumar et al., 2017 ; Semache et al., 2021 ; Mohamed et al., 2021)

### 3.3.3.2 Stabilité de la lipase à différents pH

La stabilité au pH a été testée par incubation de l'enzyme pendant 1h dans des tampons 50 mM allant de pH 5,0 à 9,0 : tampon acétate de sodium (pH 5.0-5.5), tampon phosphate (pH 6.0-7.0), tampon Tris-HCl (pH 8.0-9.0) (annexe n°1). Les activités résiduelles (%) ont été déterminées en utilisant l'activité enzymatique mesurée dans les conditions optimales (Kumar et al., 2017 ; Semache et al., 2021 ; Mohamed et al., 2021).

### 3.3.3.3 Stabilité de la lipase en présence de différents agents chimiques

L'effet des agents chimiques sur la stabilité de la lipase a été évalué pendant 1 h. Des ions métalliques bivalents ( $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaSO}_4$ ),  $\text{Co}^{2+}$  ( $\text{CoSO}_4$ ),  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4$ ),  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4$ ),  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{MgSO}_4$ ),  $\text{Mn}^{2+}$  ( $\text{MnSO}_4$ ), et  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ) ont été testés à une concentration de 1 mM (Abol-Fotouh et al., 2021 ; Gaonkar et al., 2022), ainsi que des inhibiteurs et tensioactifs (EDTA à 5 mM, SDS à 5 %, Triton X-100 à 5 %) (Abol-Fotouh et al., 2021), des solvants organiques à 10 % (éthanol, méthanol, acétone, DMSO) (Priyanka et al., 2019). Les activités résiduelles (%) ont été déterminées relativement à l'activité enzymatique obtenue dans les conditions optimales, en l'absence de tout agent chimique.

### 3.3.3.4 Etude de la cinétique enzymatique

L'activité enzymatique a été déterminée selon la méthode décrite par Zhang et al. (2003) et Grudpan et al. (1999), avec modifications. Une série de dilutions du substrat d'huile d'olive à 10 % a été réalisée avec des concentrations de 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 1 %, 2 % et 10 %. Un volume de 1,8 ml a été prélevé de chaque concentration, auquel 100  $\mu\text{l}$  de lipase partiellement purifiée a été ajouté, puis incubé à 30 °C. Après 0, 1, 2, 3, 4 et 5 minutes, 100  $\mu\text{l}$  de chaque mélange réactionnel ont été prélevés, et 1 ml d'acide sulfurique à 0,1N et de permanganate de potassium à 0,02 N a été directement ajouté. Les mélanges ont été maintenus au bain-marie à 60 °C pendant 15 minutes, et l'absorbance a ensuite été mesurée à 525 nm. La concentration de glycérol libre a été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie avec une solution de glycérol à 1 M (annexe n°2). Les résultats obtenus ont été représentés selon les modèles de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk afin de déterminer les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$ .

### 3.3.4 Application biotechnologique

Les enzymes représentent une avancée majeure dans le développement de détergents plus performants. En particulier, les lipases d'origine microbienne se distinguent par leurs propriétés catalytiques et la diversité de leurs caractéristiques biochimiques. Leur intégration dans les formulations lessiviellles permet non seulement d'améliorer l'efficacité du nettoyage, mais également de favoriser des procédés plus durables, économiques et respectueux de l'environnement.

#### 3.3.4.1 Test de compatibilité et stabilité de lipase avec des détergents

Les détergents sélectionnés pour cette étude appartiennent à des marques couramment rencontrées sur le marché, dont certains sont solides (Bingo®, ISIS®, Test®) et d'autres liquides (Amir®, Brilex®, Liedy®). Les détergents solides (7 mg/mL) et liquides (10 % v/v) ont été préchauffés à 70 °C pendant 1h en vue d'inactiver les enzymes endogènes, notamment les lipases (Boran *et al.*, 2019 ; Ktata *el al.*, 2020 ; Semache *et al.*, 2021 ; Kherouf *et al.*, 2021). L'effet des détergents à lessive sur la compatibilité et la stabilité de la lipase AS12 a été étudié pendant 1 heure, en ajoutant 1 % de chaque solution de détergent au mélange réactionnel. (Kumar *et al.*, 2020). Les activités résiduelles (%) ont été calculées par rapport à l'activité mesurée dans des conditions optimales, sans ajout de détergent.

#### 3.3.4.2 Test performance de la lipase AS12 sur des taches de chocolat

L'utilisation potentielle de la lipase AS12 partiellement purifiée comme additif dans les formulations de détergents à lessive a été évaluée en fonction de sa capacité à éliminer les taches de chocolat sur des tissus en coton (4 cm × 4 cm). (Abol-Fotouh *et al.*, 2021 ; Akram *et al.*, 2024). Les morceaux de tissu souillés ont été incubés à 40 °C et agités à 140 rpm pendant 30 minutes dans des flacons Erlenmeyer de 250 mL contenant (figure 11) :

(1) : 100 ml d'eau du robinet (témoin)

(2) : 96 ml d'eau du robinet + 4 mL de détergent de test (inactivé par la chaleur) (10% (v/v)).

(3) : 96 ml d'eau du robinet + 2 mL de détergent de test (inactivé par la chaleur) (10% (v/v)) + 2 ml lipase (100 UI/mL).

Une fois le traitement terminé, les tissus ont été retirés, rincés à l'eau distillée, séchés, puis examinés visuellement (Kherouf *et al.*, 2021).



**Figure 11** : Test de lavage de tissu souillé au chocolat avec la lipase AS12 partiellement purifiée.

### 3.3.5 Détermination des acides gras libres (FFA)

Les acides gras libres contenus dans les substrats d'huiles végétales à analyser, à savoir l'huile d'olive, l'huile d'arachide, l'huile d'amande et l'huile de sésame, ont été déterminés par titrage avec une solution de NaOH à 0,1 N, en utilisant la phénolphthaléine comme indicateur. En général, les acides gras libres sont exprimés en fonction de l'indice d'acide, qui correspond au nombre de milligrammes de NaOH requis pour neutraliser les acides gras libres contenus dans 1 g de l'échantillon (Kumar *et al.*, 2017).

Un volume de 50 ml d'éthanol a été neutralisé avec une solution de NaOH à 0,1 N, en utilisant 0,5 ml de phénolphthaléine 1% comme indicateur. L'éthanol ainsi neutralisé a été ajouté à 10 g d'huile à analyser, puis homogénéisé par agitation jusqu'à ébullition. Le mélange a ensuite été titré avec une solution de NaOH à 0,1 N, en agitant vigoureusement jusqu'à l'observation d'une couleur rose persistante. Les acides gras libres (FFA) (en % acide oléique) présents dans différentes huiles ont été estimés en pourcentage à l'aide de la formule suivante (Eq. 8) (Kumar *et al.*, 2017 ; Boubakri *et al.*, 2022 ; Shiri *et al.*, 2023 ; Onwuachi-Iheagwara *et al.*, 2024) :

$$\% \text{ FFA} = \frac{28.2 \text{ NV}}{W} \times 100 \text{ (Eq. 8)}$$

V = volume de NaOH utilisé → V= (v-b), où : v = volume du titrant, b = volume du blanc  
N = normalité de NaOH ; W = poids de l'échantillon d'huile ; 28,2 = poids moléculaire de l'acide oléique.

## **Chapitre 4. Résultats et discussions**

## Chapitre 4. Résultats et discussions

### 4.1 Isolement, diversité des actinomycètes dans les sols arides et rhizosphériques

Le sol, milieu à la fois complexe, hétérogène et dynamique, favorise la formation de diverses microniches écologiques. La composition et la dynamique des communautés microbiennes telluriques sont influencées non seulement par les facteurs biotiques, mais également par différents paramètres abiotiques tels que la teneur en eau, le pH, la température et la richesse en matière organique. Ces facteurs sont susceptibles d'exercer un impact direct et/ou indirect sur l'abondance, la distribution, diversité et la production de métabolites par les microorganismes.

D'autre part, les actinomycètes occupent une place particulière dans les écosystèmes terrestres en raison de leur abondance, de leur diversité morphologique et métabolique, ainsi que de leur rôle écologique fondamental dans la décomposition de la matière organique et le recyclage des nutriments. Leur importance réside également dans leur potentiel biotechnologique, puisqu'ils représentent la principale source de métabolites secondaires bioactifs, notamment d'antibiotiques et d'enzymes. L'étude de leur diversité dans les sols arides et rhizosphériques permet de mettre en évidence des souches présentant un fort potentiel biotechnologique.

#### 4.1.1 Résultats

##### 4.1.1.1 Paramètres physico-chimiques des échantillons de sol

Les propriétés physico-chimiques du sol prélevé dans les régions d'étude sont présentées dans le tableau 7 ci-après. Ces résultats préliminaires fournissent des indications générales sur les caractéristiques édaphiques des sols selon les différentes zones d'échantillonnage. Les valeurs de pH indiquent globalement des conditions neutres à alcalines. Les sols prélevés à Naâma et à Aïn Séfra présentent des pH proches de la neutralité. En revanche, les sols de la rhizosphère des arbres à Saïda révèlent un caractère alcalin marqué, ainsi que le sol de Béchar se distingue par une forte alcalinité, avec un pH plus élevé. Une humidité plus élevée est observée dans les sols de Saïda par rapport aux échantillons des régions d'Aïn Séfra, de Naâma et de Béchar, dont les taux d'humidité sont considérablement plus faibles. Par ailleurs, la teneur en matière organique est relativement élevée dans les sols de Saïda, tandis que les sols de Naâma et d'Aïn Séfra présentent des teneurs nettement

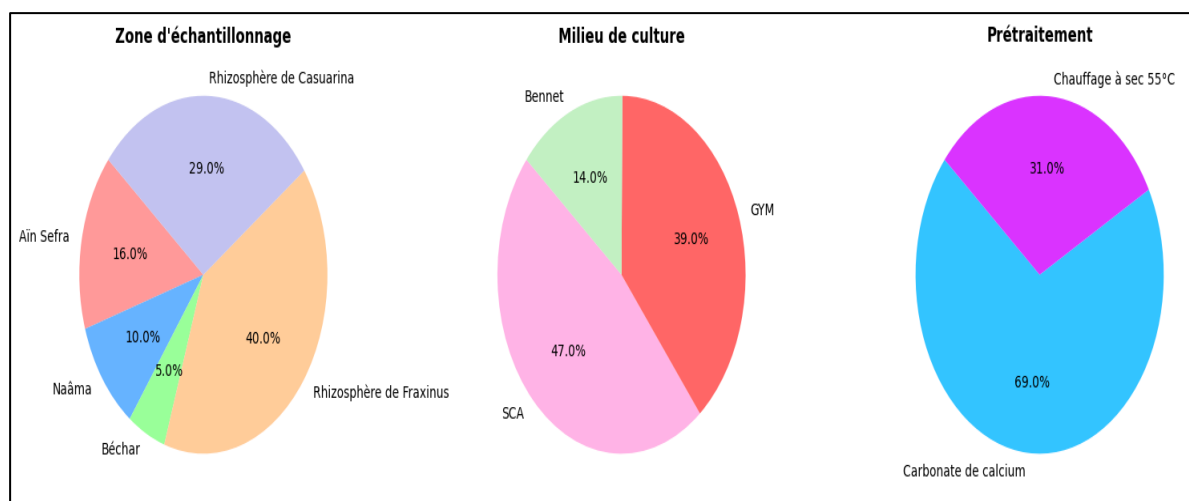
inférieures. Ces observations reflètent le profil édaphique caractéristique des régions arides et semi-arides, marqué par des teneurs réduites en eau et en matière organique.

**Tableau 7** : Analyse physico-chimiques des échantillons de sols

Région	Echantillon	pH	% d'humidité	% Matière organique
Saïda	FRP	8,25	12,74	8,67
Saïda	CEq	8,06	9,98	7,23
Naâma	NS	7,62	2,43	0,85
Aïn Sefra	AS	7,79	1,52	1,33
Béchar	BEC	9,30	1,89	0,42

#### 4.1.1.2 Isolement et abondance des actinomycètes

L'isolement des actinomycètes à partir des échantillons de sol a permis d'obtenir un total de 94 souches, en fonction de site de prélèvement, le milieu de culture et le prétraitement appliqué (figure 12). Les résultats indiquent que 40 % des isolats proviennent de la zone rhizosphérique de *Fraxinus excelsior*, représentant ainsi la proportion la plus élevée parmi les échantillons analysés. Parallèlement, 29 % des souches sont isolées de la rhizosphère de *Casuarina equisetifolia*, tandis que des proportions plus faibles d'isolats sont obtenues à partir des sols prélevés à Aïn Séfra (16 %), Naâma (10 %) et Béchar (5 %). Concernant les milieux de culture, le SCA se révèle le plus favorable à l'isolement des actinomycètes, avec un taux de récupération 47 %. Le milieu GYM facilite également un isolement significatif, représentant 39 % des isolats, tandis que le milieu Bennet présente un rendement inférieur, avec seulement 14 % des souches isolées. Enfin, le traitement au carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) appliqué aux sols rhizosphériques conduit à l'isolement de 69 % des souches, contre 31 % obtenues après chauffage à sec des échantillons provenant des régions arides. La variabilité observée dans le nombre et la distribution des souches isolées souligne l'effet combiné des facteurs édaphiques, des paramètres environnementaux et des conditions de culture sur le processus d'isolement.

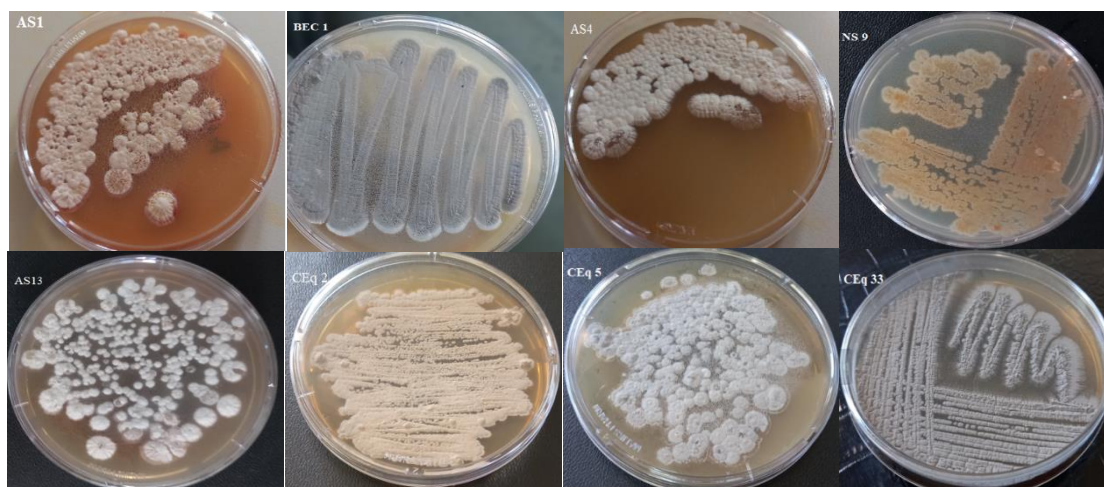


**Figure 12 :** Abondance relative des actinomycètes selon la zone d'échantillonnage, le milieu de culture et le prétraitement

### 4.1.1.3 Identification

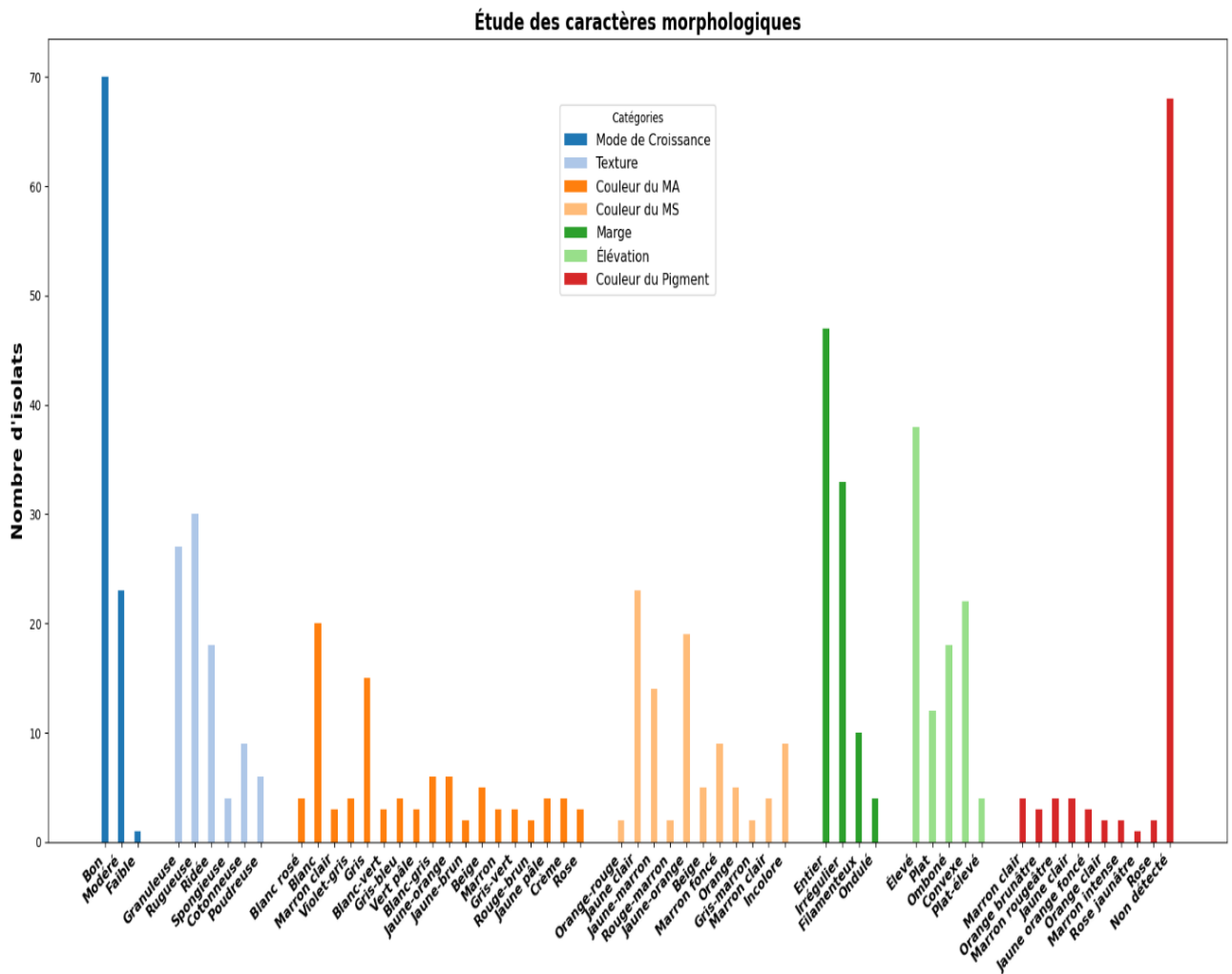
#### 4.1.1.3.1 Caractérisation morphologique des isolats

L'analyse morphologique des isolats repose sur un ensemble de critères à la fois macroscopiques (tels que l'aspect des colonies, la couleur des mycéliums et la production éventuelle de pigments diffusibles) et microscopiques (incluant la présence ou l'absence de fragmentation et de sporulation au niveau des mycéliums aérien et de substrat). L'observation phénotypique met en évidence une diversité remarquable parmi les 94 isolats d'actinomycètes, traduisant des variations notables dans les modes de croissance (figure 13 ). Ces résultats suggèrent que les isolats étudiés appartiennent à différents genres et espèces au sein du groupe des actinomycètes.



**Figure 13** : Morphotypes représentatifs des colonies d'actinomycètes isolées sur les milieux culture.

Les principaux critères macroscopiques des colonies d'actinomycètes isolées sur milieux gélosés (CYM, SCA, Bennet) sont illustrés dans la figure 14 ci-après. La majorité des souches présentent une croissance abondante (70), tandis que 23 des souches montrent un développement modéré, et qu'une seule souche manifeste une croissance faible. Le mycélium aérien se caractérise par des couleurs différentes, dominée par le blanc (20 isolats) et le gris (15 isolats), ainsi que par plusieurs couleurs intermédiaires telles que le beige, le jaune-orangé ou le rose pâle. Concernant le mycélium du substrat, les couleurs les plus fréquemment observées sont le jaune clair (23 isolats), le jaune-orangé (19 isolats) et le jaune brun (14 isolats). D'autres couleurs sont également notées, tandis que certains isolats développent un mycélium incolore (9 isolats). Les colonies présentent principalement une surface rugueuse (30 isolats), granuleuse (27 isolats) et ridée (18 isolats), tandis que les textures spongieuse, cotonneuse et poudreuse sont moins fréquemment observées. La forme des colonies est le plus souvent circulaire (47 isolats), suivie de contours irréguliers (33 isolats), filamenteux (10 isolats) et ondulés (4 isolats). Parallèlement, l'élévation se répartit entre des formes surélevées (38 isolats), convexes (22 isolats), ombiliquées (18 isolats), plates (12 isolats) et mixtes plate-surélevée (4 isolats). Enfin, seuls 26 des isolats produisent des pigments diffusibles, exprimant une gamme variée de couleurs, tandis qu'un nombre élevé d'isolats (68) ne présente aucune pigmentation détectable.



**Figure 14 :** Description macroscopique des colonies d’actinomycètes

Un aspect commun des actinomycètes (actinobactéries mycéliennes) est la formation d'un réseau complexe de filaments (hyphes), incluant un mycélium aérien et un mycélium de substrat bien ancrés dans le milieu de culture. Observation microscopique des structures mycéliennes ainsi que de la sporulation des souches étudiées, sans application d’une classification stricte, révèle que de nombreuses souches présentent un mycélium aérien abondant, bien ramifié, portant des spores en chaînes (au minimum trois éléments), ainsi que des spores isolées terminales. D’autres isolats montrent un développement du mycélium aérien modéré à faible, formant des filaments longs, parfois en zigzag. Certains isolats ne développent aucun mycélium aérien. En revanche, le mycélium du substrat est généralement non fragmenté et reste relativement intact chez plusieurs isolats. Toutefois certaines souches présentent une fragmentation marquée, prenant la forme de structures coccoïdes. Dans de rares cas, le mycélium du substrat est totalement absent.

#### 4.1.1.3.2 Caractérisation biochimique et physiologique d'isolat A12

L'étude présente la caractérisation de certaines propriétés physiologiques et biochimiques de l'isolat AS12, réalisée dans des conditions définies. L'ensemble des résultats mentionnés dans le tableau 8 indique que l'isolat AS12 se développe dans une gamme de températures comprise entre 25 °C et 50 °C, dans un intervalle de pH s'étendant de 5 à 9, ainsi qu'en présence de concentrations en NaCl allant de 2,5 % à 20 %. La souche présente également une capacité variable à utiliser différentes sources de carbone glucidiques. Une croissance marquée est observée avec le glucose, le lactose et le rhamnose (+++), modérée avec le maltose (++) , et faible avec le galactose, le mannose, le saccharose et l'arabinose (+). En revanche, aucune croissance n'est détectée en présence de fructose (-). Par ailleurs, l'isolat se caractérise par l'absence d'activités enzymatiques spécifiques (xylanase, cellulase, catalase, oxydase), ainsi que par l'absence de croissance sur le milieu au citrate de Simmons.

**Tableau 8 :** Propriétés physiologiques et biochimiques de l'isolat AS12

Caractéristiques	Résultat
<b>Croissance à températures variées</b>	
25°C	++
30°C	+++
35°C	+++
40°C	+++
45°C	+++
50°C	++
<b>Croissance à différent pH</b>	
3	-
4	-
5	+
6	++

7	+++
8	+++
9	++
10	++
<b>Tolérance à diverses concentrations de NaCl</b>	
2,5 %	+++
5 %	+++
10 %	++
20 %	+
25 %	-
50%	-
<b>Utilisation des sources de carbone glucidiques</b>	
D-glucose	+++
D-galactose	+
D-fructose	-
Maltose	++
D-mannose	+
D-saccharose	+
L-arabinose	+
Lactose	+++
Rhamnose	+++
Xylanes	-
Cellulase	-

<b>Oxydase</b>	-
<b>Catalase</b>	-
<b>Citrate de Simmons</b>	-
<b>Gram</b>	Positive

Note : Croissance ou production : +++ = bonne ; ++ = moyenne ; + = faible ; - = nulle

Les propriétés culturales de l'isolat AS12 sur différents milieux ISP sont détaillées dans le tableau 9. Une croissance abondante est observée sur les milieux ISP2 et ISP3, avec un mycélium aérien blanc verdâtre. Le mycélium du substrat apparaît jaune clair sur ISP2 et beige jaunâtre sur ISP3. En revanche, la croissance est réduite sur les milieux ISP4 et ISP5, caractérisée par un mycélium aérien vert clair. Le mycélium du substrat est beige pâle sur ISP4 et beige sur ISP5. Aucun pigment diffusible n'a été détecté sur l'ensemble des milieux testés.

**Tableau 9** : Caractéristiques culturales d'isolat AS12 sur différents milieux ISP

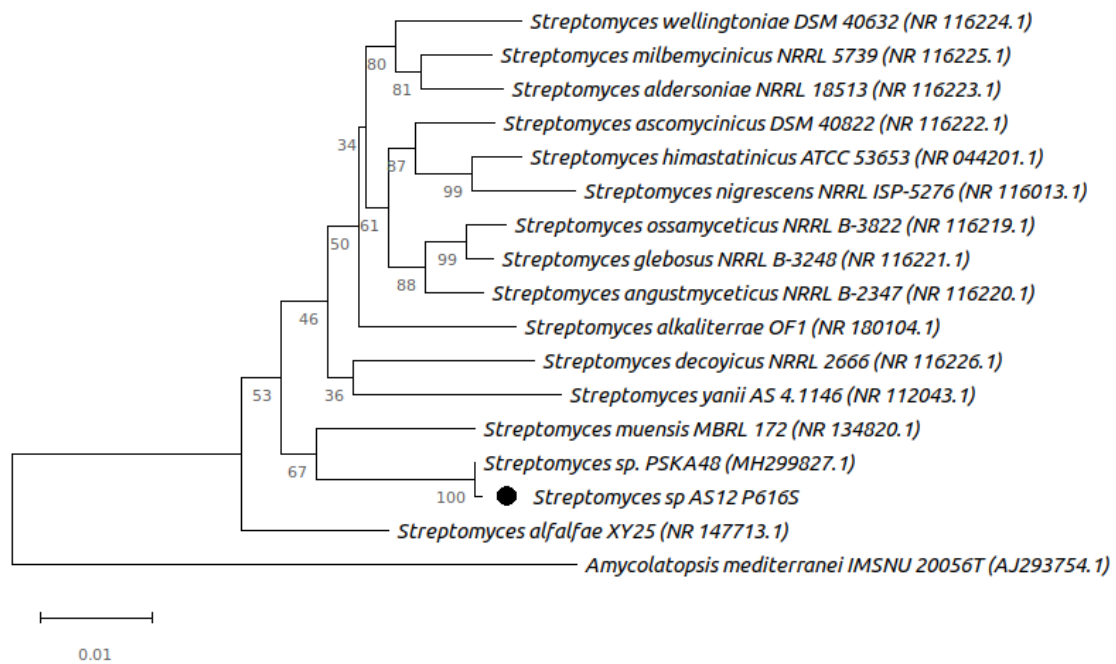
Milieux de culture	Croissance	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments diffusibles
ISP2	+++	Blanc verdâtre	Jaune clair	-
ISP3	+++	Blanc verdâtre	Beige jaunâtre	-
ISP4	++	Vert clair	Beige pâle	-
ISP5	++	Vert clair	Beige	-

Note : +++ = bonne ; ++ = moyenne ; + = faible ; - = nulle.

#### 4.1.1.3.3 Identification moléculaire de la souche AS12

Le séquençage de l'ARNr 16S est méthode fiable et largement utilisée pour l'identification des actinomycètes. Cette méthode implique l'amplification de l'ADN génomique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), suivie du séquençage des fragments amplifiés. Comme indique la figure, L'arbre phylogénétique de type *Neighbour-Joining* (figure 15), construit à partir des séquences quasi complètes du gène d'ARNr 16S, permet de déterminer la position taxonomique de la souche *Streptomyces AS12\_P616S*

(PP837824) au sein du genre *Streptomyces* et d'illustrer ses relations évolutives avec plusieurs espèces proches. La souche *Streptomyces* AS12\_P616S est étroitement apparentée à *Streptomyces* sp. PSKA48 (MH299827.1), avec une valeur de bootstrap de 100 %, indiquant une forte similarité génétique. Les autres espèces du genre forment des clades distincts, soulignant une diversité phylogénétique notable. La barre d'échelle, correspondant à 0,01 substitution nucléotidique pour 100 nucléotides, reflète les distances évolutives entre les espèces. L'utilisation de *Amycolatopsis mediterranei* comme groupe externe a permis d'ancrer l'arbre.



**Figure 15 :** Arbre phylogénétique de type Neighbour-joining basé sur des séquences de gènes d'ARNr 16S presque complètes montrant la relation entre la souche AS12\_P616S (PP837824) et les espèces du genre *Streptomyces*. Au niveau des points de branchement, les valeurs de « bootstrap » sont indiquées en pourcentage sur 1000 répliquats. La barre représente 1 substitution nucléotidique pour 100 nucléotides. *Amycolatopsis mediterranei* (AJ293754.1) a été utilisée en tant que groupe externe. Les numéros d'accès GenBank sont donnés entre parenthèses.

### 4.1.2 Discussion

Cette partie de l'étude décrit principalement l'abondance relative et la diversité des actinomycètes isolés à partir de sols collectés dans des zones arides (Naâma, Aïn Sefra et Béchar) et semi-arides (Saïda), situées dans l'ouest de l'Algérie.

Selon la classification climatique de Köppen-Geiger, l'Algérie se caractérise en grande majorité par un climat désertique (BWh, BWk), qui couvre environ 92 % de sa superficie totale, tandis que le climat semi-aride à aride (BSk et BSh) s'étend sur de vastes portions des hautes plaines et des hauts plateaux, représentant environ 7,8 % de la superficie du pays (**Bentekhici et al., 2019**). Les régions arides et semi-arides se distinguent généralement par précipitations faibles, des températures élevées et une forte évaporation. Les sols présentent une fertilité intrinsèquement faible, une disponibilité réduite en azote et en phosphore, une faible capacité de rétention en eau, un pH élevé, une faible teneur en matière organique (variant de 0,1 à 3 %), une faible profondeur, une d'humidité de type aridique ou xérique (**Hag Husein et al., 2021**). Dans ce cadre, La wilaya de Naâma, soumise à un climat aride et semi-aride, est marquée par une région aride couvrant 90 % de la superficie de son territoire (**Oubadi et Faci, 2024**). Les sols y sont généralement peu épais, présentent une faible teneur en matière organique (**Benaradj et al., 2021 ; Hafidha et al., 2024**). La zone d'Aïn Sefra également soumise climat semi-aride et aride, présente des sols globalement de faible qualité, tandis que ceux des hautes plaines se caractérisent par une faible profondeur, une fertilité réduite et une teneur en matière organique inférieure à 3 % (**Bouarfa et al., 2022**). En revanche, la zone de Béchar à un climat désertique chaud, de type BWh (Classification de Köppen) (**Oubadi et al., 2025**). Le faible taux d'humidité et la teneur réduite en matière organique des échantillons de sol analysés reflètent les conditions typiques environnements arides et semi-arides d'origine.

En fonction de site de prélèvement, le milieu de culture et le prétraitement appliqué, un total de 94 souches d'actinomycètes a été isolé dans le cadre de la recherche des enzymes à intérêt biotechnologique. D'un point de vue écologique, les actinomycètes sont largement répandus dans divers environnements, en particulier dans le sol (**Xie et al., 2022 ; Narsing Rao et Li, 2022 ; Meenaksh et al., 2024**), avec une abondance notable dans les couches superficielles, atteignant généralement de  $10^6$  à  $10^9$  cellules par gramme, cette densité étant fréquemment inversement corrélée à la profondeur (**Xie et al., 2022 ; Narsing Rao et Li, 2022**). Par ailleurs, les travaux de **Jose et al. (2021)** suggèrent que les sols terrestres

constituent la principale source de nouvelles espèces d'actinomycètes, suivis par les plantes. Ces travaux ont permis d'identifier 711 nouvelles espèces appartenant à 47 familles différentes. Ainsi que, l'émergence de nouvelles espèces d'actinomycètes dans le sol se poursuit (**Meenakshi et al., 2024**).

La disparité observée dans le nombre des souches d'actinomycètes isolées entre les échantillons peut être attribuée à une interaction complexe de facteurs abiotiques et biotiques influençant le processus d'isolement. En particulier, la localisation géographique et les conditions écologiques des régions, notamment les facteurs climatiques ainsi que les propriétés physico-chimiques des sols. À une échelle plus large, les facteurs climatiques influencent directement les propriétés du sol ainsi que la topographie. En effet, le climat joue un rôle prédominant dans le contrôle de l'humidité du sol en surface (SSM), un paramètre essentiel des processus fondamentaux à la surface terrestre. En revanche, la texture du sol devient particulièrement déterminante lors des périodes de sécheresse (**Rasheed et al., 2020**). L'humidité du sol est un facteur crucial pour le développement et le fonctionnement des microorganismes. Elle influence le taux de minéralisation, la mobilité des microorganismes, la diffusion des substances entre les cellules vivantes et les processus d'hydrolyse. Par ailleurs, l'humidité contrôle également la disponibilité des substrats et modifie les caractéristiques du sol. Ainsi, les niveaux d'humidité déterminent la composition et activité des populations microbiennes. Les microorganismes possèdent généralement une capacité d'adaptation efficace aux variations des niveaux d'eau. Toutefois, en conditions de faible humidité, l'activité microbienne est limitée, contraignant ces derniers à privilégier leur survie au détriment de leur multiplication (**Bogati et al., 2024**). Les actinomycètes se distinguent par leur aptitude élevée à s'adapter aux environnements défavorables, notamment grâce à la formation de spores résistantes à la dessiccation (**Radha et al., 2017 ; Shanthi, 2021**) et à la production de composés antimicrobiens (**Ouchari et al., 2019 ; Gohain et al., 2020 ; Arifiyanto et al., 2020 ; Kumar et al., 2021 ; Das et al., 2021 ; Selim et al., 2021 ; Ibnouf et al., 2022**). Les actinomycètes présentent une adaptation remarquable aux environnements arides et semi-arides, caractérisés par une faible teneur en humidité (**Nouraein et al., 2019**). Ces conditions favorisent leur développement ainsi que la germination de leurs spores (**Gohain et al., 2020 ; Xie et al., 2022 ; Ayoib et al., 2023**). Par ailleurs, la concurrence exercée par les microorganismes à croissance rapide y est limitée (**Ayoib et al., 2023**). Par conséquent, les actinomycètes se retrouvent généralement en très grand nombre dans les sols semi-arides, bien qu'un faible nombre soit également observé dans d'autres types de milieux.

En effet, ces microorganismes préfèrent généralement des niveaux d'humidité faibles pour leur croissance et leur survie, et sont particulièrement bien adaptés aux conditions semi-arides (Shanthi, 2021). Il est également indiqué que l'humidité du sol influence de manière significative l'abondance des actinomycètes (Meenaksh et al., 2024 ; Gitari et al., 2023). Ces derniers se développent principalement dans des sols à humidité modérée, tandis qu'un excès d'humidité tend à en réduire le nombre (Gitari et al., 2023). Par ailleurs, grâce à leurs hyphes (mycélium), les actinomycètes tolèrent mieux les conditions de sécheresse que les bactéries, ce qui leur permet d'accéder aux substrats même lorsque la teneur en eau du sol est faible. De plus, contrairement à d'autres micro-organismes, les actinomycètes contribuent à augmenter la rétention d'humidité dans le sol (Araujo et al., 2020). Comme l'indiquent les observations de Li, X et al. (2022) la température du sol favorise la croissance des actinomycètes, tandis que l'humidité du sol présente une corrélation négative avec leur développement. Étant des bactéries aérobies, une diminution de l'humidité du sol entraîne une augmentation de l'évaporation et une meilleure diffusion de l'oxygène dans sol, créant ainsi des conditions optimales pour leur prolifération. Les actinomycètes présentent une forte tolérance à la sécheresse et peuvent se développer dans des conditions arides. Par conséquent, l'abondance relative observée chez les actinomycètes durant le traitement de réduction de l'humidité pourrait s'expliquer par la robustesse de leur paroi cellulaire, leur capacité à produire des spores, ainsi que leur mode de croissance filamenteux, qui leur confèrent une protection efficace contre les dommages induits par la sécheresse et les températures élevées (Li, X et al., 2022). D'autre part, les actinomycètes réagissent également aux modifications des propriétés physico-chimiques du sol, notamment le pH, la concentration en matière organique et la disponibilité des éléments nutritifs. La matière organique constitue un facteur déterminant pour leur développement, car une teneur élevée stimule leur abondance en tant que leur principale source de carbone (Gitari et al., 2023). Les environnements arides et semi-arides se caractérisent par une faible teneur en matière organique dissoute (MOD), définie comme la fraction la plus mobile de la matière organique. La MOD joue un rôle essentiel en tant que source de carbone (C), d'azote (N), de phosphore (P) et d'énergie pour la communauté microbienne du sol (Cui et al., 2019 ; Huang et al., 2021). Certains micro-organismes sont incapables d'utiliser la matière organique disponible, soit en raison de leurs préférences métabolique spécifiques, soit lorsque la MOD est trop concentrée (Huang et al., 2021). Ces conditions confèrent un avantage compétitif aux espèces d'actinomycètes, en raison de leur structure de croissance filamenteuse, qui facilite un accès efficace aux nutriments, ainsi que de leur capacité à utiliser une large gamme de substrats, y compris la

matière organique complexe (**Kontro et Yaradoddi, 2022**). Des études rapportent que les sols relativement secs, riches en matière organique et présentant un pH neutre à alcalin sont particulièrement favorables à la croissance des actinomycètes (**Hungund et al., 2022**). Selon **Yaradoddi et al. (2022)**, les sols dont le pH est supérieur à 7, un nombre relativement élevé d'actinomycètes a été obtenu, notamment en milieu alcalin, par rapport aux conditions neutres. Dans les sols fortement alcalins (pH > 8), de nombreuses espèces d'actinobactéries ont été isolées sur un milieu de culture à pH 9, une valeur nettement supérieure aux milieux neutres et, plus encore, aux milieux acidifiés. Par ailleurs, la texture du sol exerce également une influence significative sur l'accumulation de la matière organique. Il a été constaté que les sols de texture loam sableux présentent une teneur en matière organique plus élevée que les sols sableux. L'argile et les particules fines de limon contribuent à la stabilisation de la matière organique. À l'inverse, les sols sableux, favorisent une décomposition plus rapide de la matière organique, limitant ainsi son accumulation (**Alsanad, 2024**). La distribution et l'abondance d'actinomycètes dans le sol peuvent être expliqués par divers facteurs importants, tels que la végétation, la température, le type et la texture du sol, la source de carbone organique et minéral, la salinité, l'aération, les interactions avec d'autres organismes, ainsi que les facteurs géogéniques (**Xie et al., 2022 ; Narsing Rao et Li, 2022 ; Hungund et al., 2022 ; Meenakshi et al., 2024**). Par ailleurs, au cours de l'hiver, la période durant laquelle les échantillons ont été prélevés, la population d'actinomycètes diminue jusqu'à environ 13 %, atteint près de 20 % au printemps, puis dépasse 30 % en automne (**Salwan et Sharma, 2020**). Exemple, Un total de 18 souches d'actinobactéries est obtenu à partir de 60 échantillons de sols secs collectés en Iran au cours de l'hiver et au début du printemps (**Majidzadeh et al., 2021**).

D'autre part, des études antérieures montrent que la zone rhizosphérique constitue une source importante pour la majorité des espèces d'actinomycètes, comparativement à d'autres habitats du sol (**Malisorn et al., 2020 ; Das et al., 2021 ; Silva et al., 2022 ; Narsing Rao et Li, 2022**). Il est également établi que les actinobactéries représentent les micro-organismes dominants dans la rhizosphère (**Putrie et al., 2020**). **Lee et Hwang (2002)** démontrent que les actinomycètes colonisent principalement les sols riches en matière organique, tandis que leur développement est favorisé dans des sols à faible teneur en humidité. (**Boukellou et al., 2023**). La rhizosphère constitue un environnement riche en nutriments, notamment en composés organiques provenant des exsudats racinaires (**Malisorn et al., 2020 ; Putrie et al., 2020 ; Smati et al., 2025**), des résidus végétaux et de l'accumulation de substances

essentielles telles que les acides aminés, acides gras, acides organiques, sucres et vitamines, qui favorisent la croissance des actinomycètes (Malisorn et al., 2020 ; Putrie et al., 2020). De plus, les bonnes conditions d'aération, d'humidité et de sécrétion de composés organiques dans la rhizosphère des arbres, en faisant un habitat favorable aux bactéries rhizosphériques (Wang et al., 2023). Divers genres d'actinomycètes, notamment *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora*, sont ubiquitaires dans la rhizosphère et possèdent la capacité d'utiliser des substrats issus de la décomposition de la biomasse végétale (Hungund et al., 2022). Par ailleurs, certaines études montrent que certains genres d'actinomycètes, tels que *Frankia* ainsi que certaines espèces de *Streptomyces* et *Micromonospora*, appelés actinomycètes diazotrophes, peuvent établir des relations symbiotiques avec les plantes actinorhiziennes et contribuer à la fixation biologique de l'azote (FBA) en formant des nodules sur leurs racines (Malisorn et al., 2020). Ainsi que, *Streptomyces* peut entretenir une relation symbiotique bénéfique avec les plantes, contribuant ainsi à leur nutrition, à leur santé et à leur vitalité (Pang et al., 2022 ; Donald et al., 2022). Les résultats de la présente étude concordent avec plusieurs autres recherches, indiquant clairement que les actinobactéries prospèrent dans la rhizosphère et se multiplient dans les sols riches en matière organique sous des conditions alcalines végétale (Hungund et al., 2022 ; Xie et al., 2022 ; Narsing Rao et Li, 2022). Diverses études précédentes révèlent la présence de souches d'actinomycètes dans la rhizosphère de *Casuarina equisetifolia* et *Fraxinus*. Par exemple, Vinod et al. (2014) ont isolé 23 souches d'actinobactéries à partir de la rhizosphère de *C. equisetifolia* exposée à des sels métalliques, confirmant ainsi la présence de ces microorganismes dans des conditions environnementales stressantes. De manière similaire, Wang et al. (2023) ont également mis en évidence une dominance des actinobactéries dans le sol rhizosphérique, *Casuarina equisetifolia* dans une forêt de brise-vent à Chihu Township, en Chine. Les échantillons prélevés sur des plantations successives (M1, M2, M3) ont révélé des proportions d'actinobactéries plus élevées variant de 56,02 % à 62,43 %. Le genre *Streptomyces* a représenté environ 2,6 % dans toutes les plantations, tandis que le genre *actinobacteria* non classifié a occupé des proportions élevées, allant de 11,86 % à 15,46 %. En revanche, l'étude de Lavania et al. (2022) a révélé une prédominance des actinobactéries dans les nodules racinaires de *C. equisetifolia* collectés dans différents écosystèmes en Inde (hypersalins, salins, estuariens et terrestres), avec une forte représentation des ordres *Frankiales*, *Streptomycetales* et *Micromonosporales* et des genres *Streptomyces*, *Frankia*, *Nocardia* et *Micromonosporales*. En plus, *Frankia* a été isolé chez plusieurs espèces de *Casuarina* (Djebaili, et al., 2020 ; Abo-El-Ghait et al., 2022). Ces observations soutiennent l'hypothèse

d'une association écologique spécifique entre *C. equisetifolia* et les actinomycètes, suggérant que la rhizosphère de cet arbre constitue une niche favorable à leur développement, indépendamment du contexte méthodologique des études, du type d'échantillon analysé, des conditions environnementales, ainsi que des spécificités liées au prélèvement et à l'isolement. Parallèlement, Les sols de la rhizosphère et les sols non rhizosphériques de *Fraxinus mandshurica* révèlent une dominance des actinobacteria, en particulier de la famille des Streptomycetaceae (Wei et al., 2020). Plusieurs études rapportent l'isolement d'actinomycètes à partir d'environnements variés, avec une prédominance marquée dans les sols rhizosphériques. Tels que, un total de 34 souches d'actinomycètes sont isolées à partir de différents environnements, dont la majorité (82 %) proviennent de sols rhizosphériques, suivies de 15 % issues de sédiments lacustres, et d'une faible proportion provenant de l'eau. Les isolats sont identifiés comme appartenant aux genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Saccharomonospora* (Salehghamar et al., 2023). Par ailleurs, 11 isolats d'actinomycètes ont été obtenus à partir des rhizosphères de quatre oliviers, parmi lesquels quatre souches ont été identifiées comme appartenant au genre *Streptomyces* (Dede et al., 2020). Un total de 72 souches d'actinobactéries ont été récupéré de sols rhizosphériques semi-arides associés à *Prunus domestica* L et *Pinus halepensis* Mill dans le nord-est de l'Algérie (Aouar et al., 2012). De plus, les résultats de cette étude concordent avec des travaux antérieurs, indiquant que, dans la rhizosphère, l'abondance et la diversité des actinomycètes sont fortement influencées par les espèces végétales à travers les exsudats racinaires et le type de sol (Talpur et al., 2020 Narsing Rao et Li, 2022 ; Mitra et al., 2022).

D'une autre perspective, de nombreuses études montrent que les milieux de culture ainsi que les méthodes de prétraitement influencent de manière significative le processus d'isolement des actinomycètes (Rathore et al., 2019 ; Balagurunathan et al., 2020).

L'application de méthodes de prétraitement est recommandée avant l'isolement des actinomycètes, en raison de leur croissance plus lente par rapport aux autres micro-organismes (Meenakshi et al., 2024). En conséquence, ces méthodes visent à favoriser la croissance des actinomycètes tout en inhibant ou éliminant la majorité des bactéries et champignons indésirables (Balagurunathan et al., 2020). Le traitement de l'échantillon au carbonate de calcium induit une dessiccation, entraînant une réduction significative des formes végétatives, Cela facilite ensuite l'isolement des actinomycètes (Pérez-Corral et al., 2022). Le chauffage à sec est également une méthode sélective et efficace pour éliminer les bactéries non sporulantes et inhiber la croissance de nombreuses bactéries et champignons sporulants, tout

en favorisant la croissance de certains actinomycètes (**Balagurunathan et al., 2020 ; Meenakshi et al., 2024**). Les spores des actinomycètes sont plus résistantes à la dessiccation que la plupart des bactéries, ainsi que la majorité des bactéries indésirables peuvent être éliminées en laissant simplement les échantillons de sol sécher à l'air à température ambiante (**Meenakshi et al., 2024**). De nombreuses actinomycètes produisent des spores résistantes à la chaleur, dont certaines peuvent être flagellées. Ces caractéristiques leur confèrent deux avantages écologiques majeurs : la persistance et une dispersion efficace. Les actinomycètes sont parmi les premiers micro-organismes à se rétablir rapidement après des périodes prolongées de sécheresse ou de chaleur et présentent une réponse rapide à la réhumidification du sol (**Araujo et al., 2020**). **Chakraborty et al. (2022)** indiquent que les spores d'actinomycètes présentent une résistance élevée à la dessiccation ainsi qu'une tolérance légèrement supérieure à la chaleur sèche ou humide comparativement à d'autres micro-organismes. Les résultats obtenus à partir des échantillons d'Aïn Sefra, Naâma et Béchar soumis à un chauffage à sec concordent avec ceux de l'étude de **Daigham et Mahfouz (2020)**, dans laquelle seulement six souches d'actinomycètes ont été isolées après un traitement thermique suivi de dilutions en série. Selon les études antérieures, divers milieux sont recommandés pour la culture et la sélection des espèces d'actinomycètes (**Sapkota et al., 2020**). Dans ce contexte, le SCA (Starch Casein Agar), le GYM (Glucose Yeast Extract Malt Extract Agar) et le milieu de Bennett sont fréquemment utilisés en raison de leur richesse nutritive et de leurs propriétés sélectives. Ces milieux contiennent de l'amidon et du glucose comme sources de carbone, de la caséine, du nitrate, de l'extrait de levure et de l'extrait de malt comme sources d'azote, ainsi que de la peptone comme source d'acides aminés et d'autres minéraux (**Ayoib et al., 2023**). De nombreuses études recommandent l'utilisation de milieux riches en carbone par rapport à l'azote, contenant également des sources complexes de ces éléments, telles que l'amidon, la caséine et l'extrait de levure, favorisant l'isolement des actinomycètes, en particulier du genre *Streptomyces* (**Sapkota et al., 2020 ; Ayoib et al., 2023 ; Smati et al., 2025**). Dans la présente étude, le nombre élevé d'isolats d'actinomycètes obtenu sur le milieu SCA corrobore les résultats de **Smati et al. (2025)**, qui ont signalé une prédominance d'actinomycètes issus de la rhizosphère de *Phoenix dactylifera* L. dans la région de Ghardaïa, isolés à l'aide du même milieu. De façon analogue, l'étude de **Sapkota et al. (2020)** a rapporté 41 isolats obtenus sur SCA, dont 29 appartenant au genre *Streptomyces*, 8 au genre *Nocardia* et 4 au genre *Micromonospora*. En outre, divers travaux rapportent que le milieu à base de caséine-amidon (Starch Casein Agar) est particulièrement adapté à

l'isolement des actinomycètes terrestres issus de divers types de sols (Naligama *et al.*, 2022 ; Meenakshi *et al.*, 2024).

Les actinomycètes se caractérisent par le développement de mycélium aérien et de substrat, ainsi que par leur capacité à former des spores et à produire des pigments (Jose *et al.*, 2021 ; Olanrewaju et Babalola, 2019). Ces caractéristiques morphologiques jouent un rôle essentiel dans l'identification et la taxonomie des espèces (Xie *et al.*, 2019 ; Hazarika et Thakur, 2020). Les résultats des études précédentes ont rapporté l'isolement de diverses espèces d'actinomycètes présentant des morphologies variées (Tam *et al.*, 2019 ; Singh *et al.*, 2019 ; Maiti *et al.*, 2019 ; Rozirwan *et al.*, 2020 ; Momin *et al.*, 2020 ; Sapkota *et al.*, 2020), ce qui indique une forte similitude avec les résultats obtenus dans la présente étude. Les actinomycètes se distinguent par leur capacité à produire une diversité de pigments sur des milieux de culture naturels ou synthétiques. Ces pigments sont généralement de couleur bleue, violette, rouge, rose, jaune, verte, brune ou noire. Ils peuvent soit se diffuser dans le milieu de culture, soit rester retenus au sein du mycélium. L'aptitude des actinomycètes à produire des pigments dépend de diverses conditions nutritionnelles et de culture, au point qu'elle peut être considérablement augmentée ou entièrement perdue (Selim *et al.*, 2021). En outre, la production de pigments est également influencée par des facteurs chimiques, physiques et physiologiques, tels que les conditions anaérobies et les basses températures (Fernandes *et al.*, 2021).

Les streptomycètes sont omniprésents dans les environnements terrestres et marins, présentant une diversité particulièrement élevée dans les habitats terrestres. Environ 39 % des actinobacteria sont identifiés comme sources de nouveaux produits naturels, dont près de 80 % proviennent du genre *Streptomyces* (Donald *et al.*, 2022). Par ailleurs, le genre *Streptomyces* constitue le taxon le plus vaste parmi les procaryotes (Komaki, 2023) ; il s'agit également de l'un des genres les plus fréquemment isolés et les plus étudiés (Olanrewaju et Babalola, 2019 ; Huang *et al.*, 2021 ; Kontro et Yaradodd, 2022 ; Komaki, 2023), pour la recherche de nouvelles substances bioactives, en raison de son importance en tant que source prometteuse de métabolites secondaires d'intérêt commercial, médical (Komaki, 2023) et les enzymes (Nazari *et al.*, 2022).

Concernant, l'identification de la souche AS12, les paramètres biochimiques, physiologiques et morphologiques sélectionnés font partie des critères fondamentaux couramment utilisés dans les études sur les actinomycètes (Salwan et Sharma, 2020 ; Silva

et *al.*, 2022 ; Nazari et *al.*, 2022 ; Salem et *al.*, 2023 ; Komaki, 2023). Malgré les avancées notables résultant de l'application d'approches taxonomiques polyphasiques (Combinaison de méthodes phénotypiques, chimiotaxonomiques et génotypiques), la résolution taxonomique du phylum actinobacteria demeure problématique pour certains genres, en particulier *Streptomyces*, pour lesquels le gène 16S rRNA et les caractères phénotypiques se révèlent parfois insuffisants pour la description de nouvelles espèces. Les méthodes phénotypiques utilisées dans l'analyse taxonomique incluent l'étude de la morphologie, des propriétés antigéniques, de la plage de croissance, des capacités métaboliques, du potentiel pathogène et des caractéristiques écologiques des micro-organismes (Subathra Devi et *al.*, 2022).

#### 4.1.3 Conclusion

L'isolement des actinomycètes à partir des échantillons de sol est fortement influencé par un ensemble d'interactions complexes entre les facteurs environnementaux (pH, humidité, teneur en matière organique) et les conditions expérimentales mises en œuvre (milieux de culture, prétraitements). Les actinomycètes sont plus abondants dans les sols rhizosphériques, où l'humidité et la matière organique favorisent leur développement. À l'inverse, les sols arides, pauvres en matière organique, présentent un nombre de souches nettement plus faible. L'utilisation du milieu SCA et le prétraitement au CaCO<sub>3</sub> améliorent significativement le rendement d'isolement. Par ailleurs, L'analyse morphologique révèle une hétérogénéité phénotypique marquée traduisant une diversité morphologique significative au sein des isolats. Toutefois, la distinction taxonomique précise entre genres demeure limitée en raison de la similarité des caractères morphologiques et de leur variabilité en fonction des conditions de culture. Ainsi, bien que les observations microscopiques confirment l'appartenance des isolats au groupe des actinomycètes, leur identification taxonomique fiable requiert une approche polyphasique intégrant des outils complémentaires, notamment la chimiotaxonomie et l'identification moléculaire (séquençage du gène 16S rRNA).

#### 4.2 Criblage enzymatique et sélection des isolats d'actinomycètes

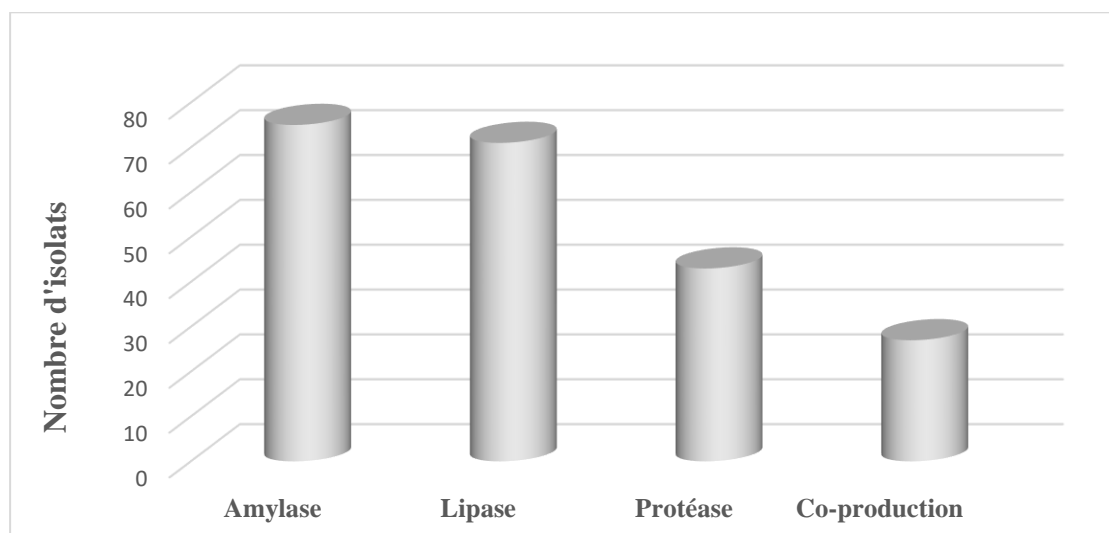
L'étude du potentiel enzymatique des actinomycètes constitue un axe majeur de la biotechnologie, en raison de leur aptitude à produire un large éventail d'enzymes extracellulaires d'intérêt industriel et environnemental. Ces micro-organismes, abondamment présents dans les sols, participent non seulement aux cycles biogéochimiques, mais représentent également une ressource stratégique pour la découverte de nouveaux biocatalyseurs.

Le criblage enzymatique, étape préliminaire et déterminante, permet d'identifier les isolats les plus prometteurs en évaluant leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques telles que les amylases, lipases et protéases. Ce chapitre présente les résultats obtenus lors du criblage primaire des isolats étudiés, ainsi que la production de lipase en fermentation submergée par la souche sélectionnée.

#### 4.2.1 Résultats

##### 4.2.1.1 Criblage primaire de la production d'enzymes extracellulaires

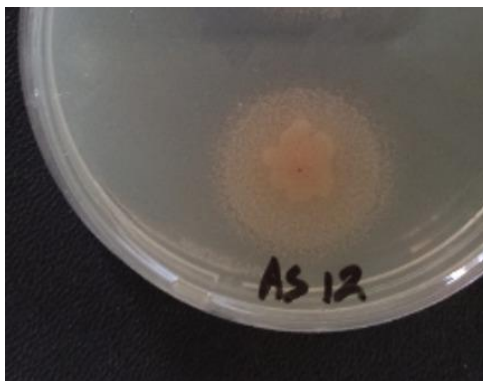
Un total de 94 isolats d'actinomycètes a été soumis à un criblage primaire des activités protéolytique, lipasique et amylolytique sur des milieux solides contenant respectivement la caséine, le tween 80 et l'amidon comme sources uniques de carbone. Les résultats obtenus, illustrés dans (figure 16), ont montré que l'amylase a été l'enzyme la plus fréquemment produite, avec 75 isolats présentant une activité positive, suivie de la lipase (71 isolats) et de la protéase (43 isolats), tandis que 27 isolats ont présenté une coproduction de trois enzymes. Les diamètres des zones d'hydrolyse observées autour des colonies ont varié de 5 à 33 mm pour l'amylase, de 21 à 40 mm pour la lipase et de 9 à 31 mm pour la protéase (annexe n°2).



**Figure 16** : Nombre d'isolats d'actinomycètes producteurs d'amylase, de lipase et de protéase détectés lors du criblage primaire.

#### 4.2.1.2 Production de lipase AS 12 par fermentation submergée

La lipase a été produite par fermentation submergée sous agitation. La souche AS 12 sélectionnée lors d'un criblage qualitatif (figure 17), a été cultivée dans un milieu contenant du tween 80 comme inducteur, à pH 6,7, sous agitation orbitale à 140 rpm, à 30 °C pendant 48 heures. L'activité lipolytique de l'extrait enzymatique brut, déterminée par titrage des acides gras libres, a atteint  $70 \pm 2,6$  U/mL.



**Figure 17** : Zone d'hydrolyse de la souche AS12 sur gélose au Tween 80 (1 %).

#### 4.2.2 Discussion

Les micro-organismes, largement répandus dans la nature, représentent environ 60 % de la biomasse terrestre totale (Thapa et al., 2019). Le sol regroupe une grande diversité de micro-organismes essentiels au cycle des nutriments, à la décomposition de la matière organique et à la santé des plantes. Parmi ces micro-organismes, les actinomycètes occupent une place particulière en raison de leur capacité à produire des composés bioactifs, tels que des antibiotiques et des enzymes, qui influencent la fertilité des sols et le fonctionnement des écosystèmes. Ils contribuent également au recyclage des nutriments et à la suppression des maladies (Innocent et al., 2024).

En générale, les actinobactéries, organismes saprotrophes, dégradent la biomasse végétale grâce à leur réservoir d'enzymes lytiques et jouent un rôle clé dans le cycle du carbone (Salwan et Sharma, 2019), leur abondance s'explique également par leur capacité à produire un large éventail d'enzymes hydrolytiques extracellulaires, responsables de la dégradation des biomasses animale et végétale, et conférant ainsi à ces micro-organismes un rôle essentiel dans le cycle du carbone (Boubekri et al., 2022). L'aptitude des actinobactéries à synthétiser enzymes hydrolytiques extracellulaires provient du processus de sélection naturelle des microorganismes, par lequel elles s'adaptent et assurent leur survie dans des

environnements compétitifs (**Balagurunathan et al., 2020**). Dans des travaux antérieurs, plusieurs chercheurs ont démontré que les actinomycètes présents dans le sol possèdent une capacité particulièrement élevée à produire diverses enzymes impliquées dans la dégradation de la matière organique (**Sarkar et Suthindhiran, 2020 ; Hassan et Mahmoud, 2022**). Il a également été montré que, malgré leur croissance plus lente que celle des bactéries et des champignons, les actinomycètes dégradent efficacement des composés organiques difficiles à décomposer et sécrètent, lors de ce processus, des pigments brun foncé modifiant la couleur de l'humus du sol (**Das et al., 2021**). Les enzymes hydrolytiques produites par les actinomycètes jouent un rôle important dans la fertilité du sol, en décomposant les polysaccharides et les protéines complexes en composés plus simples (**Kumari et al., 2019**). Par ailleurs, de nombreuses enzymes d'intérêt industriel notamment les cellulases, protéases, lipases, xylanases, pectinases, amylases, phytases, kératinases, glucose oxydases et chitinases ont été rapportées chez divers genres d'actinobactéries (**Ruwandepika et al., 2022**). Les actinomycètes possèdent diverses enzymes actives capables de catalyser différentes réactions biochimiques avec de nouvelles enzymes. Les espèces de *Streptomyces*, qui produisent des enzymes importantes telles que l'amylase, la protéase et la cellulase, largement utilisées dans plusieurs industries (**Selim et al., 2021**). *Streptomyces*, l'un des genres d'actinobactéries les plus étudiés, constitue un important producteur d'enzymes lytiques variées, qui contribuent à ses propriétés antagonistes vis-à-vis des agents phytopathogènes (**Salwan et Sharma, 2019**).

Dans les sols, les enzymes microbiennes jouent des rôles multiples dans le soutien de la végétation verte, en participant aux cycles biogéochimiques des nutriments, à la résistance aux maladies et à la biocontrôle, ainsi qu'à la décomposition de la matière organique. Certaines enzymes lytiques extracellulaires dégradant la paroi cellulaire, telles que les cellulases, les chitinases, les glucanases et les protéases, ont été rapportées comme jouant un rôle important en tant qu'agents de biocontrôle. De même, l'activité termiticides des chitinases, lipases et protéases a été signalée par Rakshiya et al. (2016) (**Innocent et al., 2024**).

Aujourd'hui, les enzymes sont largement utilisées dans de nombreuses industries biotechnologiques. Leur emploi a ouvert la voie au développement de procédés verts, modernes et durables, grâce à leur spécificité exceptionnelle, à leurs conditions réactionnelles, à leur rentabilité, à leur simplicité et à leur performance énergétique. Environ 75 % du marché industriel des enzymes est constitué d'enzymes hydrolytiques, telles que les lipases, protéases et amylases, qui sont principalement utilisées dans les secteurs des détergents (37 %), du

textile (12 %), de l'amidon (11 %), de la boulangerie (8 %) et de l'alimentation animale (6 %) (Naveed *et al.*, 2021).

Le criblage des micro-organismes constitue une étape déterminante dans la sélection de souches d'intérêt industriel. Ce processus vise à identifier des souches à haut rendement, assurant une production de qualité, stable et durable. La sélection repose principalement sur des méthodes classiques permettant d'isoler les micro-organismes capables de produire le métabolite recherché. Par ailleurs, la souche peut également être améliorée par mutagenèse classique, par des méthodes de génie moléculaire ou encore par la modulation des voies métaboliques (Agrawal, 2024). Dans ce cadre, diverses stratégies ont été développées pour le criblage de micro-organismes producteurs d'enzymes d'intérêt industriel, reposant sur l'utilisation de milieux solides ou liquides enrichis en substrats spécifiques. Ces méthodes visent à détecter, de manière qualitative, l'activité enzymatique extracellulaire à travers la formation de zones d'hydrolyse caractéristiques autour des colonies. Concernant les lipases, le criblage repose généralement sur des milieux solides ou liquides enrichis en substrats lipidiques. Les méthodes qualitatives directes sur gélose, reposant sur des substrats spécifiques ou des colorants indicateurs, sont largement employées pour une détection préliminaire rapide de l'activité lipolytique. Les tests de diffusion en gel, par exemple, révèlent cette activité par la formation de zones claires autour des colonies, résultant de l'hydrolyse des lipides (Bharathiet *et al.*, 2019 ; Yao *et al.*, 2021). Les tests à base de tween 80 constituent, en particulier, une méthode simple et efficace pour le criblage initial des producteurs de lipases, en mesurant les zones d'hydrolyse formées autour des colonies microbiennes (Pham *et al.*, 2021). L'hydrolyse du Tween par la lipase microbienne conduit, lors de la libération des acides gras, à la formation de sels calciques (Ayuningrum *et al.*, 2022). De manière similaire, le criblage primaire des protéases consiste à détecter l'activité enzymatique par l'observation de halos clairs autour des colonies sur des milieux solides contenant des substrats protéiques, tels que le lait écrémé, la caséine, la gélatine, l'albumine sérique bovine ou la kératine. Ces halos indiquent production extracellulaire des protéines par les micro-organismes (Song *et al.*, 2023). Parallèlement, pour les amylases, le criblage repose largement sur l'utilisation de l'agar-amidon. Après incubation, l'hydrolyse de l'amidon est révélée par l'absence de coloration bleu-noir à l'addition de la solution d'iode (Pranay *et al.*, 2019 ; Yassin *et al.*, 2021).

La fréquence élevée de l'activité lipolytique observée chez les isolats de la présente étude s'accorde avec les résultats antérieurs relatives à la production de lipases par les

actinomycètes. Trente-deux actinomycètes ont été isolés, comprenant *Streptomyces* (21), *Actinomadura* (2), *Nocardia* (3), *Nocardiopsis* (3) et *Streptosporangium* (3), dont 24 ont présenté une activité lipasique positive (**Khirennas et al., 2023**). Dix souches appartenant à *Streptomyces* (7), *Gordonia* (2) et *Micromonospora* (1) ont été testées à l'aide du Tween 80, seulement 9 ont montré des résultats positifs (**Welz et al., 2021**). Sur 7 isolats d'actinomycètes obtenus dans cette étude, 5 souches à forte activité lipolytique ont été identifiées comme appartenant à *Nocardiopsis* (1) et *Streptomyces* (4) (**Patel et al., 2021**). Par ailleurs, L'identification d'une souche lipolytique de *Streptomyces caelestis* rapportée par **Patel et al. (2021)** corrobore les résultats obtenus dans la présente étude. Parmi les actinobactéries productrices de lipases, le genre le plus étudié est *Streptomyces* sp. Toutefois, d'autres genres, tels que *Micromonospora*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Corynebacterium*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, *Nocardia*, *Elytrosporangium* et *Actinopolyspora*, représentent également des alternatives d'intérêt (**Pizarro et al., 2022**). En effet, les lipases ont été initialement identifiées dans le genre *Streptomyces* (**Ruwandeeepika et al., 2022**). Dans les sols, les bactéries constituent la population microbienne la plus abondante, suivies des actinomycètes et des champignons. Toutefois, parmi les micro-organismes producteurs de lipases, les fréquences relatives observées sont de 8,5 % pour les bactéries, 55,9 % pour les actinomycètes et 23,3 % pour les champignons. Bien que l'activité lipolytique des *Streptomyces* ait été relativement peu étudiée, malgré leur large utilisation dans la production d'antibiotiques, une activité lipasique a néanmoins été mise en évidence. La production de lipases a été examinée chez un vaste ensemble de streptomycètes ; toutefois, cette activité n'a été observée que chez un nombre restreint de souches testées (**Suneetha et al., 2010**)

Plusieurs études ont rapporté également la production de protéases par des actinomycètes appartenant notamment aux genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Nocardiopsis*. Plus de 48 souches d'actinomycètes du sol ont été identifiées comme productrices de protéases (**Mehnaz et al., 2017**). Ainsi que, 11 souches halophiles et alcalinophiles ont été identifiées parmi les 37 souches d'actinomycètes isolées. Les souches GS-1 et GS-9 ont révélé les plus larges zones de clarification sur gélose au lait écrémé, mesurant respectivement 3,7 cm et 3,5 cm (**Sarkar et Suthindhiran, 2020**). Certaines protéases microbiennes peuvent éliminer les débris présents sur les lentilles de contact et le film lacrymal, rendant ainsi ces produits de nettoyage inodores et sûrs. Par exemple, les protéases provenant de *Streptomyces* sp. ne provoquent ni réactions allergiques ni irritations oculaires (**Song et al., 2023**).

Relativement à la détection des amylases chez les actinomycètes, il a été rapporté que 38 isolats d'actinomycètes ont montré une activité amylolytique, avec des halos de dégradation de l'amidon variant de 6,20 à 43,72 mm (**Ayuningrum et Jati, 2021**), tandis que, parmi 17 souches criblées sur gélose à l'amidon, neuf se sont révélées positives, la souche Al-Dhabi-46 produisant la plus grande zone d'hydrolyse (19 mm) (**Al-Dhabi et al., 2020**).

En outre, divers travaux antérieurs ont mis en évidence la capacité des actinomycètes à produire ces enzymes. Par exemples, parmi les 34 isolats d'actinomycètes, 53 %, 50 % et 44 % ont respectivement produit de l'amylase, de la lipase et de la protéase, ces enzymes extracellulaires étant les plus fréquemment sécrétées. Notamment, l'isolat ACT26 a démontré la capacité de produire les trois enzymes (**Salehghamari et al., 2023**). De même, sur un total de 25 isolats testés, cinq ont présenté les activités les plus élevées de protéase, d'amylase et de lipase (**Swarna et Gnanadoss, 2020**). Par ailleurs, l'étude de 47 isolats d'actinomycètes thermophiles a révélé que sept souches ont présenté une activité protéolytique, avec des halos d'hydrolyse de la gélatine variant de 10 à 29 mm ; cinq souches ont montré une activité amylolytique, avec des zones de dégradation de l'amidon allant de 13 à 25 mm ; tandis que six souches ont manifesté une activité lipolytique, produisant des halos d'hydrolyse du Tween 80 compris entre 8 et 25 mm (**Do et al., 2021**). De plus, 8 souches d'actinomycètes rares ont été isolées à partir d'échantillons environnementaux prélevés dans le lac Fetzara. Parmi ces isolats, quatre ont exprimé une activité amylosique, trois ont manifesté une activité protéasique, tandis que six ont été capables de produire de la lipase (**Benhadj et al., 2019**). Ainsi que, 34 isolats d'actinobactéries ont été obtenus à partir des sols rhizosphériques de *F. deltoidea*. Tous ont produit de l'amylase, tandis que 32 ont également produit de la protéase. 11 souches ont présenté un potentiel enzymatique élevé, avec des diamètres de zones claires variant de 11,0 à 28,5 mm pour l'amylase et de 12,5 à 26,5 mm pour la protéase (**JANATININGRUM et LESTARI, 2022**). De plus, 34 isolats de *Streptomyces*, 74,40 % ont présenté une activité lipasique et 67,45 % une activité amylosique (**Saadoun et al., 2023**). Enfin, parmi les 40 isolats actinomycètes testés, 15 (37,5 %) ont révélé une activité protéolytique sur milieu au lait écrémé. En revanche, 20 isolats sur (50 %) ont exprimé une activité lipolytique en présence de Tween 80 et 20 (**Ayuningrum et al., 2022**).

La majorité des lipases microbiennes sont des enzymes extracellulaires, sécrétées dans le milieu de production. La fermentation submergée (SmF), une méthode quantitative en milieu liquide, est couramment utilisée pour la production de lipases. De plus, le processus de récupération et de purification des lipases produites par SmF est relativement simple

(Bharathi et Rajalakshmi, 2019 ; Yao et al., 2021). Ce processus est également facilité par la nature extracellulaire de l'enzyme (Ali et al., 2023). Plus de 75 % de la production d'enzymes industrielles est réalisée par la fermentation en milieu submergé (SmF) (Hermansyah et al., 2019 ; Alabdall et al., 2020). Cette méthode présente plusieurs avantages par rapport à la fermentation en milieu solide (SSF), tels que la facilité de récupération de la lipase à grande échelle, ainsi que la possibilité de contrôler les facteurs influençant la production (Alabdall et al., 2020). La production de lipase en milieu submergé (SmF) chez différentes souches de *Streptomyces* a été rapportée dans une plage comprise entre  $29,62 \pm 2,3$  et  $69,42 \pm 1,8$  U/mL, avec notamment  $63,77 \pm 1,9$  U/mL pour la souche LCJ11A et  $69,42 \pm 1,8$  U/mL pour LCJ16A (Swarna et Gnanadoss, 2020). De plus, un ensemble de 11 souches a montré des activités enzymatiques variant de 60 à 108 U/mL, parmi lesquelles A3802 et A3803 (80 U/mL) ainsi que AS3105 (60 U/mL) (Panyachanakul et al., 2020). Chez *Aspergillus niger* MH057541.1, une activité de 86,92 U/mL a également été indiquée (Alabdall et al., 2020). Ces valeurs sont comparables à celle obtenue pour la souche AS12 dans la présente étude (70 U/mL). À l'inverse, des activités inférieures ont été signalées, telles que 1,5 à 6,9 IU/mL chez 20 isolats d'actinomycètes étudiés par Aly et al. (2012), ou 7,5 U/mL pour *Streptomyces* sp. SBLWN\_MH2 (Mohamed et Awad, 2021). Dans ce contexte, l'activité enregistrée dans cette étude souligne le potentiel prometteur de l'isolat étudié.

Dans les industries, les principales enzymes utilisées appartiennent aux groupes des protéases, des carbohydrases (dont l'amylase) et des lipases (Ahmad et al., 2019).

Les lipases d'origine microbienne présentent des propriétés physicochimiques et biologiques particulières qui en font des biocatalyseurs majeurs, constituant des alternatives efficaces aux méthodes organiques classiques pour la transformation sélective de molécules complexes dans divers secteurs industriels (Abdelaziz et al., 2025). De nombreuses études ont montré que la production de lipases par les actinomycètes présente un fort potentiel biotechnologique, avec des applications dans différents domaines, tels que l'énergie, l'environnement et les matériaux polymériques. Sur le plan énergétique, l'activité lipasique a notamment été exploitée comme biocatalyseur dans la production de biodiesel (Zulaika et al., 2021). Dans une perspective environnementale, plusieurs travaux ont mis en évidence l'intérêt de ces enzymes pour le traitement des effluents, par l'isolement et l'optimisation de souches halo-alcalines productrices de lipases (Mohamed et Awad, 2021), ainsi que par l'utilisation de *Nocardopsis* lipolytique afin de réduire la charge polluante des rejets textiles

(Patel *et al.*, 2021). Enfin, dans le domaine des matériaux polymériques, certaines recherches se sont orientées vers des applications innovantes, telles que la caractérisation d'une lipase thermo-solvant tolérante impliquée dans la re-polymérisation du poly(acide lactique) (Panyachanakul *et al.*, 2020), ou l'exploitation de souches de *Streptomyces* pour la production d'enzymes capables de dégrader ce polymère, confirmée par des analyses génomiques et l'optimisation des procédés (Parwez *et al.*, 2025 ; Sujarit *et al.*, 2025).

D'une part, l'amylase représente environ 25 % à 30% du marché mondial des enzymes. Les actinomycètes constituent l'un des groupes bactériens majeurs producteurs d'amylases. Ces dernières années, les chercheurs ont mis en évidence que le genre *Streptomyces* produit des enzymes d'importance industrielle à partir de divers environnements, y compris extrêmophiles. (Ramos Neyra *et al.*, 2025). La majorité des amylases d'intérêt industriel proviennent du phylum des actinobacteria, en particulier des genres *Streptomyces* et *Nocardia*, incluant notamment *Streptomyces hygroscopicus*, *S. limosus*, *S. praecox*, *S. erumpens*, *Nocardiopsis* spp., *Thermomonospora curvata* et *Thermobifida fusca* (Ruwandeeepika *et al.*, 2022). Les amylases issues de *Streptomyces* spp. sont largement exploitées en biotechnologie, tandis que celles de souches d'Actinomycètes alcaliphiles sont utilisées dans les formulations de détergents pour renforcer l'efficacité nettoyante (Mehnaz *et al.*, 2017). Un intérêt biotechnologique marqué des actinomycètes pour la production d'amylases a été confirmé par plusieurs travaux récents. Par exemple, Al-Dhabi *et al.* (2020) ont isolé et purifié une amylase hydrolysant l'amidon produite par *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46, démontrant son potentiel dans diverses applications industrielles. De leur côté, El-Sayed *et al.* (2024) ont caractérisé la production d'amylase thermophile par des actinomycètes cultivés sur des agro-déchets, en mettant en évidence son utilisation possible dans la fermentation éthanolique. Enfin, Rathore *et Singh* (2021) ont étudié la cinétique de croissance d'une souche marine, *Streptomyces lopnurensis* KaM5, révélant la co-production d'amylase et de protéase, ce qui illustre la polyvalence métabolique et l'intérêt industriel de ces micro-organismes.

En revanche, Près de 40 % du marché mondial des enzymes est constitué de protéases issues de sources microbiennes (Naveed *et al.*, 2021). Les protéases d'origine microbienne sont reconnues comme les enzymes hydrolytiques majeures, tandis que les protéases alcalines figurent parmi les plus recherchées sur le marché des enzymes. Des protéases ont été produites avec succès par des chercheurs à partir de différentes sources microbiennes. Les microorganismes représentent environ les deux tiers de la production commerciale de protéases dans le monde. Depuis l'avènement de l'enzymologie, les protéases microbiennes à

activité protéolytique constituent les enzymes les plus étudiées. Elles présentent un intérêt majeur non seulement en raison de leur rôle essentiel dans les activités métaboliques, mais également en raison de leur large utilisation dans divers secteurs industriels. (**Razzaq et al., 2019**). Les actinomycètes constituent une source prometteuse de protéases alcalines aux applications industrielles variées, par exemple dans le domaine du tannage et du traitement des cuirs. Une protéase alcaline produite par *Streptomyces sp.* GS-1 a été extraite et caractérisée, démontrant son efficacité comme agent de déhairage (**Sarkar et Suthindhiran, 2020**). De même, *Streptomyces sp.* MM-3, isolé de la rhizosphère de *Psidium guajava*, a été identifié comme un candidat potentiel pour la production de protéases à propriétés de déhairage (**Shaikh et al., 2019**). Une sérine protéase alcaline thermostable produite par *Nocardiopsis alba* OM-5 a été purifiée et caractérisée, avec une étude de sa thermodynamique et de sa structure (**Chauhan et al., 2021**). Par ailleurs, l'optimisation de la fermentation d'une protéase alcaline thermo-stable issue de *Streptomyces sp.* Al-Dhabi-82 a mis en évidence son intérêt pour des applications industrielles écologiques et durables (**Al-Dhabi et al., 2020**).

#### 4.2.3 Conclusion

Les résultats obtenus mettent en évidence la diversité et le potentiel enzymatique remarquable des actinomycètes étudiés, illustré par une proportion élevée d'isolats producteurs d'amylase, de lipase et de protéase. La souche AS12, sélectionnée pour ses performances lipolytiques, a démontré une activité significative en fermentation submergée, confirmant son intérêt biotechnologique. Ces observations corroborent les données de la littérature et soulignent l'importance du criblage systématique pour l'identification de souches d'intérêt industriel. Cette partie de travail contribue ainsi à valoriser les actinomycètes comme sources prometteuses d'enzymes hydrolytiques, ouvrant la voie à des applications variées dans les domaines de l'agroalimentaire, de l'environnement, de la santé et de l'énergie.

#### 4.3 Etude de la lipase partiellement purifiée AS12

Les lipases possèdent un large potentiel biotechnologique, mais leur exploitation industrielle reste limitée par la difficulté d'obtenir des biocatalyseurs adaptés aux conditions des procédés industriels.

Dans cette perspective, l'exploration de lipases microbiennes présentant des propriétés particulières, telles que la thermostabilité, la reproductibilité et la tolérance aux solvants ou aux agents chimiques, suscite un intérêt croissant. En effet, parmi plus de 3 000 lipases identifiées, seules environ 5 % sont actuellement exploitées industriellement (**Okpara, 2022**).

Cette partie traite de l'optimisation des conditions de production de la lipase AS12, de la caractérisation biochimique incluant la stabilité thermique, la stabilité au pH, la tolérance aux agents chimiques et la cinétique enzymatique, ainsi que de l'évaluation du potentiel biotechnologique de l'enzyme comme additif dans les formulations de détergents.

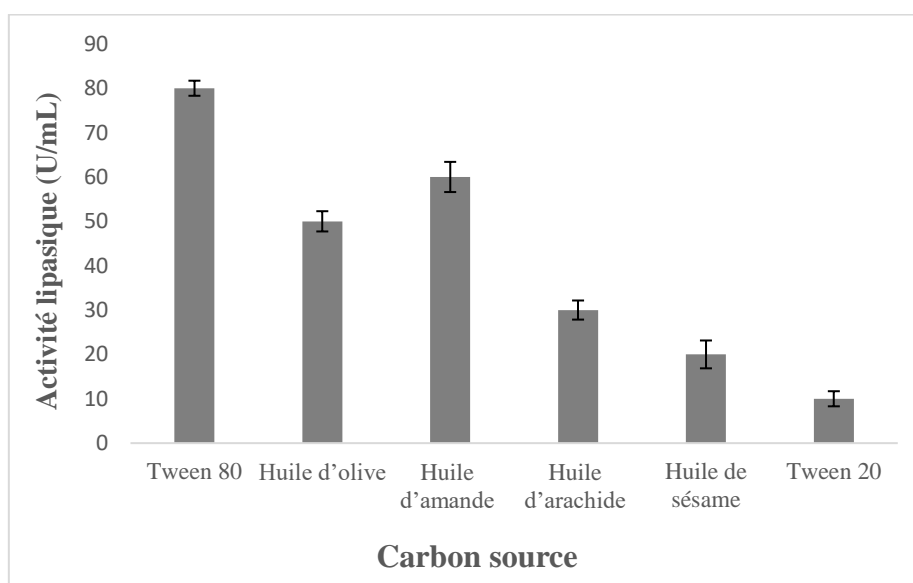
### 4.3.1 Résultats

#### 4.3.1.1 Optimisation des conditions de production de la lipase

Les conditions de culture, englobant les paramètres nutritionnels et physico-chimiques, affecte de manière significative la biosynthèse des lipases. L'optimisation de ces facteurs constitue une étape déterminante pour améliorer le rendement de production et assurer une activité enzymatique optimale. Dans ce travail, la production initiale a été optimisée selon l'approche classique « une variable à la fois », permettant d'évaluer l'effet de chaque paramètre et d'identifier les conditions ayant le plus d'impact sur sa synthèse.

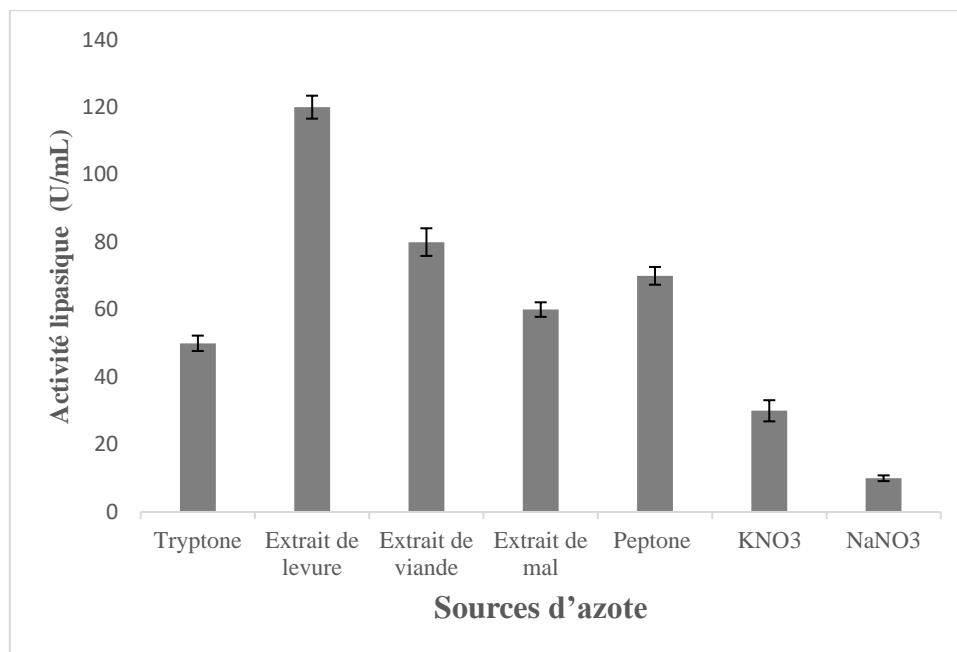
##### 4.3.1.1.1 Influence des sources de carbone et d'azote

Différents substrats naturels et synthétiques ont été testés individuellement dans le milieu de culture à une concentration de 1 %, afin d'évaluer leur impact sur la production de lipase. Les résultats présentés dans la figure 18 montrent une variation importante de l'activité lipasique selon la source de carbone utilisée. Parmi les substrats synthétiques, le Tween 80 a induit l'activité la plus élevée ( $80 \pm 1,7$  U/mL), contrairement au Tween 20. Parmi les huiles naturelles, l'huile d'amande a favorisé la meilleure production, suivie de l'huile d'olive, tandis que les huiles d'arachide et de sésame ont présenté des activités plus faibles.



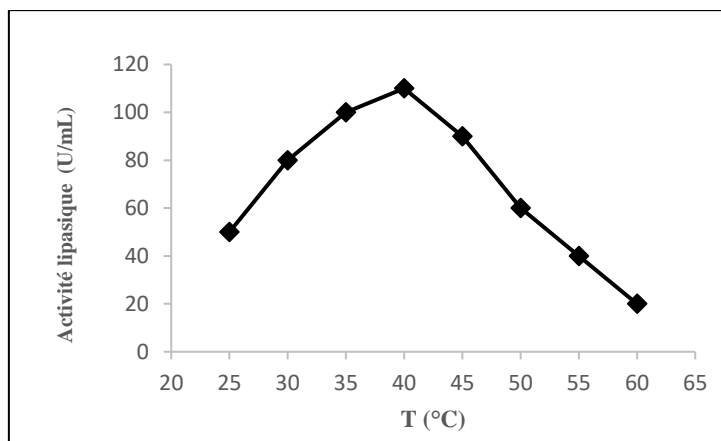
**Figure 18 :** Influence des sources de carbone sur l'activité de la lipase (AS 12).

Les résultats indiquent également que la biosynthèse de la lipase dépend de la nature des substrats azotés (figure 19). Les sources organiques ont favorisé les activités les plus élevées, notamment l'extrait de levure ( $120 \pm 1,3$  U/mL), suivi de l'extrait de viande et de la peptone. Des activités modérées ont été observées avec l'extrait de malt et la tryptone. En revanche, les sources inorganiques, telles que le  $\text{KNO}_3$  et le  $\text{NaNO}_3$ , ont induit des activités lipasiques plus faibles.

**Figure 19 :** Influence des sources d'azote sur l'activité de la lipase (AS 12).

#### 4.3.1.1.2 Influence de la température

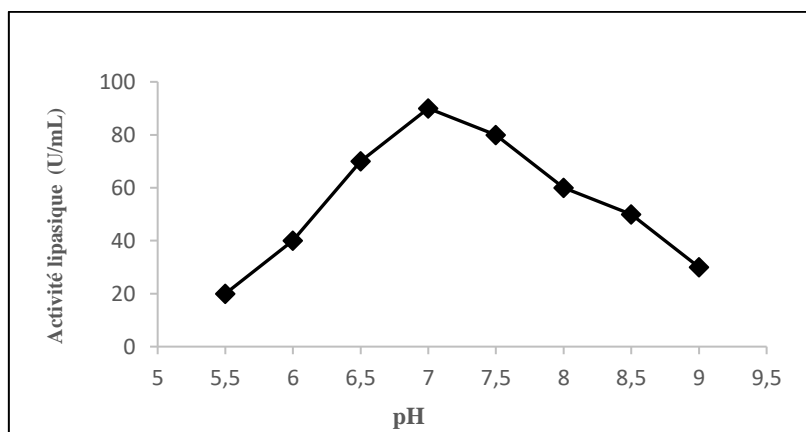
L'effet de la température sur l'activité enzymatique a été évalué entre 25 et 60 °C (figure 20). Une augmentation progressive de l'activité a été observée jusqu'à 40 °C, avec un maximum de ( $110 \pm 2,1$  U/mL). Au-delà de cette température, une diminution progressive et continue a été enregistrée, notamment à 55 °C et 60 °C. Ces résultats indiquent que la température optimale de production de la lipase est de 40 °C.



**Figure 20** : Influence de température sur l'activité de la lipase (AS 12).

#### 4.3.1.1.3 Influence du pH

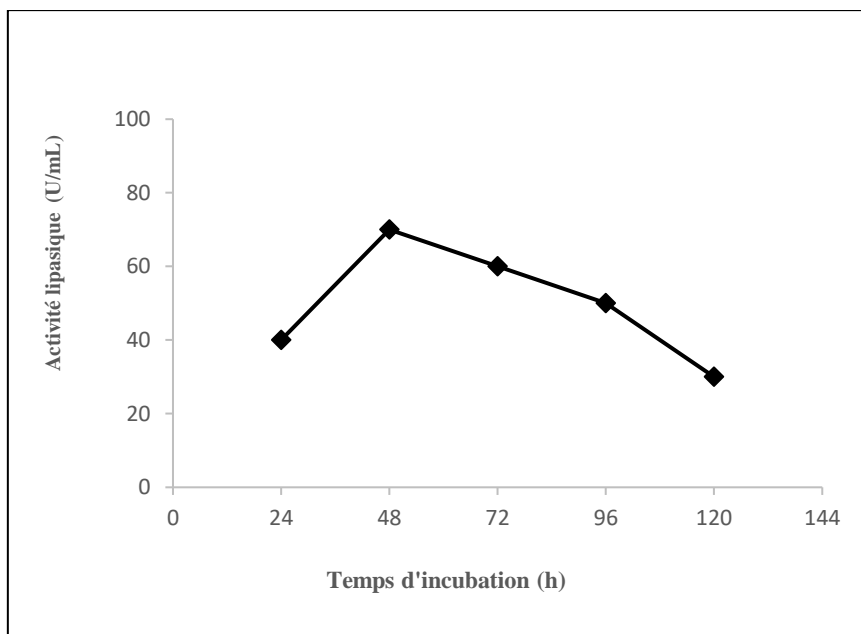
L'évaluation de l'activité enzymatique a été réalisée dans une gamme de pH comprise entre 5,5 et 9,0 (figure 21). L'ensemble des résultats indique une influence marquée du pH sur l'activité catalytique. L'activité de la lipase augmente progressivement entre pH 5,5 et 7,0, avec un optimum de  $(90 \pm 2,5 \text{ U/mL})$ . Une diminution progressive de l'activité a été observée à partir de pH 7,5 jusqu'à atteindre un minimum à pH 9,0. Ces résultats indiquent une activité optimale de la lipase en conditions neutres, avec une réduction aux pH acides et alcalins.



**Figure 21** : Influence de pH sur l'activité de la lipase (AS 12).

#### 4.3.1.1.4 Influence du temps d'incubation

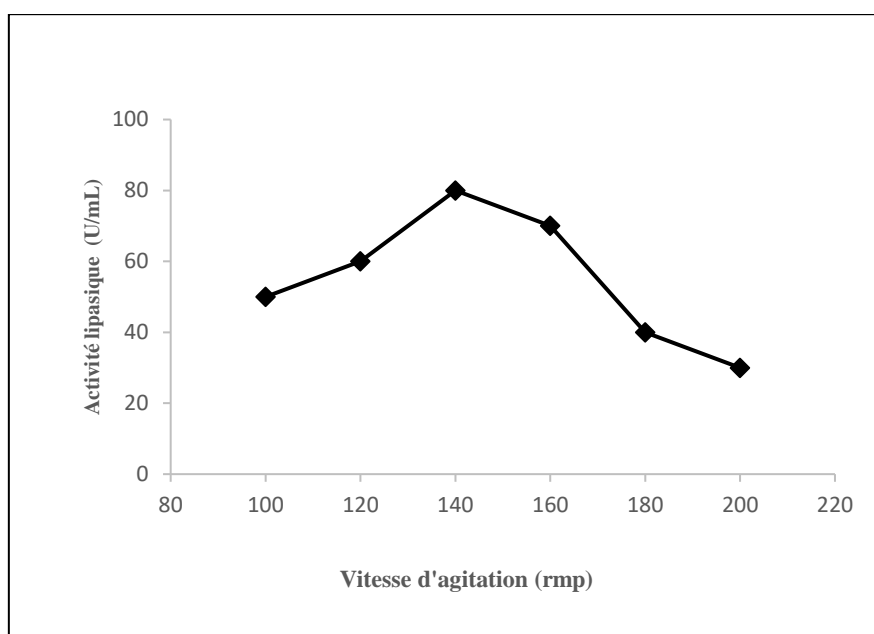
L'effet du temps d'incubation sur l'activité de la lipase a été examiné sur une période allant de 24 à 120 heures (figure 22). L'activité enzymatique augmente initialement, atteignant un maximum de  $(70 \pm 2,6 \text{ U/mL})$  à 48 heures. Ensuite, une décroissance progressive de l'activité a été observée entre 72 h et 120 h. Ces résultats indiquent que 48 heures correspondent à la durée optimale pour l'activité lipasique.



**Figure 22** : Influence de temps d'incubation sur l'activité de la lipase (AS 12).

#### 4.3.1.1.5 Influence de la vitesse d'agitation

L'influence de la vitesse d'agitation sur l'activité de la lipase a été étudiée entre 100 et 200 rpm, et les résultats sont illustrés dans la Figure 23. Le maximum a été enregistré à 140 rpm ( $80 \pm 2,2$  U/mL), tandis qu'une diminution significative a été observée entre 160 et 200 rpm. Ces résultats suggèrent que des vitesses d'agitation modérées favorisent l'activité enzymatique, alors que des vitesses trop faibles ou trop élevées la réduisent.



**Figure 23** : Influence de vitesse d'agitation sur l'activité de la lipase (AS 12).

### 4.3.2 Purification partielle de lipase AS12

La lipase extracellulaire produite par l'isolat AS12 a été partiellement purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium à une saturation de 80 %. L'ensemble des étapes de purification est présenté dans le tableau 10. La fraction précipitée a montré une activité spécifique de 118 430,4 U/mg, correspondant à un rendement de 34,28 % et à un facteur de purification de 1,36.

**Tableau 10:** Résumé des étapes de purification partielle de la lipase produite par la souche AS12

Etapes de purification	Protéines totales (mg/mL)	Activité totale (U/mL)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Enzyme brute	161,1	14000	86,90	100	1
Fractionnement au sulfate d'ammonium	40,53	4800	118,43	34,28	1,36

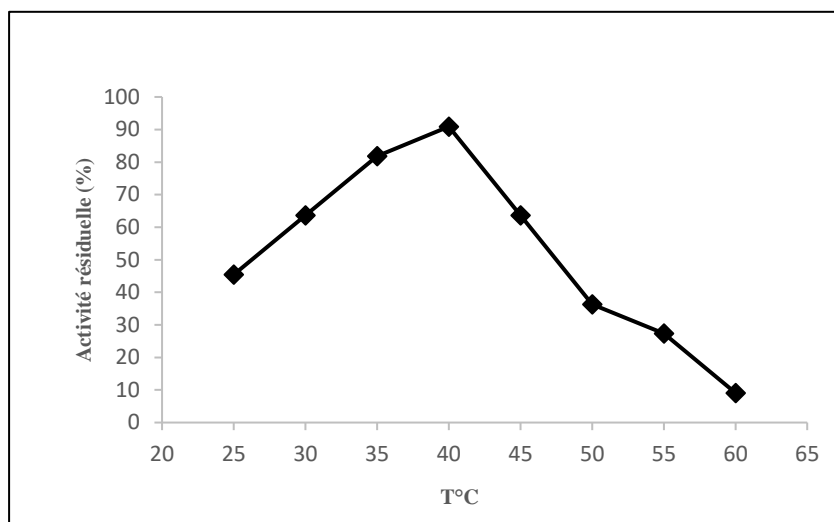
### 4.3.3 Caractérisation biochimiques de la lipase AS12 partiellement purifiée

L'étude des propriétés biochimiques d'une lipase, notamment sa stabilité vis-à-vis de la température, du pH, des ions métalliques, des surfactants et des solvants organiques, fournit ainsi des indications cruciales pour son application potentielle dans divers procédés industriels et biotechnologiques, notamment dans la production de détergents.

#### 4.3.3.1 Stabilité thermique de la lipase AS12

La stabilité thermique de la lipase AS12 a été examinée après une incubation d'une heure dans un intervalle de températures allant de 25 °C à 60 °C (figure 24). L'enzyme a maintenu une activité élevée entre 35 °C et 45 °C, avec un maximum à 40 °C (90,9 %). Une activité réduite a été enregistrée à 25 °C (45,4 %), tandis qu'une perte marquée a été observée au-delà de 50 °C. Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence une stabilité optimale de

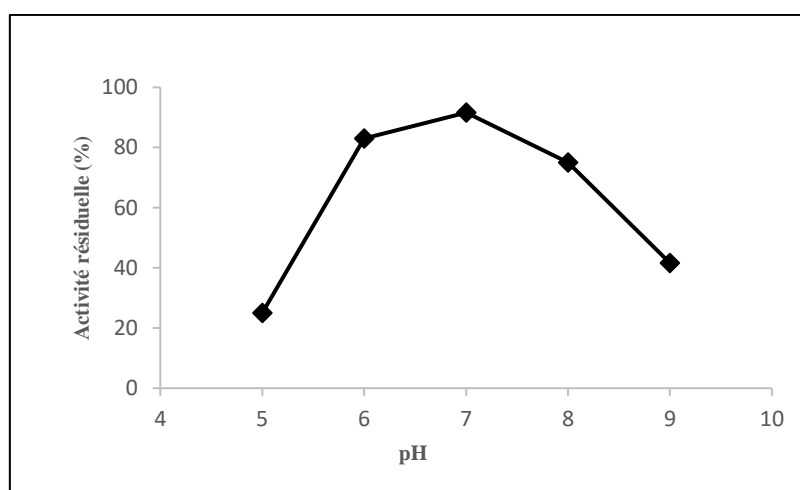
la lipase dans l'intervalle 30–45 °C et une dénaturation thermique marquée aux températures plus élevées.



**Figure 24 :** Effet de la température sur la stabilité de la lipase AS12.

#### 4.3.3.2 Stabilité de la lipase AS12 en fonction du pH

L'activité résiduelle de la lipase AS12 a été évaluée à différents pH pendant une heure (figure 25). L'enzyme présente une stabilité maximale à pH 7 (91,6 %) et conserve une activité relativement élevée entre pH 6 et 8 (70–80 %), tandis qu'une diminution marquée a été observée aux pH 5 et 9, indiquant que la lipase est plus stable dans des conditions proches de la neutralité et légèrement alcalines.



**Figure 25 :** Effet du pH sur la stabilité de la lipase AS12.

#### 4.3.3.3 Stabilité enzymatique de la lipase AS12 en présence d'agents chimiques

La stabilité de la lipase a été testée après une incubation d'une heure en présence de divers agents chimiques. Comme l'indique le tableau 11, l'activité de la lipase reste stable en présence de  $Mg^{2+}$  (115,9 %) et  $Ca^{2+}$  (110,1 %). Les ions  $Fe^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  maintiennent une activité modérée, alors que  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  la réduisent partiellement. Parmi les surfactants, Triton X-100 conserve une activité notable (66,6 %), contrairement au SDS (25,0 %). L'inhibiteur EDTA réduit l'activité à 33,3 %, et les solvants organiques polaires tels que l'éthanol et le méthanol préservent l'activité (91,6 % et 83,3 %), tandis que l'acétone et le DMSO exercent un effet inhibiteur modéré. Ces résultats montrent une stabilité sélective de la lipase selon la nature des additifs, avec activation par certains ions métalliques et tolérance relative aux solvants polaires.

**Tableau 11** : Effets des différents agents sur la stabilité de la lipase AS12.

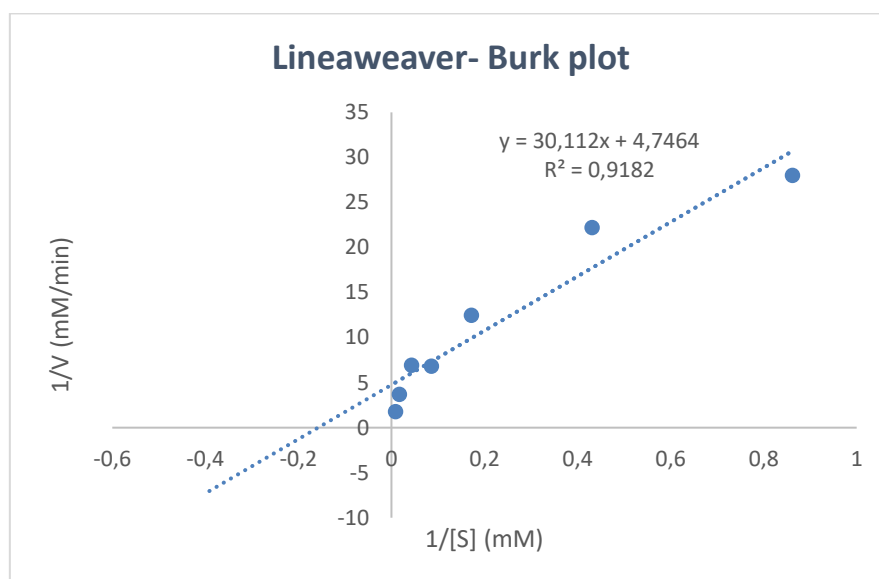
Agents chimiques	Activité résiduelle (%)
a) Ions métalliques (1 mM)	
$Ca^{2+}$ ( $CaSO_4$ )	110,1
$Co^{2+}$ ( $CoSO_4$ )	59,3
$Cu^{2+}$ ( $CuSO_4$ )	40,5
$Fe^{2+}$ ( $FeSO_4$ )	98,7
$Mg^{2+}$ ( $MgSO_4$ )	115,9
$Mn^{2+}$ ( $MnSO_4$ )	81,0
$Zn^{2+}$ ( $ZnSO_4$ )	70,2
b) Surfactants (5%)	
SDS	25,0
Triton X-100	66,6
c) Inhibiteurs (5 mM)	
EDTA	33,3
d) Solvants organiques (10%)	
Ethanol	91,6
Méthanol	83,3
Acétone	58,3

DMSO

75,0

#### 4.3.3.4 Étude des paramètres cinétiques de la lipase AS12

Les paramètres cinétiques de la lipase produite par la souche AS12 ont été déterminés en utilisant l'huile d'olive comme substrat (figure 26). Les résultats obtenus indiquent une vitesse maximale de réaction ( $V_{max}$ ) de 0,21 mM/min ainsi qu'une constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de 6,34 mM, reflétant respectivement la capacité catalytique maximale de l'enzyme et son affinité pour le substrat.

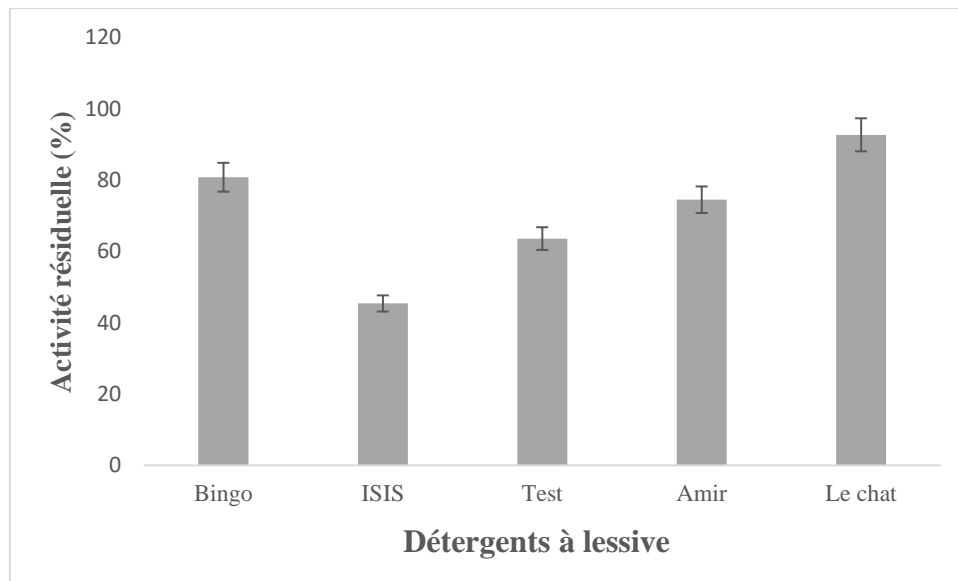


**Figure 26** : Etude cinétique de la lipase de la souche AS 12 en utilisant des émulsions d'huile d'olive comme substrat.

#### 4.3.4 Application biotechnologique de la lipase AS12 partiellement purifiée

##### 4.3.4.1 Compatibilité de la lipase AS12 avec différents détergents à lessive

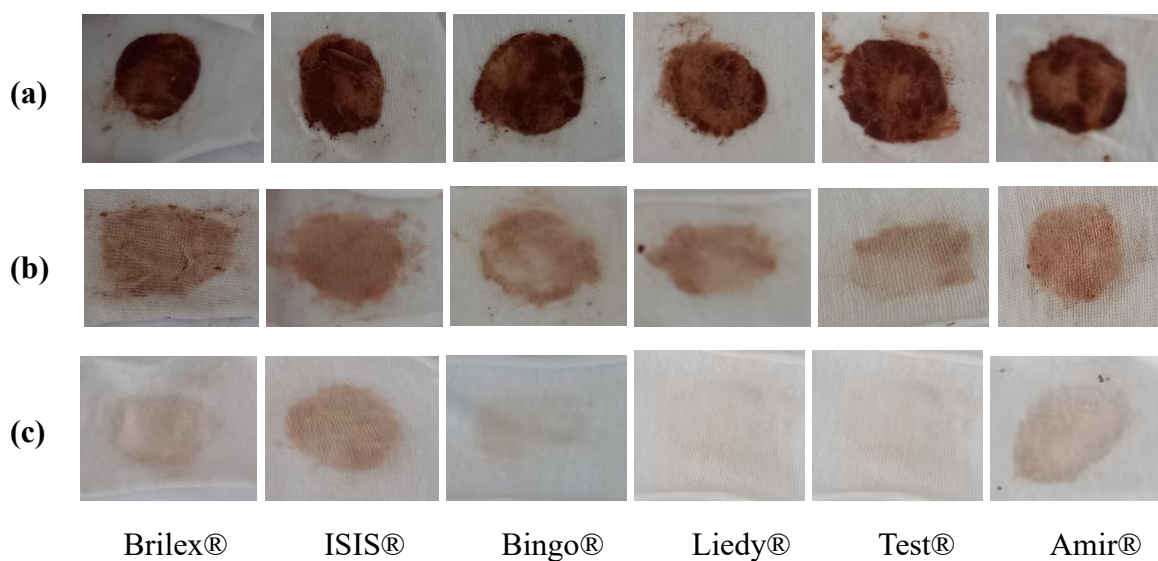
La lipase AS12 a été incubée pendant une heure avec de différents détergents commerciaux afin d'évaluer sa stabilité et son potentiel comme additif détergent. D'après la figure 27, l'enzyme a maintenu son activité initiale en présence de Liedy® (100 %) et a présenté une activité résiduelle significative avec Bingo® (81,8 %) et Brilex® (72,7 %). En revanche, des réductions modérées de l'activité ont été observées avec Test® (63,6 %) et Amir® (54,5 %), tandis que l'activité la plus faible a été enregistrée avec ISIS® (45,4 %).



**Figure 27** : Stabilité et compatibilité de la lipase AS12 avec les détergents à lessive commerciaux

#### 4.3.4.2 Evaluation de la performance de nettoyage de la lipase AS12

L'examen des tissus traités (figure 28) a révélé des différences significatives dans l'efficacité de l'élimination des taches selon les protocoles appliqués. L'utilisation du détergent seul a permis un nettoyage partiel, laissant des résidus visibles sur l'ensemble des échantillons. En revanche, l'addition de la lipase AS12 partiellement purifiée a nettement amélioré le résultat, la majorité des tissus apparaissant propres. Ces observations suggèrent que la lipase AS12 améliore l'efficacité du nettoyage, par une interaction synergique avec les tensioactifs (les surfactants).



**Figure 28:** Test de lavage de la lipase AS12 sur taches de chocolat. (a) échantillons de tissu non traités (témoin), (b) échantillons traités avec le détergent seul, (c) échantillons traités avec le détergent et la lipase AS12.

#### 4.3.2 Discussion

Les lipases occupent une place importante dans divers secteurs industriels, notamment la production de biocarburants (biodiesel), les détergents, l'industrie agroalimentaire, le cuir, le textile, la pharmacie et le domaine biomédical (Agrawal, 2024). Parmi les genres des actinomycètes, *Streptomyces* est couramment utilisé pour la production de lipases (Agrawal, 2024). Plusieurs souches appartenant au genre *Streptomyces*, telles que *S. halstedii*, *S. griseus* et *S. clavuligerus*, sont capables de produire cette enzyme. Des recherches se poursuivent dans ce domaine afin d'étudier l'activité et d'optimiser la production des lipases à partir de *Streptomyces* (Khushboo et al., 2022).

Le criblage secondaire des micro-organismes pour la production de métabolites constitue une étape essentielle, durant laquelle l'optimisation des conditions de culture et des constituants nutritifs est réalisée afin d'obtenir une production maximale du métabolite (Agrawal, 2024). Dans le cas des lipases, divers facteurs physicochimiques et nutritionnels influencent leur biosynthèse, notamment les sources de carbone et d'azote (Bharathiet et al., 2019 ; Baltaci et al., 2020 ; Adetunji et Olaniran, 2021), ainsi que des paramètres tels que la température, le pH, la durée d'incubation et la vitesse d'agitation (Bharathiet et al., 2019 ; Adetunji et Olaniran, 2021). L'approche conventionnelle d'optimisation un facteur à la fois (OVAT) a montré que l'utilisation de substrats lipidiques, tels que le Tween 80, ainsi que de sources organiques d'azote, comme l'extrait de levure ou la peptone, favorise significativement la production de lipase par la souche AS12. En effet, les lipases étant de nature inductible, les substrats lipidiques employés comme sources de carbone jouent un rôle déterminant dans leur biosynthèse (Adetunji et Olaniran, 2021 ; Pham et al., 2021). De manière générale, ces enzymes sont synthétisées en présence d'huiles, de triacylglycérols ou de Tweens (Vasconcelos et al., 2018 ; Balaji et al., 2020 ; Adetunji et Olaniran, 2021). Par ailleurs, l'ajout de sources d'azote, qu'elles soient organiques ou inorganiques, exerce également une influence significative sur le rendement en lipases. Les sources organiques, telles que la peptone, l'extrait de levure ou leurs combinaisons, se sont avérées particulièrement efficaces pour améliorer la production de lipases chez diverses espèces microbiennes (Adetunji et Olaniran, 2021).

Le Tween 80 induit généralement la biosynthèse et la sécrétion des lipases en augmentant la perméabilité de la membrane cellulaire, ce qui facilite également leur libération extracellulaire (Sharma et al., 2014 ; Abo-Kamer et al., 2025 ; Sipiczki et al., 2024). Cet effet est généralement attribué à l'influence du tensioactif sur la lipase liée à la cellule ou à des modifications de la perméabilité membranaire. Toutefois, l'action des tensioactifs ne se limite pas à l'augmentation de la production de lipases et semble dépendre à la fois du type de tensioactif et de la souche microbienne étudiée. De plus, l'ajout de Tween 80 à des concentrations comprises entre 0,5 et 2 g/L a favorisé la production extracellulaire de lipases sans altérer le rendement en biomasse (Sipiczki et al., 2024). Les résultats de la présente étude sont cohérents avec plusieurs travaux antérieurs, qui identifient le Tween 80 comme la source de carbone optimale pour la production de lipase chez certaines souches de *Streptomyces*, telles que *S. gobitricini* (Lips.g) ( $126,5 \pm 3,53$  U/mL) (Gupta et al., 2004), *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 (45 U/mL) (Semache et al., 2021) et *Streptomyces* sp. TEM 33 (Cadirci et al., 2016), ainsi que chez d'autres micro-organismes, notamment, *Bacillus* sp. KS4 (Sharma et al., 2014), *Bacillus salmalaya* (6,8 U/mL) (Al Mohaini et al., 2022), *Rhizopus delemar* (91,73 U/L) (AÇIKEL et al., 2011) et *Aspergillus oryzae* ( $3,33 \pm 0,484$  U/mL) (Iftikhar, et al., 2024). Globalement, l'ajout de Tween 80 augmente l'activité lipasique extracellulaire pour l'ensemble des souches testées (Sipiczki et al., 2024).

L'extrait de levure, source azotée complexe riche en acides aminés, peptides, vitamines hydrosolubles et glucides (El-Naggar et al., 2016), stimule particulièrement la biosynthèse du mycélium et favorise une croissance rapide (Souagui et al., 2019). De plus, il constitue un supplément favorable à la production de lipase, en raison de sa richesse en azote et en vitamines nécessaires à la croissance cellulaire (Pereira et al., 2019). De manière similaire, l'extrait de levure représente une source azotée optimale pour la production de lipase dans différentes espèces microbiennes, avec des activités enzymatiques maximales rapportées pour *Streptomyces althioticus* RG3 ( $E_{24} = 69,25\%$ ) (Hamed et al., 2021), *Yarrowia lipolytica* (3 412 U/L) (Pereira et al., 2019), *Pseudomonas aeruginosa* SDK-6 ( $66,18 \pm 1,66$  U/mL) (Kaur et Gupta, 2025) et *Limtongozyma siamensis* DMKU-WBL1-3 ( $570,4 \pm 12,8$  U/mL) (Sakpuntoon et al., 2023). Par ailleurs, Galvagno et al. (2011) ont également observé une augmentation de la production de lipase en présence d'extrait de levure (Pereira et al., 2019). Dans le cas, de *Bacillus* sp. KS4, l'extrait de levure a été identifié comme la source d'azote la plus efficace, suivi de la peptone, de la tryptone et du  $\text{NaNO}_3$  (Sharma et al., 2014). Alabdallal et al. (2020), en accord avec les travaux de Mukhtar, Hanif et Rehman (2015)

ainsi que de **Sharma et al. (2016)**, rapportent que le nitrate de sodium est le moins stimulant. Ils indiquent également que cette observation peut s'expliquer par l'effet inhibiteur des sources d'azote inorganiques sur la croissance et sur l'activité lipasique, ce qui concorde avec nos résultats.

Les micro-organismes présentent différentes températures optimales pour la production maximale de lipases, qui correspondent souvent à celles favorisant leur croissance maximale (**Adetunji et Olaniran, 2021**). Il a été largement rapporté que les lipases bactériennes manifestent une activité hydrolytique optimale dans une plage de températures comprise entre 30 et 60 °C (**Sharma et al., 2025**). Selon Pirt (1975), la température influence la sécrétion des enzymes extracellulaires en modifiant les propriétés physiques de la membrane cellulaire (**Riyadi et al., 2017**). Les résultats actuels confirment les observations précédentes, indiquant que 40 °C constitue la température optimale pour une production maximale de lipase, comme rapporté pour *Streptomyces cellulosa* AU-10 (**Boran, 2018**), *Streptomyces sp.* CS326 (**Vasconcelos et al., 2018**) *Streptomyces violascens* OC125-8 (**Boran et al., 2019**), *Nocardiosis alba* (11,47 ± 0,43 U/mL) (**Patel et al., 2021**) et *Rhizopus sp.* (34,97 U/gds), cette dernière présentant ensuite une forte diminution à 50 °C, avec seulement 1,99 U/gds (**Riyadi et al., 2017**).

Le pH initial du milieu de fermentation constitue un paramètre critique influençant la croissance microbienne ainsi que la sécrétion ultérieure d'enzymes. La production de lipases bactériennes est généralement maximale dans des conditions de pH neutre à alcalin (**Adetunji et Olaniran, 2021**) La plupart des lipases microbiennes présentent une activité optimale à un pH neutre (pH 7,0). Bien qu'aucune corrélation directe n'existe entre le pH optimal et l'espèce microbienne, Certaines valeurs spécifiques de pH sont associées au milieu naturel de croissance de micro-organismes (**Yao et al., 2021**). Dans la présente étude, la biosynthèse de la lipase a été optimisée à pH 7, conformément aux observations de travaux antérieurs. À titre d'exemple, *Nocardiosis alba* a présenté une activité maximale de 11,47 ± 0,43 U/mL à un pH similaire (**Patel et al., 2021**), *Streptomyces sp.* CS326 a montré une activité optimale entre pH 5,0 et 8,0, avec un maximum à pH 7 (**Vasconcelos et al., 2018**), *Pseudomonas helmanticensis* HS6 a également révélé une activité maximale à pH 7 entre pH 6 et 9 (**Phukon et al., 2020**), *Lactobacillus fermentum* 5c a atteint 2 618,3 U/mL à pH 7 dans la plage pH 5–9 (**Fathi et al., 2022**), et des espèces telles que *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (**Donzella et al., 2024**) et *Bacillus cereus* ATA179 (**Demirkan et al., 2021**) ont également démontré une activité lipasique optimale à pH 7.

La production de lipases par les micro-organismes se déroule généralement sur une période allant de quelques heures à quelques jours, le plus souvent durant la phase exponentielle tardive ou la phase stationnaire de croissance (**Adetunji et Olaniran, 2021**). La durée de la période d'incubation joue également un rôle déterminant dans la synthèse de la lipase. Conformément aux résultats de travaux antérieurs, une durée de trois jours (72 h) a été identifiée comme optimale à 40 °C et à pH 7,5 (**Alabdallal et al., 2020**). Les temps d'incubation nécessaires pour atteindre une production maximale de lipase varient selon les souches d'actinomycètes. Par exemple, la production maximale est observée après seulement 4 h chez *Streptomyces halstedii* ST40 (**Vasconcelos et al., 2018 ; Alzahrani et al., 2025**), 48 h chez *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 (**Al-Dhabi et al., 2020**), 72 h chez *Nocardioopsis alba* (**Patel et al., 2021**) et *Streptomyces exfoliatus* LP10 (9,96 IU/mL) (**Aly et al., 2012**), 96 h chez *Streptomyces griseus* (**Vasconcelos et al., 2018 ; Alzahrani et al., 2025**), et jusqu'à 120 h chez *Streptomyces* sp. OC119-7 (**Ayaz et Boran, 2015**).

La vitesse d'agitation représente un facteur déterminant dans la production microbienne de lipases, puisqu'elle améliore le transfert d'oxygène et favorise la dispersion des micelles d'huile inductrices, facilitant ainsi leur interaction avec les micro-organismes (**Adetunji et Olaniran, 2021**). Une agitation optimale améliore la production de lipases en favorisant la solubilité des composants du milieu, l'homogénéité de la température et de l'oxygène dissous, ainsi que la dispersion des cellules bactériennes, facilitant ainsi l'accès aux nutriments (**Abol-Fotouh et al., 2021**). La production optimale de lipase par la souche AS12 a été obtenue à une vitesse d'agitation de 140 rpm, en accord avec les valeurs signalées pour *Streptomyces* sp. Loyola Lipase-1 (406,66 U/mL) (**Kumar et al., 2017**) ainsi que pour *Bacillus* sp. TTs1 (594,55 ± 0,78 U/mL) (**Shiri et al., 2023**).

La lipase extracellulaire de l'isolat AS12 a été partiellement purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium (80 % de saturation), avec un rendement de 34,28 % et un facteur de purification de 1,36. Des résultats similaires ont été rapportés pour la lipase d'*A. caviae* LipT51, précipitée à 35 % de saturation, avec une récupération de 48 % et un facteur de purification de 1,95 (**Gurkok et Ozdal, 2021**).

Concernant la caractérisation biochimique, l'enzyme étudiée atteint son activité maximale à 40 °C et pH 7,0, sur une plage de 30–45 °C et pH 6–8. Des caractéristiques similaires ont été observées pour les lipases d'autres souches de *Streptomyces*. Ainsi, la lipase de *Streptomyces violascens* OC125-8 a montré une activité catalytique optimale à 40 °C et pH

7, tout en conservant plus de 86 % de son activité résiduelle après 1 h entre 30 et 40 °C (Boran et al., 2019). Pour *Streptomyces* sp. CS326, l'activité catalytique maximale a été également observée à pH 7,0 et 40 °C (Alzahrani et al., 2025). Par ailleurs, Les lipases étudiées présentent toutes une activité thermique maximale à 40 °C, avec des plages de stabilité variant selon la souche : 20–80 °C pour *Pseudomonas aeruginosa* SDK-6 (Kaur et Gupta, 2025), 30–45 °C pour *Sphingobacterium* sp. S2 (Satti et al., 2019), 20–50 °C pour SCNL de *Staphylococcus caprae* NCU S6 (Zhao et al., 2021), tandis que la lipase LipSs de *Fusarium oxysporum* atteint également son maximum à 40 °C (Serpa et al., 2022). En revanche, la lipase de *Bacillus subtilis* LP2 présente une activité maximale à pH 7 (Yasar et al., 2020), tandis que celle d'*Aspergillus* sp. se caractérise par un optimum à pH 7,5 avec une stabilité comprise entre 7 et 7,5, ainsi qu'une activité maximale à 45 °C et une stabilité thermique maintenue entre 30 et 50 °C (Tacin et al., 2019). Les lipases bactériennes d'origine mésophile présentent généralement un optimum de température compris entre 30 et 60 °C. Bien que, la majorité des lipases microbiennes mésophiles peuvent agir sur une large plage de pH, mais elles présentent une instabilité notable à des températures supérieures à 70 °C (Rabbani et al., 2023). Par ailleurs, Les lipases provenant d'organismes mésophiles dominent largement les applications industrielles, en raison de leur isolement, de leur clonage et de leur caractérisation (Moayd et Yan, 2017). Les différences observées dans la stabilité thermique des lipases sont généralement expliquées par leur diversité structurale (Yao et al., 2021). La thermo-stabilité est liée à la structure des protéines, incluant des modifications des séquences d'acides aminés, une augmentation du nombre de ponts salins et des interactions hydrophobes, une réduction de la taille des cavités, des altérations des régions exposées au solvant, ainsi que des conditions environnementales externes telles que le pH. Parallèlement aux lipases thermophiles et alcaliphiles, plusieurs lipases mésophiles thermostables ont été identifiées, certaines conservant leur activité à haute température. Leur adaptabilité aux conditions sous-optimales et leur large spectre catalytique en font des candidates de choix pour les applications industrielles et biotechnologiques (Vivek et al., 2022). L'analyse comparative des séquences et des structures des lipases thermophiles et mésophiles révèle que les éléments conformationnels fondamentaux sont préservés et que la conformité de la séquence du site actif est largement maintenue (Rabbani et al., 2023). D'autre part, les phénomènes biologiques naturels dépendent étroitement du pH, dont la stabilité influence significative la majorité des fonctions biologiques. Le pH de l'enzyme fournit des indications sur les phases de début et de fin de sa synthèse. Par ailleurs, l'activité enzymatique est

sensible aux variations de pH. Chaque enzyme présente une activité maximale à un pH optimal spécifique (Thapa et al., 2019).

L'enzyme AS12 a maintenu une activité catalytique totale en présence des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , tout en conservant une stabilité élevée dans l'éthanol et le méthanol. Ces résultats suggèrent que certains ions métalliques peuvent exercer un effet stabilisateur ou modulateur sur l'activité des lipases, conformément aux travaux antérieurs ayant mis en évidence leur influence sur la catalyse enzymatique (Yao et al., 2021). Par exemple, la production de lipase par *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 a atteint  $163,7 \pm 6,2$  U/mL en présence de  $\text{Mg}^{2+}$  et  $130 \pm 2,1$  U/mL avec  $\text{Ca}^{2+}$ . De manière concordante, *Burkholderia* sp. EQ3 a présenté une activité accrue en présence de  $\text{Mg}^{2+}$  (122,2 %) et de  $\text{Ca}^{2+}$  (105,6 %) (Gurkok et Ozdal, 2021), tandis que *Geobacillus stearothermophilus* FMR12 a montré une augmentation de 115 % de son activité sous l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  par rapport au témoin (Abol-Fotouh, 2021). De plus, la souche *Bacillus* sp. VITL8 a exprimé des niveaux de production particulièrement élevés avec l'addition de  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{MgCl}_2$ , atteignant respectivement  $236,0 \pm 7,8$  et  $230,0 \pm 3,5$  U/mL (Balaji et al., 2020). Par ailleurs, les effets positifs des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sur l'activité de nombreuses lipases ont été largement documentés dans plusieurs travaux (Chandra, 2020 ; Sahoo et al., 2020 ; Yao et al., 2021 ; Riyadi et al., 2024 ; Alzahrani, 2025). Bien que l'effet stimulant du  $\text{Ca}^{2+}$  sur l'activité lipasique a été attribué à des altérations structurales plutôt qu'à un rôle catalytique (Ayaz et Boran, 2015), puisque les lipases catalysent l'hydrolyse des liaisons ester carboxyliques sans nécessiter de cofacteur (Chandra et al., 2020 ; Agrawal, 2024). En revanche, plusieurs études ont montré que l'activité lipasique peut être inhibée par différents ions métalliques. Ainsi,  $\text{FeCl}_2$  et  $\text{CoCl}_2$  ont réduit la production de lipase par *Bacillus* sp. VITL8 (Balaji et al., 2020), tandis que  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  se sont révélés défavorables à l'activité enzymatique. De plus,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  exercent un effet inhibiteur particulièrement marqué, conduisant à une activité résiduelle inférieure à  $5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Akhter et al., 2022). D'autres travaux ont également rapporté une inhibition importante par  $\text{Co}^{2+}$  et plus modérée par  $\text{Zn}^{2+}$  (Akhter et al., 2022 ; Agrawal, 2024), ainsi qu'une diminution significative de l'activité en présence de  $\text{Zn}^{2+}$  (64,1 %) et de  $\text{Mn}^{2+}$  (61,5 %) (Ayaz & Boran, 2015). En général, l'EDTA et le SDS exercent un effet inhibiteur modéré sur l'activité lipasique (Chandra, 2020 ; Akhter et al., 2022 ; Agrawal, 2024). La lipase de *Fusarium oxysporum* a conservé près de 50 % de son activité en présence de Triton X-100, mais a été fortement inhibée par le SDS, tandis que LipSs a maintenu 80 % de son activité résiduelle en méthanol et environ 60 % en DMSO (Serpa et al., 2022). Par ailleurs, la

production de lipase recombinante par *Pseudomonas aeruginosa* SDK-6 a été inhibée par l'ensemble des autres tensioactifs, l'effet le plus marqué étant observé avec le SDS. Les tensioactifs peuvent provoquer des modifications locales de la conformation du site actif de l'enzyme, entraînant inhibition, dépliement partiel réversible, puis inactivation. (**Kaur et Gupta, 2025**). Le SDS forme un complexe avec les protéines à faibles concentrations, ce qui entraîne une altération de la stabilité conformationnelle de l'enzyme et, par conséquent, une diminution de son activité. L'interaction de la lipase avec le surfactant dépend ainsi à la fois du type de lipase et du type de surfactant. La production enzymatique est fortement réduite en présence d'EDTA, qui inhibe l'activité de l'enzyme par chélation au niveau de son site actif, entraînant une altération de sa structure tertiaire et une perte conséquente de son activité. La nature des tensioactifs ainsi que leur concentration déterminent leur effet, pouvant entraîner soit une activation, soit une inhibition de l'activité enzymatique (**Akhter et al., 2022**). Selon **Chen et al. (2024)**, les solvants polaires, tels que le DMSO, peuvent perturber l'enveloppe aqueuse entourant la lipase A de *Bacillus subtilis* (BSLA), favorisant la formation de diverses interactions, notamment des liaisons hydrogène et des forces de van der Waals, lesquelles modifient la structure secondaire de l'enzyme et réduisent son activité catalytique. La tolérance aux solvants organiques constitue un trait important des lipases industrielles. Les lipases sont susceptibles d'être désactivées en raison des différences de polarité des solvants organiques. La stabilité enzymatique dépend de la présence d'eau et l'exposition à des solvants hydrophiles et polaires peut provoquer la déstabilisation ou l'inactivation de l'enzyme par élimination de l'eau liée, (**Ishak et al., 2019 ; Zago et al., 2021**), qui maintient sa conformation active native (**Zago et al., 2021**). Les solvants hydrophiles, tels que l'acétone, sont souvent défavorables à l'activité enzymatique en raison de leur capacité à éliminer l'eau liée aux enzymes, provoquant une dénaturation moléculaire et l'exposition de résidus hydrophobes internes (**Al-Limoun et al., 2019**). De manière générale, les lipases présentent souvent une activité réduite, voire peuvent être inactivées, dans des solvants organiques polaires en raison de facteurs tels que l'élimination de l'eau, les interactions par liaison hydrogène et l'augmentation de la flexibilité structurelle (**Chen et al., 2024**).

Les paramètres cinétiques de la lipase AS12, avec l'huile d'olive comme substrat, ont révélé un  $V_{max}$  de 0,21 mM/min et un  $K_m$  de 6,34 mM, indiquant une affinité relativement élevée pour ce substrat. Les lipases bactériennes et fongiques présentent des valeurs de  $K_m$  très variables, allant de 0,0064 à 16,58 mM (**Gurkok et Ozdal, 2021**). À titre comparatif *Aspergillus nidulans* ( $K_m=17,54$  mg/mL,  $V_{max}=769,23$   $\mu$ mol/min) et *Aspergillus niger*

LC269109 ( $K_m=9,71$  mg/mL,  $V_{max}=714,29$   $\mu$ mol/min) ont été étudiés également avec l'huile d'olive (Mayel et al., 2020). Le nouvel isolat *Bacillus subtilis* LP2 présente un  $V_{max} = 680$  mM/s et  $K_m=18,3$  mM pour Tween 80 (Yasar et al., 2020), Tandis que le nouvel isolat *Bacillus cereus* ATA179 a montré une  $V_{max}$  18,28 U/mL et  $K_m$  0,11 mM (Demirkan et al., 2021). Les valeurs  $K_m$  et  $V_{max}$  pour *Staphylococcus caprae* NCU S6 sont respectivement de 0,695 mM et 262,66 S-1 mM<sup>-1</sup>. (Zhao et al., 2021). D'autres lipases bactériennes présentent également des  $K_m$  variables selon le substrat utilisé : 105 mM pour l'huile d'olive avec *Bacillus* sp. ITP-001, 28 mM pour le p-nitrophényl caprylate avec *Bacillus coagulans* MTCC-6375, et 29 mM pour le 4-nitrophényl palmitate avec *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 (Yasar et al., 2020). En revanche, certaines lipases de *Streptomyces* présentent des activités catalytiques nettement supérieures : *Streptomyces gobitricini* (Lips.g) avec une  $V_{max}$  of 2500  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> et des  $K_m$  variant de 6,45 mM (TC18) à 26,70 mM (TC4) (Alzahrani et al., 2025), et *Streptomyces* sp. CS326 avec un de 4,6 mM/min/mg et un  $K_m = 0.24$  mM (Cho et al., 2012). Ces observations mettent en évidence la diversité des affinités enzymatiques et des spécificités de substrat entre différentes lipases microbiennes. En générale, la cinétique de la lipase est influencée par plusieurs facteurs, notamment le type et la concentration du substrat, la concentration enzymatique, la température et le pH (Gurkok et Ozdal, 2021 ; Bose et al., 2024). Pour les applications détergentes, il est généralement requis que les lipases soient solubles dans l'eau et présentent une spécificité de substrat réduite (Gürkök, 2019).

Le rôle des micro-organismes dans divers secteurs peut être réparti en trois phases majeures. La première, correspondant à la microbiologie industrielle traditionnelle, concerne leur utilisation pour la conservation des aliments et la production de denrées fermentées telles que le fromage, le pain. La deuxième, dite fermentation industrielle moderne, repose sur des procédés à grande échelle pour la production d'enzymes, de vitamines, de solvants organiques, d'antibiotiques et d'autres produits à forte valeur ajoutée. La troisième, correspondant à la biotechnologie moderne, s'illustre d'abord par la découverte d'antibiotiques comme la pénicilline et la streptomycine, puis par le développement de l'ADN recombinant. Cette biotechnologie couvre aujourd'hui un champ d'applications très vaste, allant de l'agriculture et de l'agroalimentaire aux industries chimiques et pharmaceutiques, ainsi qu'à la médecine humaine et vétérinaire. Enfin, l'ingénierie des protéines, l'évolution dirigée et les approches "omiques" ont profondément renouvelé la découverte de nouveaux micro-organismes et de leurs enzymes à usage industriel (Thapa et al., 2019).

Le secteur des détergents est l'un des principaux consommateurs d'enzymes, avec une part de marché estimée entre 25 et 30 % (Al-Ghanayem, 2024). Généralement, les formulations de détergents comprennent principalement des tensioactifs (surfactants) ainsi que des adjuvants, des agents de blanchiment, les agents de structure (builders), divers additifs mineurs (tels que agents dispersants, les argiles assouplissantes, les inhibiteurs de transfert de couleur et les azurants optiques). Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles, composées d'une partie hydrophobe et d'une partie hydrophile. La majorité des tensioactifs synthétiques, dérivés d'alkylbenzène sulfonates et associés à des phosphates, présentent une faible biodégradabilité et une toxicité pour les sols et les écosystèmes aquatiques, contribuant à l'eutrophisation. Les tensioactifs biologiques (BioS) constituent une alternative écologique, offrant une efficacité fonctionnelle, une biodégradabilité élevée et une toxicité réduite (Inès et al., 2023). Les enzymes, notamment les hydrolases, sont incorporées dans les lessives, liquides vaisselle et détergents industriels pour améliorer l'élimination des salissures, réduire la consommation énergétique et limiter l'usage de produits chimiques nocifs tels que les phosphates et agents de blanchiment (Al-Ghanayem, 2024). Dans ce contexte, Les lipases sont largement appliquées dans l'industrie comme additifs dans les formulations de lessives pour leur biodégradabilité, leur innocuité, leur production à grande échelle et la diversité de leurs substrats. Le choix des lipases compatibles avec les détergents se fonde sur des critères tels que l'efficacité catalytique, la stabilité, l'aptitude à éliminer les taches et la compatibilité avec les différents composants de la formulation (Yildiz-Dalginli, 2025). En plus de l'amélioration de l'efficacité du nettoyage, les détergents à base de lipases présentent une capacité supérieure d'élimination des taches, requièrent des concentrations enzymatiques plus faibles et conservent leur activité catalytique après application (Ali et al., 2023). L'optimisation du processus de détachage repose sur l'action combinée de la catalyse enzymatique et de l'activité des tensioactifs. Les lipases catalysent l'hydrolyse des taches d'origine lipidique, tandis que les tensioactifs se lient aux résidus formés et en facilitent l'élimination des tissus (Dab et al., 2023). Les lipases sont particulièrement efficaces pour la dégradation et l'élimination des résidus et taches d'huile, de beurre et de sauces. Les lipases actives à froid (CLPs) ont récemment suscité un intérêt dans l'industrie des détergents en raison de leur biodégradabilité, de leur potentiel catalytique élevé, malgré une faible stabilité thermique associé à une stabilité thermique faible. Des lipases produites par *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas paucimobilis* et *Bacillus sp. B207* sont intégrées aux formulations de détergents. L'utilisation combinée des lipases avec oxydoréductases permet de réduire la

quantité de tensioactifs nécessaires, contribuant ainsi à des formulations plus respectueuses de l'environnement (**Bhatt et al., 2022**).

Les lipases naturelles présentent souvent des limites en termes d'activité, de sélectivité énantiospécifique et de stabilité thermique, qui ne répondent pas aux besoins industriels et de la recherche. Dans le contexte des avancées continue du génie génétique et du génie protéique, le développement de stratégies efficaces de modification moléculaire des enzymes constitue un objectif majeur de l'ingénierie enzymatique (**Xu et al., 2025**). Les modifications génétiques constituent une approche puissante pour optimiser les lipases, permettant des améliorations significatives de leur activité, de leur stabilité thermique et de leur adaptabilité aux différents substrats (**Majumder et al., 2025**). Les outils moléculaires et les avancées en technologie de l'ADN ont permis de développer et produire des enzymes et leurs variantes à grande échelle, sous des formes purifiées et bien caractérisées, facilitant leur application dans divers procédés et produits industriels, notamment les détergents (**Vojnovic et al., 2024**).

### 4.3.3 Conclusion

L'étude menée sur la lipase AS12 a permis de mettre en évidence l'influence déterminante des paramètres nutritionnels (sources de carbone et d'azote) et physico-chimiques (pH, température, agitation, durée d'incubation) sur le rendement enzymatique. L'optimisation de ces facteurs a conduit à une augmentation significative de l'activité enzymatique, suivie d'une purification partielle et d'une caractérisation biochimique révélant une stabilité dans des conditions proches de la neutralité et à température modérée. La lipase AS12 présente une tolérance sélective vis-à-vis de certains ions métalliques, solvants organiques et surfactants, ainsi qu'une compatibilité avec divers détergents commerciaux, confirmant son potentiel d'intégration dans des formulations de nettoyage. L'ensemble de ces résultats souligne l'intérêt biotechnologique de cette enzyme et ouvre des perspectives pour des applications écologiquement durables.

## *Conclusion générale et perspectives*

## Conclusion générale et perspectives

Dans un contexte mondial marqué par la recherche de solutions durables, économiques et respectueuses de l'environnement, les enzymes microbiennes (biocatalyseurs, biosurfactants) se présentent comme des alternatives stratégiques aux catalyseurs chimiques conventionnels. Leurs propriétés biochimiques et catalytiques, à la fois spécifiques et polyvalentes, en font un choix privilégié pour de nombreux secteurs industriels tels que l'agroalimentaire, la pharmaceutique, la fabrication des détergents, la bioremédiation et la production de biodiesel.

Les actinomycètes se distinguent par leur richesse métabolique et leur aptitude à synthétiser une vaste gamme d'enzymes hydrolytiques présentant un intérêt majeur pour les biotechnologies. Ces caractéristiques en font des microorganismes particulièrement prometteurs pour l'exploitation dans diverses applications industrielles. L'étude de la biodiversité des actinomycètes dans les sols arides et semi-arides algériens s'inscrit dans ce contexte, ces environnements recelant des souches adaptées, potentiellement productrices d'enzymes originales et performantes.

Dans le cadre de la recherche d'enzymes d'intérêt biotechnologique, nous avons entrepris l'isolement et l'évaluation du potentiel enzymatique d'actinomycètes autochtones issus de sols arides et semi-arides (rhizosphériques) de l'ouest algérien.

Lors d'une première étape, l'échantillonnage de sols provenant de trois régions (Saïda, Naâma et Béchar) a permis l'isolement de 94 souches d'actinomycètes, révélant une biodiversité morphologique notable et confirmant l'adaptation de ces micro-organismes aux conditions édaphiques extrêmes. Parmi ces souches, l'isolat AS12, identifié comme *Streptomyces sp.* AS12 (GenBank ID : PP837824), a été caractérisé morphologiquement, biochimiquement, physiologiquement et génétiquement.

Dans une deuxième étape, le criblage enzymatique qualitatif (initial) sur milieu solide a mis en évidence que la majorité des isolats produisent des enzymes hydrolytiques extracellulaires, notamment des amylases (75 isolats), des lipases (71 isolats) et des protéases (43 isolats), certaines souches (27 isolats) montrant même une coproduction de ces trois enzymes. Ces résultats témoignent de l'aptitude enzymatique élevée des actinomycètes, susceptible d'être valorisé dans diverses applications.

Au cours de la troisième étape, la production de lipase par la souche AS12 a été étudiée en fermentation submergée. L'optimisation des conditions de culture selon l'approche « une variable à la fois » (OVAT) a permis d'augmenter significativement le rendement initial, de  $70 \pm 2,6$  U/mL. Le Tween 80 et l'extrait de levure se sont révélés respectivement comme les sources de carbone et d'azote les plus efficaces pour la biosynthèse enzymatique. Les conditions optimales ont été établies à pH 7,0, 40 °C, après 48 h d'incubation avec agitation à 140 tr/min. La lipase AS12 a ensuite été partiellement purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium (80 %), donnant une activité spécifique de 118,43 U/mg et un facteur de purification de 1,36. L'enzyme présente une activité optimale à pH 7 avec une stabilité élevée entre pH 6 et 8 (70–80 %), une stabilité thermique maximale à 40 °C dans l'intervalle 30–45 °C, ainsi qu'une tolérance variable vis-à-vis des agents chimiques, incluant une activation notable en présence de certains ions métalliques ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) et une bonne stabilité en solvants organiques tels que l'éthanol et le méthanol. L'étude cinétique a révélé une constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de 6,34 mM et une  $V_{max}$  de 0,21 mM/min.

Sur le plan biotechnologique, la lipase AS12 s'est révélée compatible avec plusieurs formulations de détergents commerciaux. L'ajout de l'enzyme a significativement amélioré la performance nettoyante, notamment sur des taches lipidiques telles que le chocolat. Ces résultats mettent en évidence le potentiel de la lipase AS12 comme bio-additif pour l'industrie des détergents, tout en ouvrant perspectives pour des applications dans d'autres secteurs industriels.

En conclusion, ce travail met en lumière la richesse, l'importance des actinomycètes autochtones comme réservoir d'enzymes d'intérêt biotechnologique et le rôle des sols arides algériens en tant qu'écosystèmes stratégiques pour la découverte de nouveaux taxons, de biomolécules ou de micro-organismes présentant des propriétés intéressantes. La souche AS12, productrice de lipase, illustre le potentiel de ces micro-organismes et ouvre la voie à la valorisation d'autres activités enzymatiques détectées, favorisant le développement de biocatalyseurs pour des applications environnementales durables.

### **Perspectives**

Les résultats de cette étude suggèrent plusieurs axes pour de futures investigations :

- Étudier les autres activités hydrolytiques observées (amylase, protéase) afin d'exploiter leur potentiel biotechnologique.

- Mettre en œuvre des approches statistiques, telles que la RSM et les plans factoriels, pour optimiser la production de la lipase AS12.
- Tester l'application de la lipase AS12 dans différents domaines industriels.
- Obtenir une enzyme hautement purifiée pour des études plus poussées.
- Réaliser l'électrophorèse SDS-PAGE.
- Effectuer des études de docking moléculaire
- Améliorer la stabilité et la réutilisabilité de l'enzyme par des techniques d'immobilisation ou de capitalisation.

## **Références bibliographiques**

**Références bibliographiques**

Abada, E. A. (2019). Application of microbial enzymes in the dairy industry. In *Enzymes in food biotechnology* (pp. 61-72). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00005-0>.

Abdelaziz, A. A., Abo-Kamar, A. M., Elkotb, E. S., & Al-Madboly, L. A. (2025). Microbial lipases: advances in production, purification, biochemical characterization, and multifaceted applications in industry and medicine. *Microbial Cell Factories*, 24(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02664-6>.

Abdessamed, D., & Abderrazak, B. (2019). Coupling HEC-RAS and HEC-HMS in rainfall–runoff modeling and evaluating floodplain inundation maps in arid environments: case study of Ain Sefra city, Ksour Mountain. SW of Algeria. *Environmental Earth Sciences*, 78(19), 586. <https://doi.org/10.1007/s12665-019-8604-6>.

Abirami, G., Ramprasath, C., Suganthi, M., Abinaya, D. E., & Mathivanan, N. (2022). Partial purification of extracellular amylase from halotolerant actinomycetes *Streptomyces brasiliensis* MML2028. DOI: [10.18006/2022.10\(5\).1053.1068](https://doi.org/10.18006/2022.10(5).1053.1068)

Abo-Kamer, A. M., Abdelaziz, A. A., Elkotb, E. S., & Al-Madboly, L. A. (2025). Production and characterization of a promising microbial-derived lipase enzyme targeting BCL-2 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Microbial Cell Factories*, 24(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02671-7>.

AÇIKEL, Ü., ERŞAN, M., & AÇIKEL, Y. S. (2011). The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. delemar*. *Turkish Journal of Biology*, 35(1), 35-44. doi:10.3906/biy-0902-14

Adetunji, A. I., & Olaniran, A. O. (2021). Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: a review. *Brazilian journal of microbiology*, 52(3), 1257-1269. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00503-5>.

Adetunji, A. I., Olaitan, M. O., Erasmus, M., & Olaniran, A. O. (2023). Microbial proteases: A next generation green catalyst for industrial, environmental and biomedical sustainability. *Food Materials Research*, 3(1). doi: [10.48130/FMR-2023-0012](https://doi.org/10.48130/FMR-2023-0012).

Agrawal, R. (2024). *Textbook of industrial microbiology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-97-9582-6>.

- Ahmad, M. A., Isah, U., Raubilu, I. A., Muhammad, S. I., & Ibrahim, D. (2019). An overview of the enzyme: Amylase and its industrial potentials. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 12(1), 352-358. <http://dx.doi.org/10.4314/bajopas.v12i1.53S>.
- Akhter, K., Karim, I., Aziz, B., Bibi, A., Khan, J., & Akhtar, T. (2022). Optimization and characterization of alkaliphilic lipase from a novel *Bacillus cereus* NC7401 strain isolated from diesel fuel polluted soil. *Plos one*, 17(8), e0273368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273368>.
- Akram, F., Fatima, T., & ul Haq, I. (2024). Auto-induction, biochemical characterization and application of a novel thermo-alkaline and detergent-stable lipase (S9 peptidase domain) from *Thermotoga petrophila* as cleaning additive and degrading oil/fat wastes. *Bioorganic Chemistry*, 151, 107658. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107658>.
- Akram, F., Mir, A. S., Haq, I. U., & Roohi, A. (2023). An appraisal on prominent industrial and biotechnological applications of bacterial lipases. *Molecular biotechnology*, 65(4), 521-543. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00592-z>.
- Al Mohaini, M., Farid, A., Muzammal, M., Ghazanfar, S., Dadrasnia, A., Alsalman, A. J., & Ismail, S. (2022). Enhancing lipase production of *Bacillus salmalaya* strain 139SI using different carbon sources and surfactants. *Applied Microbiology*, 2(1), 237-247. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010017>.
- Alabdallal, A. H., ALanazi, N. A., Aldakeel, S. A., AbdulAzeez, S., & Borgio, J. F. (2020). Molecular, physiological, and biochemical characterization of extracellular lipase production by *Aspergillus niger* using submerged fermentation. *PeerJ*, 8, e9425. <http://doi.org/10.7717/peerj.9425>.
- Al-Agamy, M. H., Alhuzani, M. R., Kelany, M. S., & Hamed, M. M. (2021). Production and Partial Characterization of  $\alpha$ -Amylase Enzyme from Marine Actinomycetes. *BioMed research international*, 2021(1), 5289848. <https://doi.org/10.1155/2021/5289848>.
- Albayati, S. H., Masomian, M., Ishak, S. N. H., Mohamad Ali, M. S. B., Thean, A. L., Mohd Shariff, F. B., ... & Raja Abd Rahman, R. N. Z. (2020). Main structural targets for engineering lipase substrate specificity. *Catalysts*, 10(7), 747. <https://doi.org/10.3390/catal10070747>.
- Al-Dhabaan, F. A. (2024). Dissolution of clotted blood from slaughtered cattle by alkaline protease produced by *Streptomyces violaceoruber* isolated from saline soil in Saudi

Arabia. *Journal of King Saud University-Science*, 36(8), 103300.  
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103300>.

Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., Arasu, M. V., Duraipandiyar, V., & Ponmurugan, K. (2019). Characterization and fermentation optimization of novel thermo stable alkaline protease from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-82 from the Saudi Arabian environment for eco-friendly and industrial applications. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 1258-1264. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.11.011>.

Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., Arasu, M. V., Duraipandiyar, V., & Ponmurugan, K. (2020). Characterization and fermentation optimization of novel thermo stable alkaline protease from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-82 from the Saudi Arabian environment for eco-friendly and industrial applications. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 1258-1264. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.11.011>.

Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., Arasu, M. V., Duraipandiyar, V., & Ponmurugan, K. (2020). Isolation and purification of starch hydrolysing amylase from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 obtained from the Jazan region of Saudi Arabia with industrial applications. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 1226-1232. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.11.018>.

Al-Ghanayem, A. A. (2024). Recent developments and future prospects of extremozymes in detergent applications. *Afr J Microbiol Res*, 18(7), 137-146. DOI: 10.5897/AJMR2024.9758

Al-Ghanayem, A. A., & Joseph, B. (2020). Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(7), 2871-2882. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10429-x>.

Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., & Lee, I. J. (2023). The recent advances in the utility of microbial lipases: A review. *Microorganisms*, 11(2), 510. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020510>.

Al-Limoun, M. O., Khleifat, K. M., Alsharafa, K. Y., Qaralleh, H. N., & Alrawashdeh, S. A. (2019). Purification and characterization of a mesophilic organic solvent tolerant lipase produced by *Acinetobacter* sp. K5b4. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37(2), 139-151. <https://doi.org/10.1080/10242422.2018.1506445>.

- Al-Quwaie, D. A. (2024). The role of Streptomyces species in controlling plant diseases: a comprehensive review. *Australasian Plant Pathology*, 53(1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s13313-023-00959-z>.
- Aly, M. M., Tork, S., Al-Garni, S. M., & Nawar, L. (2012). Production of lipase from genetically improved Streptomyces exfoliates LP10 isolated from oil-contaminated soil. *Afr J Microbiol Res*, 6(6), 1125-1137. DOI: 10.5897/AJMR11.1123
- Ammasi, R., Victor, J. S., Chellan, R., & Chellappa, M. (2020). Alkaline protease for an efficacious rehydration of skin matrix by a novel Bacillus crolab MTCC 5468 in sustainable leather production: a green approach. *Biotechnology Letters*, 42(2), 249-267. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02769-0>.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., & Manogaran, G. P. (2016). An introduction to actinobacteria. *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*, 1, 388. DOI: 10.5772/62329
- Anbalagan, R., & Sivakami, R. (2021). Enzymatic and antimicrobial activities of Actinomycetes species obtained from Mayanur Dam, Tamil Nadu, India. DOI: 10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.no1.154
- Angelin, J., & Kavitha, M. (2022). Extremophilic fungal lipases: Screening, purification, assay, and applications. In *Extremophilic Fungi: Ecology, Physiology and Applications* (pp. 395-438). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-4907-3\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-16-4907-3_18).
- Angst, G., Mueller, K. E., Nierop, K. G., & Simpson, M. J. (2021). Plant-or microbial-derived? A review on the molecular composition of stabilized soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 156, 108189. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108189>.
- Antido, J. W. A., & Climacosa, F. M. M. (2022). Enhanced Isolation of Streptomyces from Different Soil Habitats in Calamba City, Laguna, Philippines using a Modified Integrated Approach. *International Journal of Microbiology*, 2022(1), 2598963. <https://doi.org/10.1155/2022/2598963>.
- Aouar, L., Boukelloul, I., & Benadjila, A. (2019). PGPR traits of rhizospheric Nocardiosis strains isolated from Algerian soils. In *Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration* (pp. 1293-1300). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-51210-1\\_205](https://doi.org/10.1007/978-3-030-51210-1_205).

- Aouar, L., Lerat, S., Ouffroukh, A., Boulahrouf, A., & Beaulieu, C. (2012). Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(2), 165-176. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.681396>.
- Araujo, R., Gupta, V. V., Reith, F., Bissett, A., Mele, P., & Franco, C. M. (2020). Biogeography and emerging significance of Actinobacteria in Australia and Northern Antarctica soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 146, 107805. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107805>.
- Arifiyanto, A., Surtiningsih, T., Agustina, D., & Alami, N. H. (2020). Antimicrobial activity of biosurfactants produced by actinomycetes isolated from rhizosphere of Sidoarjo mud region. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101513. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101513>.
- Arpigny, J. L., & Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical journal*, 343(1), 177-183. <https://doi.org/10.1042/bj3430177>.
- Ashraf, M., Hussain, N., Baqar, Z., Kumar, A., Ferreira, L. F. R., & Iqbal, H. M. (2023). Bioprospecting microbial proteases in various industries/sectors. In *Microbial biomolecules* (pp. 301-324). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99476-7.00013-2>.
- Ayaz, B., Ugur, A., & Boran, R. (2015). Purification and characterization of organic solvent-tolerant lipase from *Streptomyces* sp. OC119-7 for biodiesel production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 103-108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.11.007>.
- Ayoib, A., Gopinath, S. C., Yahya, A. R. M., & Zakaria, L. (2024). Coal-vitamin medium for improved scheme of isolating biosurfactant-producing actinomycetes of rare species from soil samples. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(11), 11863-11887. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03691-8>.
- Ayoib, A., Gopinath, S. C., Zambry, N. S., & Yahya, A. R. M. (2024). Screening biosurfactant-producing actinomycetes: Identification of *Streptomyces* sp. RP1 as a potent species for bioremediation. *Journal of Basic Microbiology*, 64(4), 2300585. <https://doi.org/10.1002/jobm.202300585>.
- Ayuningrum, D., & Jati, O. (2021). Screening of actinobacteria-producing amylolytic enzyme in sediment from *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) ponds in Rembang District, Central

Java, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(4). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220427>.

Ayuningrum, D., Sabdaningsih, A., & Jati, O. E. (2022). The potential of phylogenetically diverse culturable Actinobacteria from *Litopenaeus vannamei* pond sediment as extracellular proteolytic and lipolytic enzyme producers. *Tropical life sciences research*, 33(3), 165. doi: 10.21315/tlsr2022.33.3.10

Babu, A. S., & Bhaskara Rao, K. V. (2022). Isolation of Actinobacteria from seaweeds. In *Methods in Actinobacteriology* (pp. 83-88). New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_14).

Babu, S., Rani, A. S., Ambikapathy, V., Prakash, P., & Anbukumaran, A. (2022). Isolation of Actinobacteria from Coral Reef. In *Methods in Actinobacteriology* (pp. 31-34). New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_7).

Baena A, Orjuela A, Rakshit SK, Clark JH (2022) Enzymatic hydrolysis of waste fats, oils and greases (FOGs): status, prospective, and process intensification alternatives. *Chem Eng Process Process Intensif* 175:108930. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2022.108930>.

Balagurunathan, R., Radhakrishnan, M., Shanmugasundaram, T., Gopikrishnan, V., Jerrine, J., Balagurunathan, R., ... & Jerrine, J. (2020). Sample collection, isolation, and diversity of Actinobacteria. *Protocols in Actinobacterial Research*, 1-24. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0728-2>.

Balaji, L., Chittoor, J. T., & Jayaraman, G. (2020). Optimization of extracellular lipase production by halotolerant *Bacillus* sp. VITL8 using factorial design and applicability of enzyme in pretreatment of food industry effluents. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(7), 708-716. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1734936>.

Balan, A., Ibrahim, D., Abdul Rahim, R., & Ahmad Rashid, F. A. (2012). Purification and characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra. *Enzyme research*, 2012(1), 987523. doi: [10.1155/2012/987523](https://doi.org/10.1155/2012/987523)

Baltaci, M. O., Orak, T., Taskin, M., Adiguzel, A., & Ozkan, H. (2020). Enhancement of amylase and lipase production from *Bacillus licheniformis* 016 using waste chicken feathers as peptone source. *Waste and Biomass Valorization*, 11(5), 1809-1819. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0468-6>.

- Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 33(2), 119-143. <https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1408256>.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80(1), 1-43. doi:10.1128/MMBR.00019-15.
- Barzkar, N. (2020). Marine microbial alkaline protease: an efficient and essential tool for various industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1216-1229. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072>.
- Bekhira, A., Habi, M., & Morsli, B. (2019). La gestion des risques d'inondations et aménagement des cours d'eaux dans les zones urbaines: cas de la ville de Bechar. *Larhyss Journal*, (37), 75-92.
- Bellebcir, A., Merouane, F., Chekroud, K., Bounabi, H., Vasseghian, Y., Kamyab, H., ... & Berkani, M. (2023). Bioprospecting of biosurfactant-producing bacteria for hydrocarbon bioremediation: Optimization and characterization. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 40(10), 2497-2512. <https://doi.org/10.1007/s11814-023-1418-y>.
- Belyagoubi, L., Belyagoubi-Benhammou, N., Jurado, V., Dupont, J., Lacoste, S., Djebbah, F., ... & Saiz-Jimenez, C. (2018). Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.47.2.2148>.
- Benaradj, A., Boucherit, H., Bouderbala, A., & Hasnaoui, O. (2021). Biophysical effects of evapotranspiration on steppe areas: A case study in Naâma Region (Algeria). In *Climate Change in Asia and Africa-Examining the Biophysical and Social Consequences, and Society's Responses*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97614>.
- Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., & Ahmane, Z. (2019). Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 706-712. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.03.008>.
- Benslama, A., Benbrahim, F., Rym-Gadoum, L., Gómez-Lucas, I., Mordan-Vidal, M. M., Navarro-Pedreño, J., & Bech-Borrás, J. (2024). Soil carbon storage under different types of

- arid land use in Algeria. *Environmental Geochemistry and Health*, 46(9), 330. <https://doi.org/10.1007/s10653-024-02036-w>.
- Bentabet, A., Azzaz, H., Emblanch, C., & Benamina, B. (2019). The impact of agricultural development on karstic groundwater of the Saïda Mountains, Algeria. *Rudarsko-geološko-naftni zbornik*, 34(4). <https://doi.org/10.17794/rgn.2019.4.10>.
- Bentekhici, N., Rabehi, W., Bouhlala, M. A., Benharrats, F., Karoui, M. S., Benhamouda, F., & Zegrar, A. (2023). Land cover changes mapping of the west-Algerian territory: a multiscale data analysis for the estimation of the sustainable goal 15.3. 1. *Environmental Earth Sciences*, 82(18), 428. <https://doi.org/10.1007/s12665-023-11078-9>.
- Bhan, C., & Singh, J. (2020). Role of microbial lipases in transesterification process for biodiesel production. *Environmental Sustainability*, 3(3), 257-266. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00119-9>.
- Bhandari, S., Poudel, D. K., Marahatha, R., Dawadi, S., Khadayat, K., Phuyal, S., ... & Parajuli, N. (2021). Microbial enzymes used in bioremediation. *Journal of Chemistry*, 2021(1), 8849512. <https://doi.org/10.1155/2021/8849512>.
- Bharathi, D., & Rajalakshmi, G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101368. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101368>.
- Bhatt, P., Ahmad, S., Joshi, S., & Bhatt, K. (2022). Recent advancement in microbial enzymes and their industrial applications. In *Industrial applications of microbial enzymes* (pp. 1-17). CRC Press. DOI: 10.1201/9781003202998-1.
- Bilal, M., & Iqbal, H. M. (2020). State-of-the-art strategies and applied perspectives of enzyme biocatalysis in food sector—current status and future trends. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(12), 2052-2066. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1627284>.
- Bora, N. (2014). Characterization of actinomycetes from smear ripened cheeses—A polyphasic approach. In *Diversity, Dynamics and Functional Role of Actinomycetes on European Smear Ripened Cheeses* (pp. 51-101). Cham: Springer International Publishing. DOI 10.1007/978-3-319-10464-5\_3

- Boran, R. (2018). Detergent compatible extracellular lipase from *Streptomyces cellulosa* Au-10: A green alternative for the detergent industry. *Journal of Surfactants and Detergents*, 21(4), 565-573. <https://doi.org/10.1002/jsde.12049>.
- Boran, R., Ugur, A., Sarac, N., & Ceylan, O. (2019). Characterisation of *Streptomyces violascens* OC125-8 lipase for oily wastewater treatment. *3 Biotech*, 9(1), 5. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1539-x>.
- Bouarfa, S., Youb, O., Khaouani, B., Berrabah, D., & Djoudi, W. (2022). Assessing Aeolian Sand Potential in Sefra Region-South-Western of Algeria. *Technium Soc. Sci. J.*, 30, 710. DOI: [10.47577/tssj.v30i1.6169](https://doi.org/10.47577/tssj.v30i1.6169).
- Boubakri, K., Idoui, T., Montanari, C., Barbieri, F., Gardini, F., & Vignolo, G. (2022). Identification, safety and technological characteristics of *Weissella* strains from traditional Southwestern Algerian kaddid. *NOVA BIOTECHNOLOGICA ET CHIMICA*, 21(2), 1-14. DOI: 10.36547/nbc.1269.
- Boubekri, K., Soumare, A., Mardad, I., Lyamlouli, K., Ouhdouch, Y., Hafidi, M., & Kouisni, L. (2022). Multifunctional role of Actinobacteria in agricultural production sustainability: A review. *Microbiological Research*, 261, 127059. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127059>.
- Boughachiche, F., Zerizer, H., Tiouche, A., Gramez, A., Ait Kaki, A., & Rachedi, K. (2024). Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Streptomyces* sp. using sardine viscera. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 23(4), 519-536. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2024.131265>.
- Boukelloul, I., Aouar, L., BOUZIANI, M. C., Zellagui, A., Dourdour, M., & Necib, Y. (2023). Antagonism and plant growth promoting traits of actinomycetes isolated from the rhizosphere of halophyte *Atriplex halimus* L. *Notulae Scientia Biologicae*, 15(1), 11437-11437. DOI:10.15835/nsb15111437
- Boukelloul, I., Aouar, L., Cherb, N., Carvalho, M. F., Oliveira, R. S., Akkal, S., ... & Necib, Y. (2024). Actinobacteria isolated from soils of arid Saharan regions display simultaneous antifungal and plant growth promoting activities. *Current Microbiology*, 81(10), 327. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03851-1>.
- Bouras, N., Yekkour, A., Smaoui, S., Mellouli, L., & Barakate, M. (2021). Actinobacterial abundance and interrelationships in ecosystems of Northwest Africa. *Microbes in Microbial*

*Communities: Ecological and Applied Perspectives*, 337-370. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-5617-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-16-5617-0_16).

Bredai, R., Belhaj Ben Romdhane, I., Bouchaala, I., Srih Belghith, K., & Belghith, H. (2021). Purification of *Bacillus licheniformis* Lipase and its Application as an Additive in Detergent for Destaining. *Journal of Surfactants and Detergents*, 24(5), 835-853. DOI 10.1002/jsde.12514

Cadirci, B. H., Yasa, I., & Kocyigit, A. (2016). *Streptomyces* sp. TEM 33 possesses high lipolytic activity in solid-state fermentation in comparison with submerged fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(1), 23-29. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.970693>.

Campion, E. M., Walls, D., & Loughran, S. T. (2023). Protein Quantitation and Analysis of Purity. In *Protein Chromatography: Methods and Protocols* (pp. 305-347). New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3362-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3362-5_16).

Castañeda-Cisneros, Y. E., Mercado-Flores, Y., Anducho-Reyes, M. A., Álvarez-Cervantes, J., Ponce-Lira, B., Evangelista-Martínez, Z., & Téllez-Jurado, A. (2020). Isolation and selection of *Streptomyces* species from semi-arid agricultural soils and their potential as producers of xylanases and cellulases. *Current Microbiology*, 77(11), 3460-3472. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02160-7>.

Chaabane Chaouch, F., Bouras, N., Mokrane, S., Bouznada, K., Zitouni, A., Pötter, G., ... & Sabaou, N. (2017). *Planomonospora algeriensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from a Saharan soil of Algeria. *Antonie van leeuwenhoek*, 110(2), 245-252. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0795-1>.

Chai, Y., Li, Z., Zheng, W., Yang, X., He, J., Hu, S., ... & Huang, A. (2025). Dissecting the High Esterase/Lipase Activity and Probiotic Traits in *Lactiplantibacillus plantarum* B22: A Genome-Guided Functional Characterization. *Foods*, 14(13), 2354. <https://doi.org/10.3390/foods14132354>.

Chakraborty, B., Kumar, R. S., Almansour, A. I., Gunasekaran, P., & Nayaka, S. (2022). Bioprospection and secondary metabolites profiling of marine *Streptomyces levis* strain KS46. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(2), 667-679. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.055>.

- Chakraborty, T., Roy, S., Mandal, D., Begum, J., & Sengupta, A. (2022). Isolation of Actinobacteria from Water Sources. In *Methods in Actinobacteriology* (pp. 7-12). New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_2).
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial cell factories*, 19(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.
- Charousová, I., Medo, J., Hleba, L., Císarová, M., & Javoreková, S. (2019). Antimicrobial activity of actinomycetes and characterization of actinomycin-producing strain KRG-1 isolated from Karoo, South Africa. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000217249>.
- Chauhan, J. V., Mathukiya, R. P., Singh, S. P., & Gohel, S. D. (2021). Two steps purification, biochemical characterization, thermodynamics and structure elucidation of thermostable alkaline serine protease from *Nocardiosis alba* strain OM-5. *International journal of biological macromolecules*, 169, 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.061>.
- Chen, M., Jin, T., Nian, B., & Cheng, W. (2024). Solvent tolerance improvement of lipases enhanced their applications: state of the art. *Molecules*, 29(11), 2444. <https://doi.org/10.3390/molecules29112444>.
- Chen, X., Jiang, Y., Li, Q., Han, L., & Jiang, C. (2016). Molecular phylogenetic identification of Actinobacteria. D. Dharumadurai, & Y. Jiang, *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*, 141-74. <http://dx.doi.org/10.5772/62029>.
- Cho, S. S., Park, D. J., Simkhada, J. R., Hong, J. H., Sohng, J. K., Lee, O. H., & Yoo, J. C. (2012). A neutral lipase applicable in biodiesel production from a newly isolated *Streptomyces* sp. CS326. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(1), 227-234. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0598-8>.
- Costa-Gutierrez, S. B., Saez, J. M., Aparicio, J. D., Raimondo, E. E., Benimeli, C. S., & Polti, M. A. (2021). Glycerol as a substrate for actinobacteria of biotechnological interest: Advantages and perspectives in circular economy systems. *Chemosphere*, 279, 130505. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130505>.
- Costantini, A., & Califano, V. (2021). Lipase immobilization in mesoporous silica nanoparticles for biofuel production. *Catalysts*, 11(5), 629. <https://doi.org/10.3390/catal11050629>.

- Cruz, H., Pérez, C., Wellington, E., Castro, C., & Servín-González, L. (1994). Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene*, *144*(1), 141-142. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90220-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90220-8).
- Cui, Y., Fang, L., Deng, L., Guo, X., Han, F., Ju, W., ... & Zhang, X. (2019). Patterns of soil microbial nutrient limitations and their roles in the variation of soil organic carbon across a precipitation gradient in an arid and semi-arid region. *Science of the Total Environment*, *658*, 1440-1451. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.289>.
- Cui, Y., Wang, X., Zhang, X., Ju, W., Duan, C., Guo, X., ... & Fang, L. (2020). Soil moisture mediates microbial carbon and phosphorus metabolism during vegetation succession in a semiarid region. *Soil Biology and Biochemistry*, *147*, 107814. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107814>.
- da Silva, J. L., Sales, M. B., de Castro Bizerra, V., Nobre, M. M. R., de Sousa Braz, A. K., da Silva Sousa, P., ... & Santos, J. C. S. D. (2023). Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Prospects as an industrial biocatalyst for biotechnological applications. *Fermentation*, *9*(7), 581. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070581>.
- Dab, A., Hasnaoui, I., Mechri, S., Allala, F., Bouacem, K., Noiriél, A., ... & Jaouadi, B. (2023). Biochemical characterization of an alkaline and detergent-stable Lipase from *Fusarium annulatum* Bugnicourt strain CBS associated with olive tree dieback. *Plos one*, *18*(5), e0286091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286091>.
- Daigham, G. E., & Mahfouz, A. Y. (2020). Isolation, characterization, and screening of actinomycetes producing bioactive compounds from Egyptian soil. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, *19*(4), 381-390. DOI: 10.4103/epj.epj\_44\_20
- Darwish, A. M. G., Abo Nahas, H. H., Korra, Y. H., Osman, A. A., El-Kholy, W. M., Reyes-Córdova, M., ... & Abdel-Azeem, A. M. (2022). Fungal lipases: insights into molecular structures and biotechnological applications in medicine and dairy industry. In *Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 2: Bioprospecting for Biomolecules* (pp. 461-514). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-85603-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-85603-8_13).
- Das, P., Singh, S. K., Singh, P., Zeyad, M. T., Aamir, M., & Upadhyay, R. S. (2021). Actinomycetes as biostimulants and their application in agricultural practices. In *Microbiome*

*stimulants for crops* (pp. 267-282). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822122-8.00021-2>.

Das, S. (2012). Microbes from Extreme Environment: Molecular Identification Procedures. In *Analyzing Microbes: Manual of Molecular Biology Techniques* (pp. 153-168). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-642-34410-7\_12.

David, M. L. R., Innasimuthu, G. M., Rajaram, S. K., & Nooruddin, T. (2022). An endophytic *Streptomyces* sp. DARP-7 isolated from coastal lichen and enhancement of its antibacterial metabolite production using response surface methodology. *South African Journal of Botany*, 151, 636-648. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.022>.

Dede, A., Güven, K., & Şahin, N. (2020). Isolation, plant growth-promoting traits, antagonistic effects on clinical and plant pathogenic organisms and identification of actinomycetes from olive rhizosphere. *Microbial pathogenesis*, 143, 104134. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104134>.

Demirkan, E., Çetinkaya, A. A., & Abdou, M. (2021). Lipase from new isolate *Bacillus cereus* ATA179: optimization of production conditions, partial purification, characterization and its potential in the detergent industry. *Turkish Journal of Biology*, 45(3), 287-300. <https://doi.org/10.3906/biy-2101-22>.

Deniz, I., Zihnioglu, F., Öncel, S. S., Hames, E. E., & Vardar-Sukan, F. (2019). Production, purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Streptomyces* sp. 2M21. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37(5), 377-387. <https://doi.org/10.1080/10242422.2019.1568415>.

Devanshi, S., Shah, K. R., Arora, S., & Saxena, S. (2021). Actinomycetes as an environmental scrubber. In *Crude oil-new technologies and recent approaches*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.99187

Devi, R., Madhavan Nampoothiri, K., Sukumaran, R. K., Sindhu, R., & Arumugam, M. (2020). Lipase of *Pseudomonas guariconesis* as an additive in laundry detergents and transesterification biocatalysts. *Journal of basic microbiology*, 60(2), 112-125. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900326>.

Djebaili, R., Pellegrini, M., Smati, M., Del Gallo, M., & Kitouni, M. (2020). Actinomycete strains isolated from saline soils: plant-growth-promoting traits and inoculation effects on *Solanum lycopersicum*. *Sustainability*, 12(11), 4617. <https://doi.org/10.3390/su12114617>.

- Djebbouri, M., & Terras, M. (2019). Floristic diversity with particular reference to endemic, rare or endangered flora in forest formations of Saïda (Algeria). *International journal of environmental studies*. <https://doi.org/10.1080/00207233.2019.1620541>.
- Djemouai, N., Meklat, A., Gaceb-Terrak, R., Youcef, K. O. H., Nacer, A., Saadi, S. A., ... & Bouras, N. (2022). Streptomyces species from the rhizosphere of the medicinal plant Artemisia herba-alba Asso: screening for biological activities: Biological activities of rhizospheric Streptomyces strains. *Biologia*, 77(8), 2281-2299. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01070-2>.
- Djinni, I., Defant, A., Kecha, M., & Mancini, I. (2019). Actinobacteria derived from Algerian ecosystems as a prominent source of antimicrobial molecules. *Antibiotics*, 8(4), 172. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040172>.
- do Nascimento, N. N., Cansian, A. B. M., de Sousa, J. S., Negrão, F. N., Tardioli, P. W., & Vieira, A. M. S. (2025). Plants lipases: challenges, recent advances, and future prospects-a review. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1-19. <https://doi.org/10.1007/s00449-025-03164-y>.
- Do, T. T., Ngo, C. C., Do, T. T. H., & Dang, T. H. P. (2021). Biological characteristics and classification of thermophilic actinomycetes showed extracellular hydrolytic enzymes producing ability isolated from compost. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 265, p. 04008). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202126504008>.
- Donald, L., Pipite, A., Subramani, R., Owen, J., Keyzers, R. A., & Taufa, T. (2022). Streptomyces: Still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective. *Microbiology Research*, 13(3), 418-465. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030031>.
- Donzella, S., Fumagalli, A., Contente, M. L., Molinari, F., & Compagno, C. (2024). Waste cooking oil and molasses for the sustainable production of extracellular lipase by *Saitozyma flava*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 71(4), 712-720. DOI: 10.1002/bab.2570
- dos Santos Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253-262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>.

- Du, M., Hou, Z., Liu, L., Xuan, Y., Chen, X., Fan, L., ... & Xu, B. (2022). Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 1028691. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1028691>.
- El-Naggar, N. E. A. A., & Hamouda, R. A. (2016). Antimicrobial potentialities of *Streptomyces lienomycini* NEAE-31 against human pathogen multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Pharmacology*, *12*(8), 769-788. DOI: 10.3923/ijp.2016.769.788
- El-Sayed, M. H., Gomaa, A. E. R. F., Atta, O. M., & Hassane, A. M. (2024). Characteristics and kinetics of thermophilic actinomycetes' amylase production on agro-wastes and its application for ethanol fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *40*(8), 255. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04009-8>.
- Enespa, Chandra, P., & Singh, D. P. (2023). Sources, purification, immobilization and industrial applications of microbial lipases: an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *63*(24), 6653-6686. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2038076>
- Engelbrecht, H., & Mach, F. (1968). Isolation und Charakterisierung einer Lipase aus *Streptomyces rimosus*. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, *8*(5), 367-373. <https://doi.org/10.1002/jobm.19680080505>.
- Ezeobiora, C. E., Igbokwe, N. H., Amin, D. H., Enwuru, N. V., Okpalanwa, C. F., & Mendie, U. E. (2022). Uncovering the biodiversity and biosynthetic potentials of rare actinomycetes. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, *8*(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s43094-022-00410-y>.
- Farda, B., Djebaili, R., Vaccarelli, I., Del Gallo, M., & Pellegrini, M. (2022). Actinomycetes from caves: an overview of their diversity, biotechnological properties, and insights for their use in soil environments. *Microorganisms*, *10*(2), 453. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020453>.
- Farhan, M., Hasani, I. W., Khafaga, D. S., Ragab, W. M., Ahmed Kazi, R. N., Aatif, M., ... & Fahim, Y. A. (2025). Enzymes as Catalysts in Industrial Biocatalysis: Advances in Engineering, Applications, and Sustainable Integration. *Catalysts*, *15*(9), 891. <https://doi.org/10.3390/catal15090891>.

- Fasim, A., More, V. S., & More, S. S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current opinion in biotechnology*, 69, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>.
- Fathi, F., Mobarak Qamsari, E., Kasra Kermanshahi, R., Moosavi-Nejad, Z., & Ghashghaei, T. (2022). Optimization of lipase production by a newly isolate of *Lactobacillus Fermentum*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 46(4), 1103-1113. <https://doi.org/10.1007/s40995-022-01322-5>.
- Fatima, A., Aftab, U., Shaaban, K. A., Thorson, J. S., & Sajid, I. (2019). Spore forming Actinobacterial diversity of Cholistan Desert Pakistan: Polyphasic taxonomy, antimicrobial potential and chemical profiling. *BMC microbiology*, 19, 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1414-x>.
- Fatima, M., Ali, H., Naeem, I., Zafar, H., & Zubair, M. (2025). Advances in the Industrial production and Application of Alkaline Protease. *Medicinal and Medical Chemistry*, 2(3), 129-140. <https://doi.org/10.22034/MEDMEDCHEM.2025.533432.1039>.
- Fatima, S., Faryad, A., Ataa, A., Joyia, F. A., & Parvaiz, A. (2021). Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. *Biotechnology and applied biochemistry*, 68(3), 445-458. <https://doi.org/10.1002/bab.2019>.
- Ferdeş, M., Dincă, M. N., Moiceanu, G., Zăbavă, B. Ş., & Paraschiv, G. (2020). Microorganisms and enzymes used in the biological pretreatment of the substrate to enhance biogas production: A review. *Sustainability*, 12(17), 7205. <https://doi.org/10.3390/su12177205>
- Fernandes, C. J., Doddavarapu, B., Harry, A., Dilip, S. P. S., & Ravi, L. (2021). Isolation and identification of pigment producing actinomycete *Saccharomonospora azurea* SJCJABS01. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 14(4), 2261-2269. <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/2326>.
- Filho, D. G., Silva, A. G., & Guidini, C. Z. (2019). Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7399-7423. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>.
- Fitri, L., BESSANIA, M. A., SEPTI, N., & SUHARTONO, S. (2021). Isolation and characterization of soil actinobacteria as cellulolytic enzyme producer from Aceh Besar,

Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(11). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d221155>.

Furhan, J. (2020). Adaptation, production, and biotechnological potential of cold-adapted proteases from psychrophiles and psychrotrophs: recent overview. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00053-7>.

Gacem, M. A., Ould-El-Hadj-Khelil, A., Abd-Elsalam, K. A., & Wink, J. (2021). Actinobacteria in the Algerian Sahara: Diversity, adaptation mechanism and special unexploited biotopes for the isolation of novel rare taxa. *Biologia*, 76(12), 3787-3799. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00928-1>.

Gaonkar, S. K., & Furtado, I. J. (2022). Simultaneous purification and characterization of detergent-stable, solvent-tolerant haloextremozymes protease and lipase from *Haloferax* sp. strain GUBF 2. *Archives of Microbiology*, 204(12), 705. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03286-x>.

Gasmi, M., Kitouni, M., Carro, L., Pujic, P., Normand, P., & Boubakri, H. (2019). Chitinolytic actinobacteria isolated from an Algerian semi-arid soil: development of an antifungal chitinase-dependent assay and GH18 chitinase gene identification. *Annals of Microbiology*, 69(4), 395-405. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1426-z>.

Gemechu, G., Masi, C., Tafesse, M., & Kebede, G. (2020). A review on the bacterial alkaline proteases. *J Xidian Univ*, 14(11), 632-4. <https://doi.org/10.37896/jxu14.11/022>.

George, E., Rolf, S., & John, R. (2013). Methods of soil, plant, and water analysis: A manual for the West Asia and North Africa region. *International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)*, 244.

Ghodke, V. M., & Punekar, N. S. (2022). Environmental role of aromatic carboxylesterases. *Environmental Microbiology*, 24(6), 2657-2668. doi:10.1111/1462-2920.15774

Gimenes, N. C., Silveira, E., & Tambourgi, E. B. (2021). An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. *Separation & Purification Reviews*, 50(3), 223-243. <https://doi.org/10.1080/15422119.2019.1677249>.

Gohain, A., Manpoong, C., Saikia, R., & De Mandal, S. (2020). Actinobacteria: diversity and biotechnological applications. *Recent advancements in microbial diversity*, 217-231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821265-3.00009-8>.

- Goldring, J. D. (2019). Measuring protein concentration with absorbance, Lowry, Bradford Coomassie blue, or the Smith bicinchoninic acid assay before electrophoresis. *Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols*, 31-39.
- González, V., Vargas-Straube, M. J., Beys-da-Silva, W. O., Santi, L., Valencia, P., Beltrametti, F., & Cámara, B. (2020). Enzyme bioprospection of marine-derived actinobacteria from the Chilean coast and new insight in the mechanism of keratin degradation in *Streptomyces* sp. G11C. *Marine drugs*, 18(11), 537. <https://doi.org/10.3390/md18110537>.
- Gopinath, S. C., Anbu, P., Arshad, M. M., LakshmiPriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Chinni, S. V. (2017). Biotechnological processes in microbial amylase production. *BioMed research international*, 2017(1), 1272193. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>.
- Grudpan, K., Kamfoo, K., & Jakmune, J. (1999). Flow injection spectrophotometric or conductometric determination of ascorbic acid in a vitamin C tablet using permanganate or ammonia. *Talanta*, 49(5), 1023-1026. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00047-8](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00047-8).
- Guehria, I., Ayari, A., Degachi, N. E. H., Merzoug, A. N., & Réjiba, S. (2025). Antimicrobial activities and beta-lactamase inhibitory property of actinomycetes from Atlas forest soils in Northeastern Algeria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41(4), 137. <https://doi.org/10.1007/s11274-025-04348-0>.
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. J. A. M. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(6), 763-781. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8>.
- Gürkök, S. (2019). Microbial enzymes in detergents: a review. *Int. J. Sci. Eng. Res*, 10(9), 75-81.
- Gurkok, S., & Ozdal, M. (2021). Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from *Aeromonas caviae* LipT51 for application in detergent industry. *Protein expression and purification*, 180, 105819. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105819>.
- Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International journal of biological macromolecules*, 128, 254-267. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>.

- Habbeche, A., Saoudi, B., Jaouadi, B., Haberra, S., Kerouaz, B., Boudelaa, M., & Ladjama, A. (2014). Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *Journal of bioscience and bioengineering*, 117(4), 413-421. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.006>.
- Hafidha, B., Abdelkrim, B., Said, B., & Djamel, A. (2024). Ecological Characterization of Steppe Formations in the Naama Region (Western Algeria). DOI: 10.5772/intechopen.115130
- Hag Husein, H., Lucke, B., Bäumlér, R., & Sahwan, W. (2021). A contribution to soil fertility assessment for arid and semi-arid lands. *Soil Systems*, 5(3), 42. <https://doi.org/10.3390/soilsystems5030042>.
- Hamed, M. M., Abd rabo, M. A., & Youssif, A. M. (2021). Biosurfactant production by marine actinomycetes isolates *Streptomyces althioticus* RG3 and *Streptomyces californicus* RG8 as promising sources of antimicrobial and antifouling effects. *Microbiol Biotechnol Lett*, 49(3), 356-366. <http://dx.doi.org/10.48022/mbl.2106.06007>.
- Hamedi, J., & Poorinmohammad, N. (2017). The cellular structure of Actinobacteria. In *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (pp. 5-28). Cham: Springer International Publishing. DOI 10.1007/978-3-319-60339-1\_2.
- Hassan, A. A., & Mahmoud, A. F. (2022). Isolation, Phenotypic and Molecular Identification of Actinomycetes From Soil and Evaluation of Their Efficiency in Control of the Pathogen *Botrytis cinerea* Caused Gray Rot Disease on Eggplant. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1060, No. 1, p. 012108). IOP Publishing. doi:10.1088/1755-1315/1060/1/012108
- Hazarika, S. N., & Thakur, D. (2020). Actinobacteria. In *Beneficial microbes in agroecology* (pp. 443-476). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00021-6>.
- He, Z., Wang, Y., Bai, X., Chu, M., Yi, Y., Zhu, J., ... & Zhang, Z. (2023). Bacterial community composition and isolation of Actinobacteria from the soil of Flaming Mountain in Xinjiang, China. *Microorganisms*, 11(2), 489. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020489>.
- Helal, S. E., Abdelhady, H. M., Abou-Taleb, K. A., Hassan, M. G., & Amer, M. M. (2021). Lipase from *Rhizopus oryzae* R1: in-depth characterization, immobilization, and evaluation in

- biodiesel production. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00094-y>.
- Helmi, N. R. (2025). Exploring the diversity and antimicrobial potential of actinomycetes isolated from different environments in Saudi Arabia: a systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1568899. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1568899>.
- Hermansyah, H., Andikoputro, M. I., & Alatas, A. (2019, March). Production of lipase enzyme from *Rhizopus oryzae* by solid state fermentation and submerged fermentation using wheat bran as substrate. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2085, No. 1, p. 020013). AIP Publishing LLC. <https://doi.org/10.1063/1.5094991>.
- Hernández-Bolaños, E., Montesdeoca-Flores, D., Abreu-Yanes, E., Barrios, M. L., & Abreu-Acosta, N. (2020). Evaluating different methodologies for bioprospecting actinomycetes in Canary Islands soils. *Current Microbiology*, 77(9), 2510-2522. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02030-2>.
- Hozzein, W. N. (Ed.). (2022). *Actinobacteria: Diversity, Applications and Medical Aspects*. BoD—Books on Demand. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104699>.
- Huang, M., Chai, L., Jiang, D., Zhang, M., Jia, W., Huang, Y., & Zhou, J. (2021). Dissolved organic matter (DOM) quality drives biogeographic patterns of soil bacterial communities and their association networks in semi-arid regions. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(7), fiab083. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab083>.
- Hungund, B. S., Desai, S. S., Kamath, K. C., & Tennalli, G. B. (2022). Terrestrial Ecology of Actinobacteria. In *Actinobacteria: Ecology, Diversity, Classification and Extensive Applications* (pp. 39-54). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9_3).
- Ibnouf, E. O., Aldawsari, M. F., & Waggiallah, H. A. (2022). Isolation and extraction of some compounds that act as antimicrobials from actinomycetes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(8), 103352. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103352>.
- Ibrahim, J. A. A., Botcha, S., & Prattipati, S. D. (2025). Marine Actinomycetes: A Promising Source of Novel Therapeutics and Pharmaceutical Bioactive Compounds-A Review. *The Microbe*, 100383. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100383>.

Iftikhar, T., Majeed, H., Altaf, F., & Khalid, A. (2024). Upcycling of the industrial waste as a sustainable source of axenic fungal strain (*Aspergillus oryzae*) for scale up enzymatic production with kinetic analysis and Box–Behnken design application. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 238(1), 115-131. <https://doi.org/10.1515/zpch-2023-0311>.

Inès, M., Mouna, B., Marwa, E., & Dhouha, G. (2023). Biosurfactants as emerging substitutes of their synthetic counterpart in detergent formula: efficiency and environmental friendly. *Journal of Polymers and the Environment*, 31(7), 2779-2791. <https://doi.org/10.1007/s10924-023-02778-1>.

Innocent, M. O., Mustapha, A., Abdulsalam, M., Livinus, M. U., Samuel, J. O., Elelu, S. A., ... & Muhammad, A. S. (2024). Soil Microbes and Soil Contamination. In *Soil Microbiome in Green Technology Sustainability* (pp. 3-35). Cham: Springer Nature Switzerland. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-71844-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-031-71844-1_1).

Irfan, M., Hussain, Q., Khan, K. S., Akmal, M., Ijaz, S. S., Hayat, R., ... & Rashid, M. (2019). Response of soil microbial biomass and enzymatic activity to biochar amendment in the organic carbon deficient arid soil: a 2-year field study. *Arabian Journal of Geosciences*, 12, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12517-019-4239-x>.

Ishak, S. N. H., Masomian, M., Kamarudin, N. H. A., Ali, M. S. M., Leow, T. C., & Rahman, R. N. Z. R. A. (2019). Changes of thermostability, organic solvent, and pH stability in *Geobacillus zalihae* HT1 and its mutant by calcium ion. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2561. <https://doi.org/10.3390/ijms20102561>.

Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 390–397. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00341-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00341-5).

Jaeger, K. E., Liese, A., & Syltatk, C. (2024). Introduction to enzyme technology. In *Introduction to Enzyme Technology* (pp. 1-16). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-42999-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-031-42999-6_1).

JANATININGRUM, I., & LESTARI, Y. (2022). Enzyme production, antibacterial and antifungal activities of actinobacteria isolated from *Ficus deltoidea* rhizosphere. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(4). DOI: 10.13057/biodiv/d230429

Jedidi'ah, A. M., Setyaningsih, R., Susilowati, A. (2024). Lipase activity and identification of lipolytic bacteria from leather industrial liquid waste in Magetan Small Industrial Area,

Indonesia. *Asian Journal of Tropical Biotechnology*, 21(2). DOI <https://doi.org/10.13057/biotek/c210201>.

Jo, E., Kim, J., Lee, A., Moon, K., & Cha, J. (2021). Identification and characterization of a novel thermostable GDSL-type lipase from *Geobacillus thermocatenulatus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 483–491. <https://doi.org/10.4014/jmb.2012.12036>

Jose, P. A., Maharshi, A., & Jha, B. (2021). Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiological Research*, 246, 126708. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126708>.

Kafilzadeh, F., Dehdari, F., Kadivar, E., & Shiraz, O. B. (2012). Isolation of amylase producing aquatic Actinomycetes from the sediments of mangrove forests in south of Iran. *Afr. J. Microbiol. Res*, 6(33), 6281–6285. DOI: 10.5897/AJMR12.969.

Kamarudheen, N., & Bhaskara Rao, K. V. (2022). Isolation of Actinobacteria from Sponges. In *Methods in Actinobacteriology* (pp. 23–26). New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_5).

Kang X, Li C, Ding W et al (2023) Optimization of operating conditions in the biological enzymes for efficient waste activated sludge dewatering. *Process Saf Environ Prot* 170:545–552. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.12.046>.

Katsimpouras, C., & Stephanopoulos, G. (2021). Enzymes in biotechnology: Critical platform technologies for bioprocess development. *Current opinion in biotechnology*, 69, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.003>.

Kaur, D., & Gupta, S. (2025). Enhanced recombinant lipase production in *Pseudomonas aeruginosa* SDK-6: medium optimization using OFAT and RSM with purification and stability studies. *Folia Microbiologica*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12223-025-01248-6>.

Kendouci, M. A., Bendida, A., Mebarki, S., & Kharroubi, B. (2019). Study of the management efficiency of the drinking water supply in arid areas: case of Bechar city (southwest of Algeria). *Applied Water Science*, 9(8), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13201-019-1081-y>.

Kerouaz, B., Jaouadi, B., Brans, A., Saoudi, B., Habbeche, A., Haberra, S., ... & Ladjama, A. (2021). Purification and biochemical characterization of two novel extracellular keratinases

with feather-degradation and hide-dehairing potential. *Process Biochemistry*, 106, 137-148. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.04.009>.

Khalifa, A., & Sankaranarayanan, A. (2022). Isolation of Actinobacteria from Estuaries. In *Methods in Actinobacteriology* (pp. 19-21). New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_4).

Kharfia, B. (2022). Urban Flood Risk; Diagnosis and Proposed Management. A Case Study in Bechar City, South Western Algeria. In *International Conference on Artificial Intelligence in Renewable Energetic Systems* (pp. 511-525). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-21216-1\\_53](https://doi.org/10.1007/978-3-031-21216-1_53).

Kherouf, M., Habbeche, A., Benamia, F., Saoudi, B., Kerouaz, B., & Ladjama, A. (2021). Statistical optimization of a novel extracellular alkaline and thermostable amylase production from thermophilic *Actinomadura keratinilytica* sp. Cpt29 and its potential application in detergent industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102068. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102068>.

Khiati, D., Haouchine, F. Z., Belaroui, A., Nemer, Z., & Haouchine, A. (2021). Geochemical and geothermal characteristics of thermal springs of Saida region. *Arabian Journal of Geosciences*, 14(14), 1322. <https://doi.org/10.1007/s12517-021-07686-z>.

Khirennas, O., Mokrani, S., Behira, B., Bouras, N., Driche, E. H., & Moumen, O. (2023). Isolation, identification and screening of saharan actinomycete strain *Streptomyces fimbriatus* AC31 endowed with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 12(1), 51. <https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.12.1.51>.

Khoshakhlagh, A., Abroun, S., Aghaei, S. S., Soleimani, M., & Zolfaghari, M. R. (2022). Analysis of the A549 cell line affected by anticancer bioactive compounds of Actinomycetes isolated from saline soils. *Archives of Microbiology*, 204(10), 641. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03258-1>.

Khosravi Babadi, Z., Ebrahimipour, G., Wink, J., Narmani, A., & Risdian, C. (2021). Isolation and identification of *Streptomyces* sp. Act4Zk, a good producer of Staurosporine and some derivatives. *Letters in Applied Microbiology*, 72(2), 206-218. <https://doi.org/10.1111/lam.13415>.

- Khushboo, Kumar, P., Dubey, K. K., Usmani, Z., Sharma, M., & Gupta, V. K. (2022). Biotechnological and industrial applications of *Streptomyces* metabolites. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 16(1), 244-264. doi: 10.1002/bbb.2294
- Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., & Kot, A. M. (2021). Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*, 26(7), 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>.
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), pdb-prot102269. doi:10.1101/2024.08.30.610464v1.
- Kocabaş, D. S., Lyne, J., & Ustunol, Z. (2022). Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.013>.
- Komaki, H. (2023). Recent progress of reclassification of the genus *Streptomyces*. *Microorganisms*, 11(4), 831. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040831>.
- Kontro, M. H., & Yaradoddi, J. S. (2022). Actinomycetes in environmental applications. In *Actinobacteria: Ecology, diversity, classification and extensive applications* (pp. 247-270). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9_14).
- Kontro, M. H., Yaradoddi, J. S., Ganachari, S. V., Banapurmath, N. R., & Umesh, M. K. (2022). Actinomycetes in Agriculture and Forestry. In *Actinobacteria: Ecology, Diversity, Classification and Extensive Applications* (pp. 213-232). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9_12).
- Konwar, B. K., & Sagar, K. (2018). *Lipase: an industrial enzyme through metagenomics*. Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9781315159232>.
- Ktata, A., Karray, A., Mnif, I., & Bezzine, S. (2020). Enhancement of *Aeribacillus pallidus* strain VP3 lipase catalytic activity through optimization of medium composition using Box-Behnken design and its application in detergent formulations. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 12755-12766. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07853-x>.
- Kuepethkaew, S., Sangkharak, K., Benjakul, S., & Klomklao, S. (2017). Use of TPP and ATPS for partitioning and recovery of lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus*

vannamei) hepatopancreas. *Journal of food science and technology*, 54, 3880-3891. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2844-9>.

Kumar, A., Mukhia, S., Kumar, N., Acharya, V., Kumar, S., & Kumar, R. (2020). A broad temperature active lipase purified from a psychrotrophic bacterium of sikkim himalaya with potential application in detergent formulation. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 642. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00642>.

Kumar, P. P., Jansi, R. S., Kumar, P. S., Christhudas, I. N., Raj, J. P., Vijayakumar, A., ... & Ignacimuthu, S. (2017). Optimization of biosynthesis parameters, partial purification and characterization of extracellular lipase from soil derived *Streptomyces* sp. Loyola Lipase-1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 241-247. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.011>.

Kumar, S., Solanki, D. S., Parihar, K., Tak, A., Gehlot, P., Pathak, R., & Singh, S. K. (2021). Actinomycetes isolates of arid zone of Indian Thar Desert and efficacy of their bioactive compounds against human pathogenic bacteria. *Biologia Futura*, 72(4), 431-440. <https://doi.org/10.1007/s42977-021-00073-5>.

Kumari, A., & Rao, K. B. (2022). Isolation of Actinobacteria from Deep Sea. In *Methods in Actinobacteriology* (pp. 13-17). New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_3).

Kumari, N., Menghani, E., & Mithal, R. (2019). Bioactive compounds characterization and antibacterial potentials of actinomycetes isolated from rhizospheric soil. *J Sci Ind Res*, 78(11), 793-798.

Kummari, R., Puja, R., & Bose, K. (2022). Protein quantitation and detection. In *Textbook on cloning, expression and purification of recombinant proteins* (pp. 279-299). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-4987-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-16-4987-5_11).

Kuo, C. H., Huang, C. Y., Shieh, C. J., & Dong, C. D. (2022). Enzymes and biocatalysis. *Catalysts*, 12(9), 993. <https://doi.org/10.3390/catal12090993>.

Kurien, B. T., & Kurien, B. T. (2021). Spectrometric Determination of Protein for Electrophoresis. *Western Blotting for the Non-Expert*, 93-100. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-70684-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-70684-5_13).

- Leila, B., & El-Hafid, N. (2020). Biofertilizers and biopesticides: Microbes for sustainable agriculture. *Advances in plant microbiome and sustainable agriculture: Diversity and biotechnological applications*, 257-279. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-3208-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-15-3208-5_10).
- Lekhal, M. C., Benzaama, M. H., Kindinis, A., Mokhtari, A. M., & Belarbi, R. (2021). Effect of geo-climatic conditions and pipe material on heating performance of earth-air heat exchangers. *Renewable Energy*, 163, 22-40. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.08.044>.
- Leulmi, N., Sighel, D., Defant, A., Khenaka, K., Boulahrouf, A., & Mancini, I. (2019). Enhanced production and quantitative evaluation of nigericin from the algerian soil-living *Streptomyces youssoufiensis* SF10 strain. *Fermentation*, 5(1), 13. <https://doi.org/10.3390/fermentation501001>.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016). Morphological identification of actinobacteria. *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*, 59-86. <http://dx.doi.org/10.5772/61461>.
- Liaqat, I., Shiza, Raza, C., Andleeb, S., Safi, S. Z., & Arshad, M. (2025). Pioneering Lipase Applications in Textile Manufacturing. In *Enzymes in Textile Processing: A Climate Changes Mitigation Approach: Textile Industry, Enzymes, and SDGs* (pp. 253-272). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-97-8058-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-97-8058-7_10).
- Lim, S. Y., Steiner, J. M., & Cridge, H. (2022). Lipases: it's not just pancreatic lipase!. *American journal of veterinary research*, 83(8). <https://doi.org/10.2460/ajvr.22.03.0048>.
- Lima, L. G. R., Gonçalves, M. M. M., Couri, S., Melo, V. F., Sant'Ana, G. C. F., & Costa, A. C. A. D. (2019). Lipase production by *Aspergillus niger* C by submerged fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62, e19180113. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180113>.
- Liu, H., Yin, Z., Li, M., Liu, C., Ali, M. A., Liu, J., ... & Pang, X. (2025). Design of efficient disperse one-bath strategy with low pollution and life cycle assessment for eco-sustainable leather processing. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(2), 116146. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.116146>.
- Liu, M., Huang, S., Yan, P., Wu, X., Yin, H., & Wang, L. (2025). Functional proteomic analysis of *Streptomyces* sp. F-3 reveals its potential to effectively degrade waste-yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 109(1), 157. <https://doi.org/10.1007/s00253-025-13541-y>.

- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Kämpfer, P., & Whitman, W. B. (2012). Road map of the phylum Actinobacteria. In *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (pp. 1-28). Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4_1).
- Ma, R., & Karthik, L. (2022). Pharmacology of FDA-approved medicines from actinobacteria. In *Actinobacteria: Microbiology to Synthetic Biology* (pp. 265-276). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-5835-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-16-5835-8_14).
- Maester, T. C., Pereira, M. R., Malaman, A. M. G., Borges, J. P., Pereira, P. A. M., & Lemos, E. G. (2020). Exploring metagenomic enzymes: A novel esterase useful for short-chain ester synthesis. *Catalysts*, 10(10), 1100. <https://doi.org/10.3390/catal10101100>.
- Mahfoudhi, A., Benmabrouk, S., Fendri, A., & Sayari, A. (2022). Fungal lipases as biocatalysts: A promising platform in several industrial biotechnology applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 119(12), 3370-3392. DOI: 10.1002/bit.28245
- Maiti, P. K., & Mandal, S. (2019). Majority of actinobacterial strains isolated from Kashmir Himalaya soil are rich source of antimicrobials and industrially important biomolecules. *Advances in Microbiology*, 9(03), 220. <https://doi.org/10.4236/aim.2019.93016>.
- Majidzadeh, M., Heidarieh, P., Fatahi-Bafghi, M., & Vakili, M. (2021). Antimicrobial activity of Actinobacteria isolated from dry land soil in Yazd, Iran. *Molecular Biology Reports*, 48(2), 1717-1723. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06218-y>.
- Majumder, D., Lahiri, D., Nag, M., Bhattacharya, D., Roy, R., Paul, T., & Pandit, S. (2025). Genetically modified lipases as biocatalysts for diacylglycerol production in the food industry: a critical review. *Archives of Microbiology*, 207(7), 166. <https://doi.org/10.1007/s00203-025-04361-9>
- Malavika, S., Kranthi, S., Shishira Rao, H. S., Moily, S. S., & Martin Paul, A. (2022). Isolation of gut Actinobacteria from termites. In *Methods in Actinobacteriology* (pp. 51-60). New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_11).
- Malisorn, K., Embaen, S., Sribun, A., Saeng-in, P., Phongsopitanun, W., & Tanasupawat, S. (2020). Identification and antimicrobial activities of Streptomyces, Micromonospora, and Kitasatospora strains from rhizosphere soils. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 10(2), 123-128. DOI: 10.7324/JAPS.2020.102018.

- Matkawala, F., Nighojkar, S., Kumar, A., & Nighojkar, A. (2021). Microbial alkaline serine proteases: production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(4), 63. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03036-z>.
- Matmoura, A., Yekkour, A., Boufadi, M. Y., Bouras, N., Zitouni, A., Mokrane, S., ... & Verheecke-Vaessen, C. (2023). Exploration of actinobacteria communities in seawater and sediments of mediterranean basin from Algerian coast displays high diversity with new taxa and antibacterial potential. *Biologia*, 78(8), 2219-2231. <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01353-2>.
- Mayel, M. H., Nwuche, C. O., Chimaobi, V. S., Eze, S. O. O., & Chilaka, F. C. (2020). Comparative studies on the kinetic properties of lipases purified from *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* LC 269109. *Biochem Mol Biol*, 6(2), 10. <https://doi.org/10.36648/2471-8084.6.2.10>.
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2023). Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. *The FEBS journal*, 290(9), 2214-2231. Doi:10.1111/febs.16274
- Mebarki, S., Kendouci, M. A., & Bendida, A. (2024). Monitoring the spatial evolution of groundwater quality during its diversion in the drinking water supply network in arid areas, case of Bechar city (Algeria Sahara). *Applied Water Science*, 14(6), 118. <https://doi.org/10.1007/s13201-024-02157-8>.
- Meenakshi, S., Hiremath, J., Meenakshi, M. H., & Shivaveerakumar, S. (2024). Actinomycetes: Isolation, Cultivation and its Active Biomolecules. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 18(1). doi: 10.22207/JPAM.18.1.48.
- Mehnaz, D. S., Aiysha, D., Zaheer, A., & Mukhtar, S. (2017). Actinomycetes: a source of industrially important enzymes. DOI: 10.4172/jpb.1000456
- Mehta, A., Guleria, S., Sharma, R., & Gupta, R. (2021). The lipases and their applications with emphasis on food industry. In *Microbial biotechnology in food and health* (pp. 143-164). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819813-1.00006-2>.
- Mehta, P. K., & Sehgal, S. (2019). Microbial enzymes in food processing. In *Biocatalysis: Enzymatic Basics and Applications* (pp. 255-275). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-25023-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-25023-2_13).

- Meklat, A., Bouras, N., Mokrane, S., Zitouni, A., Djemouai, N., Klenk, H. P., ... & Mathieu, F. (2020). Isolation, classification and antagonistic properties of alkalitolerant actinobacteria from Algerian Saharan soils. *Geomicrobiology Journal*, 37(9), 826-836. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1786865>.
- Melani, N. B., Tambourgi, E. B., & Silveira, E. (2020). Lipases: from production to applications. *Separation & Purification Reviews*, 49(2), 143-158. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1564328>.
- Menasria, T., Monteoliva-Sánchez, M., Benhadj, M., Benammar, L., Boukoucha, M., & Aguilera, M. (2022). Unraveling the enzymatic and antibacterial potential of rare halophilic actinomycetes from Algerian hypersaline wetland ecosystems. *Journal of Basic Microbiology*, 62(10), 1202-1215. DOI: 10.1002/jobm.202200085
- Mesbah, N. M. (2022). Industrial biotechnology based on enzymes from extreme environments. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 870083. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.870083>.
- Messaoudi, O., Wink, J., & Bendahou, M. (2020). Diversity of actinobacteria isolated from date palms rhizosphere and saline environments: Isolation, identification and biological activity evaluation. *Microorganisms*, 8(12), 1853. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121853>.
- Mitra, D., Mondal, R., Khoshru, B., Senapati, A., Radha, T. K., Mahakur, B., ... & MOHAPATRA, P. K. D. (2022). Actinobacteria-enhanced plant growth, nutrient acquisition, and crop protection: Advances in soil, plant, and microbial multifactorial interactions. *Pedosphere*, 32(1), 149-170. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60042-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60042-5).
- Moayd, W., & Yan, Y. (2017). Lipases, definition, and their application. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.*, 12(03), 55-60. DOI: 10.9790/3008-1203025560.
- Mohamed, M. A., & Awad, H. M. (2021). New lipase-producing *Streptomyces* isolated from halo-alkaline habitat in Wadi El Natrun: polyphasic identification and statistical optimization of enzyme production. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s43088-020-00090-8>.
- Mohamed, M. A., Awad, H. M., & Mostafa, E. S. E. (2021). Purification, catalytic, kinetic, thermodynamic characterization and stability profile of alkalophilic lipase from *Streptomyces*

sp. SBLWN\_MH2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 37, 102156. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102156>.

Mohammadipanah, F., & Dehghani, M. (2017). Classification and taxonomy of Actinobacteria. In *Biology and biotechnology of Actinobacteria* (pp. 51-77). Cham: Springer International Publishing. DOI 10.1007/978-3-319-60339-1\_4

Mokrani, S., Nabti, E. H., Mokrani, S., & Nabti, E. H. (2024). Recent status in production, biotechnological applications, commercial aspects, and future prospects of microbial enzymes: A comprehensive review. *Int. J. Agric. Sc. Food Technol*, 10, 006-020. <https://dx.doi.org/10.17352/2455-815X.000202>.

Momin, M. D., Singh, N. S., Kumar, A., & Tripathi, S. K. (2021). Structural and functional characterization of rhizosphere actinomycetes of major crop plants under shifting cultivation practice in Northeast India. *Vegetos*, 34(3), 638-646. <https://doi.org/10.1007/s42535-021-00221-1>.

Mondal, H., Thomas, J., & Amaresan, N. (2023). Isolation and identification of Actinomycetes. In *Aquaculture Microbiology* (pp. 183-186). New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3032-7\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3032-7_23).

Moreira, D. C. (2022). RGBradford: Accurate measurement of protein concentration using a smartphone camera and the blue to green intensity ratio. *Analytical Biochemistry*, 655, 114839. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114839>.

Mukherjee, A., Verma, J. P., Gaurav, A. K., Chouhan, G. K., Patel, J. S., & Hesham, A. E. L. (2020). Yeast a potential bio-agent: future for plant growth and postharvest disease management for sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1497-1510. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10321-3>.

Mushtaq, A., Ansari, T. M., Mustafa, G., Shad, M. A., Cruz-Reyes, J., & Jamil, A. (2020). Isolation and characterization of nprB, a novel protease from *Streptomyces thermovulgaris*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33. <https://doi.org/10.36721/PJPS.2020.33.5.SUP.2361-2369.1>.

Naligama, K. N., Weerasinghe, K. E., & Halmillawewa, A. P. (2022). Characterization of Bioactive Actinomycetes Isolated from Kadolkele Mangrove Sediments, Sri Lanka. *Polish journal of microbiology*, 71(2), 191–204. <https://doi.org/10.33073/pjm-2022-017>.

- Naligama, K. N., Weerasinghe, K. E., & Halmillawewa, A. P. (2022). Characterization of bioactive actinomycetes isolated from Kadolkele mangrove sediments, Sri Lanka. *Polish Journal of Microbiology*, 71(2), 191. <https://doi.org/10.33073/pjm-2022-017>.
- Narsing Rao, M. P., & Li, W. J. (2022). Diversity of actinobacteria in various habitats. In *Actinobacteria: Microbiology to Synthetic Biology* (pp. 37-58). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-5835-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-16-5835-8_2).
- Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. (2021). Protease a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. *Catalysis Letters*, 151(2), 307-323. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>.
- Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. (2021). Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. *Catalysis Letters*, 151(2), 307-323. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>.
- Nawal, G., Irfan, M., Ashfaq, S., & Shakir, H. A. (2019). An overview of bacterial lipases and their enormous applications. *Punjab Univ. J. Zool*, 34(1), 61-71. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.pujz/2019.34.1.61.71>.
- Naz, M., Dai, Z., Hussain, S., Tariq, M., Danish, S., Khan, I. U., ... & Du, D. (2022). The soil pH and heavy metals revealed their impact on soil microbial community. *Journal of Environmental Management*, 321, 115770. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115770>.
- Nazari, M. T., Machado, B. S., Marchezi, G., Crestani, L., Ferrari, V., Colla, L. M., & Piccin, J. S. (2022). Use of soil actinomycetes for pharmaceutical, food, agricultural, and environmental purposes. *3 Biotech*, 12(9), 232. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03307-y>.
- Nema, A., Patnala, S. H., Mandari, V., Kota, S., & Devarai, S. K. (2019). Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0125-7>.
- Ngamcharungchit, C., Chaimusik, N., Panbangred, W., Euanorasetr, J., & Intra, B. (2023). Bioactive metabolites from terrestrial and marine actinomycetes. *Molecules*, 28(15), 5915. <https://doi.org/10.3390/molecules28155915>.
- Nguyen, V. M. L., Ndao, A., Peterson, E. C., Blais, J. F., & Adjallé, K. (2025). *Bacillus* Species: Evolving Roles in Bio-Based Detergents. *Processes*, 13(6), 1885. <https://doi.org/10.3390/pr13061885>.

- Nimkande VD, Bafana A (2022) A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. *J Water Process Eng* 46:102591. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102591>.
- Nithya, K., Muthukumar, C., Kadaikunnan, S., Alharbi, N. S., Khaled, J. M., & Dhanasekaran, D. (2017). Purification, characterization, and statistical optimization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from desert actinobacterium *Streptomyces fragilis* DA7-7.3 *Biotech*, 7(5), 350. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0981-5>.
- Niyonzima, F. N. (2019). Production of microbial industrial enzymes. *Acta scientific microbiology*, 2(12), 75-89. DOI: 10.31080/ASMI.2019.02.0434
- Nouraein, M., Skataric, G., Spalevic, V., Dudic, B., & Gregus, M. (2019). Short-term effects of tillage intensity and fertilization on sunflower yield, achene quality, and soil physicochemical properties under semi-arid conditions. *Applied Sciences*, 9(24), 5482. <https://doi.org/10.3390/app9245482>.
- Ojo-Omoniyi, O. A., Moro, D. D., & Afolab, O. B. (2024). Microbial Proteases: Sources, Significance and Industrial Applications. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 13, 1-23. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2024.1306.001>.
- Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2019). *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(3), 1179-1188. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09577-y>.
- Oli, A. K., Shivshetty, N., Kelmani, C. R., & Biradar, P. A. (2022). Actinomycetes in medical and pharmaceutical industries. In *Actinobacteria: Ecology, Diversity, Classification and Extensive Applications* (pp. 291-320). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9_16).
- Oliveira, A. R. T., da Silva Aires, F. I., Dari, D. N., de Matos Filho, J. R., Dos Santos, K. M., Neto, F. S., ... & Dos Santos, J. C. S. (2025). Review on Lipase-Catalyzed Flavor Synthesis: Global Trends and Advances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(28), 17315. doi: [10.1021/acs.jafc.5c00386](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c00386)
- Onwuachi-Iheagwara, P. N., Kperegbeiyi, J. I., Ekanem, U., Nwadiolu, R., Okolotu, G. I., Balogun, T. A., ... & Oboreh, J. S. (2024). Bio-adsorbent of *Jatropha curcus* oil in sugar cane bagasse ash for the synthesis of biodiesel catalyzed by calcined Sartaj maize stalk powder (CSMSP). *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 10, 100879. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2024.100879>.

- Ortega-Requena, S., Montiel, C., Máximo, F., Gómez, M., Murcia, M. D., & Bastida, J. (2024). Esters in the Food and Cosmetic Industries: An Overview of the Reactors Used in Their Biocatalytic Synthesis. *Materials*, *17*(1), 268. <https://doi.org/10.3390/ma17010268>.
- Oubadi, M., & Faci, M. (2024). Spatio-Temporal Changes of Aridity in the Province of Naâma (Western Algeria): CHANGES OF ARIDITY IN WESTERN ALEGRIA. *Annals of Arid Zone*, *63*(3), 41-49. <https://doi.org/10.56093/aaz.v63i3.147766>.
- Oubadi, M., Faci, M., Hamou, A., & Tedim, F. (2025). Perceptions des populations sur le risque des temperatures elevees de l'air et les mesures d'adaptation en milieu aride: cas de Taghit (sud-ouest de l'Algerie). *Territorium*, (32 (I)), 35-44. [https://doi.org/10.14195/1647-7723\\_32-1\\_3](https://doi.org/10.14195/1647-7723_32-1_3).
- Oubadi, M., Hamou, A., Faci, M., & Farhi, Y. (2020). Impacts des canicules sur les contraintes environnemen-tales dans la région de Béchar. *Journal Algérien des Régions Arides*, *14*, 80-101.
- Ouchari, L., Boukeskase, A., Bouizgarne, B., & Ouhdouch, Y. (2019). Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from the unexplored hot Merzouga desert and their taxonomic diversity. *Biology open*, *8*(2), bio035410. <https://doi.org/10.1242/bio.035410>.
- Ouchene, R., Intertaglia, L., Zaatout, N., Kecha, M., & Suzuki, M. T. (2022). Selective isolation, antimicrobial screening and phylogenetic diversity of marine actinomycetes derived from the Coast of Bejaia City (Algeria), a polluted and microbiologically unexplored environment. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(4), 2870-2882. <https://doi.org/10.1111/jam.15415>.
- Oumaima, B., Nour-Eddine, C., Mohammed, R. S., Ouammou, A., Oussama, C., & Faouzi, E. (2024). Thermoactinomyces sacchari competent strain: isolation from compost, selection and characterization for biotechnological use. *Scientific African*, *23*, e02121. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02121>.
- Ousaadi, M. I., Merouane, F., Berkani, M., Almomani, F., Vasseghian, Y., & Kitouni, M. (2021). Valorization and optimization of agro-industrial orange waste for the production of enzyme by halophilic Streptomyces sp. *Environmental Research*, *201*, 111494. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111494>.
- Oyewole, O. A., Yakubu, J. G., Gana, M., Adamu, B. B., & Idris, A. D. (2022). Applications of microbial enzymes in industries and medicine. In *Ecological Interplays in Microbial*

*Enzymology* (pp. 293-327). Singapore: Springer Nature Singapore.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-19-0155-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-19-0155-3_14).

Panyachanakul, T., Lomthong, T., Lorliam, W., Prajanbarn, J., Tokuyama, S., Kitpreechavanich, V., & Krajangsang, S. (2020). New insight into thermo-solvent tolerant lipase produced by *Streptomyces* sp. A3301 for re-polymerization of poly (DL-lactic acid). *Polymer*, 204, 122812. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122812>.

Park, J. Y., & Park, K. M. (2022). Lipase and its unique selectivity: A mini-review. *Journal of Chemistry*, 2022(1), 7609019. <https://doi.org/10.1155/2022/7609019>.

Parwez, Z., Behera, S. S., Panda, A. N., Gouda, S. K., & Ray, L. (2025). Whole genome sequence analysis of a novel *Streptomyces* sp. BG6AG reveals its lipase production potential: optimization of the process through Taguchi experimental design. *3 Biotech*, 15(7), 207. <https://doi.org/10.1007/s13205-025-04369-4>.

Passari, A. K., Leo, V. V., & Singh, B. P. (2018). Freshwater actinobacteria: potential source for natural product search and discovery. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 67-77). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00004-7>.

Passari, A. K., Mishra, V. K., Gupta, V. K., & Singh, B. P. (2018). Methods used for the recovery of culturable endophytic actinobacteria: an overview. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00001-1>.

Patel, G. B., Shah, K. R., Shindhal, T., Rakholiya, P., & Varjani, S. (2021). Process parameter studies by central composite design of response surface methodology for lipase activity of newly obtained Actinomycete. *Environmental Technology & Innovation*, 23, 101724. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101724>.

pek Kurtböke, I. (2017). Bioactive actinomycetes: reaching rarity through sound understanding of selective culture and molecular diversity. In *Microbial resources* (pp. 45-76). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804765-1.00003-5>.

Pereira, A. D. S., Fontes-Sant'Ana, G. C., & Amaral, P. F. (2019). Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid

as a biocatalyst. *Food and Bioprocess Technology*, 115, 68-77.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.02.002>.

Pérez, C., Juárez, K., Garcia-Castells, E., Soberón, G., & Servín-González, L. (1993). Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. *Gene*, 123(1), 109-114.  
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90548-H](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90548-H)

Pérez, M. M., Gonçalves, E. C. S., Vici, A. C., Salgado, J. C. S., & de Moraes Polizeli, M. D. L. T. (2019). Fungal lipases: versatile tools for white biotechnology. In *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives* (pp. 361-404). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_11).

Pérez-Corral, D. A., de Jesús Ornelas-Paz, J., Olivas-Orozco, G. I., Acosta-Muñiz, C. H., Salas-Marina, M. Á., Berlanga-Reyes, D. I., ... & Rios-Velasco, C. (2022). Molecular, morphological and biochemical characterization of actinomycetes and their antagonistic activity against phytopathogenic fungi. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 45(1), 103-103.  
<https://doi.org/10.35196/rfm.2022.1.103>.

Pham, V. H. T., Kim, J., Chang, S., & Chung, W. (2021). Investigation of lipolytic-secreting bacteria from an artificially polluted soil using a modified culture method and optimization of their lipase production. *Microorganisms*, 9(12), 2590.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9122590>.

Phukon, L. C., Chourasia, R., Kumari, M., Godan, T. K., Sahoo, D., Parameswaran, B., & Rai, A. K. (2020). Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. *Bioresource technology*, 309, 123352. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123352>.

Pietrzak, S., & Hołaj-Krzak, J. (2021). Organic carbon content in grassland soil in Poland. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-666885/v1>.

Pizarro, I. F., de Souza, H. F., dos Santos Ferreira, J., Maldonado, R. R., Kamimura, E. S., & Aguiar-Oliveira, E. (2022). Production of lipase by Actinobacteria. In *Methods in Actinobacteriology* (pp. 505-512). New York, NY: Springer US. , [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_75](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_75).

- Pohanka, M. (2019). Biosensors and bioassays based on lipases, principles and applications, a review. *Molecules*, 24(3), 616. <https://doi.org/10.3390/molecules24030616>
- Poornima, S., Divya, P., Karmegam, N., Karthik, V., & Subbaiya, R. (2020). Aqueous two-phase partitioning and characterization of xylanase produced by *Streptomyces geysiriensis* from low cost lignocellulosic substrates. *Journal of bioscience and bioengineering*, 130(6), 571-576. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.07.008>.
- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M., & Kapadnis, B. (2013). Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. *BioMed research international*, 2013(1), 264020. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/264020>.
- Pranay, K., Padmadeo, S. R., Jha, V., & Prasad, B. (2019). Screening and identification of amylase producing strains of *Bacillus*. *J Appl Biol Biotechnol*, 7(4), 57-62. DOI: 10.7324/JABB.2019.70103
- Prathyusha, A. M. V. N., & Bramhachari, P. V. (2018). Novel perspectives of biotic and abiotic stress tolerance mechanism in Actinobacteria. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*, 235-244. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00016-3>.
- Prayogo, F. A., Budiharjo, A., Kusumaningrum, H. P., Wijanarka, W., Suprihadi, A., & Nurhayati, N. (2020). Metagenomic applications in exploration and development of novel enzymes from nature: a review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00043-9>.
- Priji, P., Sajith, S., Faisal, P. A., & Benjamin, S. (2016). Microbial lipases– properties and applications. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(2), 799. doi: 10.15414/jmbfs.2016.6.2.799-807
- Priyanka, P., Kinsella, G., Henehan, G. T., & Ryan, B. J. (2019). Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*. *Protein expression and purification*, 153, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.08.007>.
- Punekar, N. S. (2025). On Enzyme Nomenclature and Classification. In *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms* (pp. 59-70). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-97-8179-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-97-8179-9_7).

- Punekar, N.S. (2025). Enzymes: Historical Aspects. In: ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-97-8179-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-97-8179-9_2).
- Putri, D. N., Khoutama, A., Perdani, M. S., Utami, T. S., & Hermansyah, H. (2020). Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. *Energy Reports*, 6, 331-335. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.08.064>.
- Putri, E., Rukayadi, Y., Sunarti, T. C., & Meryandini, A. (2019). Cellulolytic and Xylanolytic Actinomycetes selection to degrade Lignocellulosic biomass of Robusta coffee pulp (*Coffea canephora*). In *IOP Conference series: Earth and Environmental Science* (Vol. 299, No. 1, p. 012014). IOP Publishing. DOI 10.1088/1755-1315/299/1/012014.
- Qiu, J., Han, R., & Wang, C. (2021). Microbial halophilic lipases: A review. *Journal of Basic Microbiology*, 61(7), 594-602. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100107>.
- Rabbani, G., Ahmad, E., Ahmad, A., & Khan, R. H. (2023). Structural features, temperature adaptation and industrial applications of microbial lipases from psychrophilic, mesophilic and thermophilic origins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 225, 822-839. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.146>
- Radhakrishnan, S., & Varadharajan, M. (2022). Isolation, Identification, and screening of polyene antifungal compound producing *Streptomyces sampsonii* MDCE7 from Agroforestry Soil. *Methods in Actinobacteriology*, 379-389. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_46](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_46).
- Ramesh, A., Harani Devi, P., Chattopadhyay, S., & Kavitha, M. (2020). Commercial applications of microbial enzymes. In *Microbial enzymes: roles and applications in industries* (pp. 137-184). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_6).
- Ramnath, L., Sithole, B., & Govinden, R. (2017). Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. *Canadian journal of microbiology*, 63(3), 179-192. [dx.doi.org/10.1139/cjm-2016-0447](https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0447)
- Ramos Neyra, L. C., Porto de Souza Vandenberghe, L., Valladares-Diestra, K. K., Gruening de Mattos, P. B., Sinelnikov, I., Bittencourt, G. A., ... & Soccol, C. R. (2025). Emerging Biorefinery Approaches to Produce Microbial Amylases and their Formulations and Applications in the Food Industry. *Waste and Biomass Valorization*, 1-31. <https://doi.org/10.1007/s12649-025-03192-5>.

- Rana, K. L., Kour, D., Sheikh, I., Dhiman, A., Yadav, N., Yadav, A. N., ... & Saxena, A. K. (2019). Endophytic fungi: biodiversity, ecological significance, and potential industrial applications. In *Recent advancement in white biotechnology through fungi: volume 1: diversity and enzymes perspectives* (pp. 1-62). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_1).
- Rashvanlou RB, Farzadkia M, Rezaee A, Gholami M, Kermani M, Pasalari H (2021) The influence of combined low-strength ultrasonics and micro-aerobic pretreatment process on methane generation and sludge digestion: lipase enzyme, microbial activation, and energy yield. *Ultrason Sonochem* 73:105531. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105531>
- Rathore, D. S., & Singh, S. P. (2021). Kinetics of growth and co-production of amylase and protease in novel marine actinomycete, *Streptomyces lopnurensis* KaM5. *Folia microbiologica*, 66(3), 303-316. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00843-z>.
- Rathore, D. S., Malaviya, K., Dobariya, A., & Singh, S. P. (2020). Optimization of the production of an amylase from a marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* strain KaS11. In *Proceedings of the National Conference on Innovations in Biological Sciences (NCIBS)*. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3567722>.
- Rathore, D. S., Sheikh, M., Gohel, S., & Singh, S. P. (2019). Isolation strategies, abundance and characteristics of the marine actinomycetes of Kachhighadi, Gujarat, India. *Journal of the Marine Biological Association of India*, 61(1), 71-78. doi:10.6024/jmbai.2019.61.1.2028-11.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>.
- Rehdorf, J., Pelzer, A., & Eck, J. (2024). Enzyme Identification and Screening: Activity-Based Methods. In *Introduction to Enzyme Technology* (pp. 125-146). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-42999-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-031-42999-6_6).
- Reyes-Reyes, A. L., Valero Barranco, F., & Sandoval, G. (2022). Recent advances in lipases and their applications in the food and nutraceutical industry. *Catalysts*, 12(9), 960. <https://doi.org/10.3390/catal12090960>.
- Riyadi, F. A., Alam, M. Z., Salleh, M. N., & Salleh, H. M. (2017). Optimization of thermostable organic solvent-tolerant lipase production by thermotolerant *Rhizopus* sp. using

solid-state fermentation of palm kernel cake. 3 *Biotech*, 7(5), 300. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0932-1>.

Riyadi, F. A., Alam, M. Z., Salleh, M. N., Salleh, H. M., Hidayatullah, I. M., & Hara, H. (2024). Characterization of a thermostable-organic solvent-tolerant lipase from thermotolerant *Rhizopus* sp. strain PKC12B2 isolated from palm kernel cake. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 9, 100721. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2024.100721>.

Rodrigues dos Santos, M. R., Battaglia Hirata, D. B., & de Alencar Figueira Angelotti, J. A. (2022). Lipases: Sources of acquisition, ways of production, and recent applications. *Catalysis Research*, 2(2), 1-43. doi:10.21926/cr.2202013

Rodrigues, C. A., Santos, J. C., Barbosa, M. S., Lisboa, M. C., Souza, R. L., Mendes, A. A., ... & Soares, C. M. (2024). Extending the computational and experimental analysis of lipase active site selectivity. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 47(3), 313-323. <https://doi.org/10.1007/s00449-023-02956-4>.

Rozi, M. F. A. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Leow, A. T. C., & Ali, M. S. M. (2022). Ancestral sequence reconstruction of ancient lipase from family I. 3 bacterial lipolytic enzymes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 168, 107381. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107381>.

Rozirwan, R. O. Z. I. R. W. A. N., Muda, H. I., & Ulqodry, T. Z. (2020). Antibacterial potential of Actinomycetes isolated from mangrove sediment in Tanjung Api-Api, South Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(12). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d211232>.

Ruwandeeepika, H. A. D., Fernando, G. C. P., & Jayaweera, T. S. P. (2022). An overview of biomedical, biotechnological, and industrial applications of actinomycetes. *Natural products from actinomycetes: Diversity, ecology and drug discovery*, 475-508. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-6132-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-16-6132-7_18).

Saadoun, I., Alawawdeh, M., Jaradat, Z., Ababneh, Q., Al-Joubori, B. M., & Elsheikh, E. A. (2023). Characterization of diesel-degrading, hydrolytic enzymes-producing *Streptomyces* spp. isolated from fuel-oil polluted soils. *Arab Journal of Basic and Applied Sciences*, 30(1), 248-255. <https://doi.org/10.1080/25765299.2023.2196110>.

Sahoo, R. K., Das, A., Gaur, M., Sahu, A., Sahoo, S., Dey, S., ... & Subudhi, E. (2020). Parameter optimization for thermostable lipase production and performance evaluation as

prospective detergent additive. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(6), 578-584. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1719513>.

Sakpuntoon, V., Limtong, S., & Srisuk, N. (2023). Lipase production by *Limtongozyma siamensis*, a novel lipase producer and lipid accumulating yeast. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1531. <https://doi.org/10.4014/jmb.2304.04006>.

Salam, N., Jiao, J. Y., Zhang, X. T., & Li, W. J. (2020). Update on the classification of higher ranks in the phylum Actinobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(2), 1331-1355. DOI 10.1099/ijsem.0.003920.

Salehghamari, E., Moradi, M., Sardabi, M., Etesami, S. A., Hassani, G. H., Hosseini, M., ... & Amoozegar, M. A. (2023). Diversity of actinomycete and their metabolites isolated from Howz Soltan Lake, Iran. *Archives of Microbiology*, 205(1), 24. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03364-0>.

Salehghamari, E., Moradi, M., Sardabi, M., Etesami, S. A., Hassani, G. H., Hosseini, M., ... & Amoozegar, M. A. (2023). Diversity of actinomycete and their metabolites isolated from Howz Soltan Lake, Iran. *Archives of Microbiology*, 205(1), 24. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03364-0>.

Salem, G. S., Baiu, S. H., & Ali, A. A. (2023). Isolation, examination and characterization of actinomycetes as a source of antimicrobial agents from Libyan soil. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 14(6), 322-336. DOI: [10.4236/abb.2023.146020](https://doi.org/10.4236/abb.2023.146020).

Salgado, C. A., dos Santos, C. I. A., & Vanetti, M. C. D. (2022). Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. *Food Bioscience*, 45, 101509. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101509>.

Salwan, R., & Sharma, V. (2018). The role of actinobacteria in the production of industrial enzymes. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 165-177). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00011-4>.

Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological research*, 231, 126374. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>.

Sandhya, C., Sumantha, A., & Pandey, A. (2020). Proteases. In *Enzyme technology* (pp. 319-332). New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-35141-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-0-387-35141-4_16).

- Saoudi, B., Habbeche, A., Kerouaz, B., Haberra, S., Romdhane, Z. B., Tichati, L., & Ladjama, A. (2015). Purification and characterization of a new thermoalkaliphilic pectate lyase from *Actinomadura keratinilytica* Cpt20. *Process Biochemistry*, 50(12), 2259-2266. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.10.006>.
- Sapkota, A., Thapa, A., Budhathoki, A., Sainju, M., Shrestha, P., & Aryal, S. (2020). Isolation, characterization, and screening of antimicrobial-producing Actinomycetes from soil samples. *International journal of microbiology*, 2020(1), 2716584. <https://doi.org/10.1155/2020/2716584>.
- Sara, B., Khedoudja, K., Ahmed, B., Zeyneb, N., Nesrine, B., Zouaouia, C., ... & Aicha, M. (2022). Isolation, Screening and Characterization of an Antagonistic Actinobacteria from Algerian Semi-Arid Region. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology*, 14(2), 415-425. DOI: [10.21608/eajbsc.2022.278608](https://doi.org/10.21608/eajbsc.2022.278608).
- Sarika, K., Sampath, G., Govindarajan, R. K., Ameen, F., Alwakeel, S., Al Gwaiz, H. I., ... & Ravi, G. (2021). Antimicrobial and antifungal activity of soil actinomycetes isolated from coal mine sites. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(6), 3553-3558. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.029>.
- Sarkar, G., & Suthindhiran, K. (2020). Extraction and characterization of alkaline protease from *Streptomyces* sp. GS-1 and its application as dehairing agent. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101590. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101590>.
- Sarkar, G., & Suthindhiran, K. (2022). Diversity and biotechnological potential of marine actinomycetes from India. *Indian Journal of Microbiology*, 62(4), 475-493. <https://doi.org/10.1007/s12088-022-01024-x>.
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology progress*, 34(1), 5-28. DOI: 10.1002/btpr.2581
- Satti, S. M., Abbasi, A. M., Marsh, T. L., Auras, R., Hasan, F., Badshah, M., ... & Shah, A. A. (2019). Statistical optimization of lipase production from *Sphingobacterium* sp. strain S2 and evaluation of enzymatic depolymerization of poly (lactic acid) at mesophilic temperature. *Polymer Degradation and Stability*, 160, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.11.030>.

- Savitha, T., Khalifa, A., & Sankaranarayanan, A. (2022). Isolation of Actinobacteria from soil and marine sediment samples. In *Methods in Actinobacteriology* (pp. 1-5). New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_1).
- Savitha, T., Khalifa, A., & Sankaranarayanan, A. (2022). Isolation of Actinobacteria from Compost Samples. In *Methods in Actinobacteriology* (pp. 39-43). New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_9).
- Selamoglu, Z. (2020). Use of enzymes in dairy industry: a review of current progress. *Archives of Razi Institute*, 75(1), 131. DOI: 10.22092/ARI.2019.126286.1341
- Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., & Mohamed, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and biotechnology*, 19(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>.
- Semache, N., Benamia, F., Kerouaz, B., Belhaj, I., Bounour, S., Belghith, H., ... & Djeghaba, Z. (2021). Artificial Neural Networks and Response Surface Methodology Approach for Optimization of an Eco-Friendly and Detergent-Stable Lipase Production from *Actinomyces keratinilytica* Strain Cpt29. *Acta Chimica Slovenica*, 68(3). <https://doi.org/10.17344/acsi.2020.6401>.
- Serpa, J. D. M., de Alencar Guimarães, N. C., Yonekawa, M. A. K., de Almeida, A. P., Ruller, R., dos Santos Jaques, J. A., ... & Giannesi, G. C. (2022). *Sarocladium strictum* lipase (LipSs) produced using crude glycerol as sole carbon source: a promising enzyme for biodiesel production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 40, 102299. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102299>.
- Shah, H., Zhang, C., Khan, S., Patil, P. J., Li, W., Xu, Y., ... & Li, X. (2024). Comprehensive insights into microbial lipases: Unveiling structural dynamics, catalytic mechanism, and versatile applications. *Current Microbiology*, 81(11), 394. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03904-5>.
- Shaikh, M., Shafique, M., Naz, S. A., Jabeen, N., Rub, H. A. F. I. Z., Nawaz, Z. K., & Ali, S. T. (2019). *Streptomyces* sp. MM-3 from rhizosphere of *Psidium guajava*: a potential candidate for protease with dehairing properties. *Pak J Bot*, 51(2), 735-742. DOI: 10.30848/PJB2019-2(40)

- Shankar Naik, B., Abrar, S., & Krishnappa, M. (2019). Industrially important enzymes from fungal endophytes. *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives*, 263-280. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_7).
- Sharma, A., Shadiya, Sharma, T., Kumar, R., Meena, K., & Kanwar, S. S. (2019). Biodiesel and the potential role of microbial lipases in its production. In *Microbial Technology for the Welfare of Society* (pp. 83-99). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8844-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8844-6_4).
- Sharma, D., Kumbhar, B. K., Verma, A. K., & Tewari, L. (2014). Optimization of critical growth parameters for enhancing extracellular lipase production by alkalophilic *Bacillus* sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 205-211. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.04.004>.
- Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A., & Kumar, A. (2019). A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. *Industrial Biotechnology*, 15(2), 69-78. DOI: 10.1089/ind.2018.0032
- Sharma, N., Ahlawat, Y. K., Stalin, N., Mehmood, S., Morya, S., Malik, A., ... & Bhanot, D. (2025). Microbial Enzymes in Industrial Biotechnology: Sources, Production and Significant Applications of Lipases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, kuaf010. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuaf010>.
- Shijila Rani, A. S., Babu, S., Anbukumaran, A., Prakash, P., Veeramani, S., & Ambikapathy, V. (2022). Isolation of actinobacteria from shrimp. In *Methods in Actinobacteriology* (pp. 27-30). New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_6).
- Shiri, T., Nnolim, N. E., & Nwodo, U. U. (2023). Delipidation of Chicken Feathers by Lipolytic *Bacillus* Species Isolated from River-Borne Sediments. *Clean Technologies*, 5(4), 1235-1247. <https://doi.org/10.3390/cleantechnol5040062>.
- Shrestha, B., Nath, D. K., Maharjan, A., Poudel, A., Pradhan, R. N., & Aryal, S. (2021). Isolation and Characterization of Potential Antibiotic-Producing Actinomycetes from Water and Soil Sediments of Different Regions of Nepal. *International Journal of Microbiology*, 2021(1), 5586165. <https://doi.org/10.1155/2021/5586165>.
- Shu, W. S., & Huang, L. N. (2022). Microbial diversity in extreme environments. *Nature Reviews Microbiology*, 20(4), 219-235. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00648-y>.

- Shukla, E., Bendre, A. D., & Gaikwad, S. M. (2022). Hydrolases: the most diverse class of enzymes. In *Hydrolases*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.102350
- Silva, G. D. C., Kitano, I. T., Ribeiro, I. A. D. F., & Lacava, P. T. (2022). The potential use of actinomycetes as microbial inoculants and biopesticides in agriculture. *Frontiers in Soil Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.833181>.
- Silva, R. L. A., Barreiro, M. E., Ferreira, K. R. C., Cardoso, K. B. B., Neves, A. G. D., Miranda, M. E. L., ... & Brandão-Costa, R. M. (2024). Purification and characterization of a protease produced by submerged fermentation: Ultrasound-enhanced collagenolytic protease from *Streptomyces parvulus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 283, 137749. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137749>.
- Singh, L. S., Sharma, H., & Sahoo, D. (2019). Actinomycetes from soil of Lachung, a pristine high altitude region of Sikkim Himalaya, their antimicrobial potentiality and production of industrially important enzymes. *Advances in Microbiology*, 9(08), 750. <https://doi.org/10.4236/aim.2019.98046>.
- Singh, P., & Kumar, S. (2019). Microbial enzyme in food biotechnology. In *Enzymes in food biotechnology* (pp. 19-28). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00002-5>.
- Singh, P., Jain, K., Desai, C., Tiwari, O., & Madamwar, D. (2019). Microbial community dynamics of extremophiles/extreme environment. In *Microbial diversity in the genomic era* (pp. 323-332). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00018-6>.
- Singh, R., Kapoor, V., & Kumar, V. (2012). Utilization of agro-industrial wastes for the simultaneous production of amylase and xylanase by thermophilic actinomycetes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1545-1552. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400039>.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174. DOI 10.1007/s13205-016-0485-8.
- Singh, T. A., Jajoo, A., & Bhasin, S. (2020). Production and application of glucose isomerase from *Streptomyces enissocaesilis* and amylase from *Streptomyces* sp. for the synthesis of high fructose corn syrup. *SN Applied Sciences*, 2(12), 1968. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03757-0>.

- Sipiczki, G., Micevic, S. S., Kohari-Farkas, C., Nagy, E. S., Nguyen, Q. D., Gere, A., & Bujna, E. (2024). Effects of olive oil and Tween 80 on production of lipase by *Yarrowia* yeast strains. *Processes*, *12*(6), 1206. <https://doi.org/10.3390/pr12061206>.
- Sivalingam, P., Hong, K., Pote, J., & Prabakar, K. (2019). Extreme environment *Streptomyces*: potential sources for new antibacterial and anticancer drug leads?. *International Journal of Microbiology*, *2019*(1), 5283948. <https://doi.org/10.1155/2019/5283948>.
- Smati, M., Bramki, A., Makhlof, F. Z., Djebaili, R., Farda, B., Abdelhadi, F. Z., ... & Pellegrini, M. (2025). Isolation of Actinobacteria from Date Palm Rhizosphere with Enzymatic, Antimicrobial, Antioxidant, and Protein Denaturation Inhibitory Activities. *Biomolecules*, *15*(1), 65. <https://doi.org/10.3390/biom15010065>.
- Solanki, P., Putatunda, C., Kumar, A., Bhatia, R., & Walia, A. (2021). Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech*, *11*(10), 428. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>.
- Sommer, P., Bormann, C., & Götz, F. (1997). Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Applied and environmental microbiology*, *63*(9), 3553-3560. <https://doi.org/10.1128/aem.63.9.3553-3560.1997>
- Sonali, & Arora, R. (2020). Industrial potential of microbial enzymes. In *Microbial diversity, interventions and scope* (pp. 301-318). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4099-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4099-8_17).
- Song, P., Zhang, X., Wang, S., Xu, W., Wang, F., Fu, R., & Wei, F. (2023). Microbial proteases and their applications. *Frontiers in microbiology*, *14*, 1236368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236368>.
- Sorte, S., Ribeiro, J. P., Coutinho, J. A. P., & Nunes, M. I. (2020). Study of fame production from waste cooking oil: Operation in batch and continuous regime with regeneration of enzyme catalyst. *Energy Reports*, *6*, 751-756. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.09.062>.
- Souagui, S., Djoudi, W., Boudries, H., Béchet, M., Leclère, V., & Kecha, M. (2019). Modeling and statistical optimization of culture conditions for improvement of antifungal compounds production by *Streptomyces albidoflavus* S19 strain of wastewater origin. *Anti-infective Agents*, *17*(1), 39-49. DOI: 10.2174/2211352516666180813102424

- Stamford, T. L. M., Stamford, N. P., Coelho, L. C. B. B., & Araujo, J. M. (2001). Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardioopsis* sp. endophyte of yam bean. *Bioresource Technology*, 76(2), 137-141. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00089-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00089-4).
- Subathra Devi, C., Merlyn Keziah, S., Jemimah Naine, S., & Mohanasrinivasan, V. (2022). Actinomycetes: microbiology to systems biology. In *Actinobacteria: Microbiology to Synthetic Biology* (pp. 1-35). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-5835-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-16-5835-8_1).
- Suhaimi, S., Ramlee, N. N., & Rahman, N. H. A. (2025). Enzymatic and Microbial-Based Systems for Bioremediation of Wastewater. In *Wastewater Treatment Through Nature-Based Solutions: Achieving Sustainable Development Goal 6* (pp. 341-380). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-96-6699-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-96-6699-7_15).
- Sujarit, K., Pannim, B., Kuakkhunthod, N., Uywannang, U., Sakdapetsiri, C., Panyachanakul, T., ... & Lomthong, T. (2025). Potential of *Streptomyces rochei* 8ER183 for poly (lactic acid)-degrading enzyme production, biodegradative capability, and its whole-genome sequence characterization. *3 Biotech*, 15(3), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s13205-025-04219-3>.
- Suneetha, V., & Khan, Z. A. (2010). Actinomycetes: sources for soil enzymes. In *Soil Enzymology* (pp. 259-269). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3_14).
- Swarna, D., & Gnanadoss, J. J. (2020). Screening and molecular characterization of actinomycetes from mangrove soil producing industrially important enzymes. *J Sci Res*, 64(2), 87-95. DOI: 10.37398/JSR.2020.640211
- Szymczak, T., Cybulska, J., Podleśny, M., & Frąc, M. (2021). Various perspectives on microbial lipase production using agri-food waste and renewable products. *Agriculture*, 11(6), 540. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060540>.
- Tacin, M. V., Massi, F. P., Fungaro, M. H. P., Teixeira, M. F. S., de Paula, A. V., & de Carvalho Santos-Ebinuma, V. (2019). Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus* sp. from Amazon. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 369-378. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.013>.
- Taibi, Z., Saoudi, B., Boudelaa, M., Trigui, H., Belghith, H., Gargouri, A., & Ladjama, A. (2012). Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from

Actinomadura sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(3), 663-679. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9457-y>.

Talpur, M. K. A., Qazi, M. A., Phulpoto, A. H., Maitlo, M. A., Phulpoto, I. A., Syed, F. H., ... & Kanhar, N. A. (2020). Bioprospecting actinobacterial diversity antagonistic to multidrug-resistant bacteria from untapped soil resources of Kotdiji, Pakistan. *Biologia*, 75, 129-138. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00315-x>.

Tam, H. M., Thanh, D. T. N., & Tram, T. L. N. B. (2019). Isolation and Characterization of Actinobacteria in Rhizosphere of *Crinum latifolium* (L.) Cultivated in Tay Ninh Province, Vietnam. <http://dx.doi.org/10.21172/ijiet.134.04>.

Tan, J. S., Abbasiliasi, S., Ariff, A. B., Ng, H. S., Bakar, M. H. A., & Chow, Y. H. (2018). Extractive purification of recombinant thermostable lipase from fermentation broth of *Escherichia coli* using an aqueous polyethylene glycol impregnated resin system. *3 Biotech*, 8, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1295-y>.

Tanvir, R., Sheikh, A. A., & Javeed, A. (2019). Endophytic actinomycetes in the biosynthesis of bioactive metabolites: chemical diversity and the role of medicinal plants. *Studies in natural products chemistry*, 60, 399-424. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64181-6.00011-5>.

Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F. C., Nasr, K. A., ... & Zhou, S. (2019). Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular biotechnology*, 61(8), 579-601. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>.

Theerachat M, Tanapong P, Chulalaksananukul W (2017) The culture or co-culture of *Candida rugosa* and *Yarrowia lipolytica* strain rM-4A, or incubation with their crude extracellular lipase and laccase preparations, for the biodegradation of palm oil mill wastewater. *Int Biodeterior Biodegradation* 121:11–18. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.03.002>.

Tiwari, D., Shouche, S., Bhati, P., & Das, P. (2021). A Consolidated Method for Selective Isolation of Actinomycetes Based on Choice of Substrate. *International Annals of Science*, 11(1), 10-21. <https://doi.org/10.21467/ias.11.1.10-21>.

- Trabelsi, I., Soltane, R., Hassine-Zaafrane, M., Alasiri, A., Albogami, B., & Nour, M. (2022). Study of the Antimicrobial Potential of Actinomycetes Isolated from Organic and Inorganic Waste. *Current Microbiology*, 79(12), 372. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03024-y>.
- Tran, T. N., Doan, C. T., Nguyen, V. B., Nguyen, A. D., & Wang, S. L. (2022). Conversion of fishery waste to proteases by *Streptomyces speibonae* and their application in antioxidant preparation. *Fishes*, 7(3), 140. <https://doi.org/10.3390/fishes7030140>.
- Trenozhnikova, L. P., Baimakhanova, G. B., Baimakhanova, B. B., Balgimbayeva, A. S., Daugaliyeva, S. T., Faizulina, E. R., ... & Beutler, J. A. (2024). Beyond traditional screening: Unveiling antibiotic potentials of actinomycetes in extreme environments. *Heliyon*, 10(22). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40371>.
- Van Nam, V., Huong, D. T. M., Dao, P. T., Anh, N. M., Minh, L. T. H., & Van Cuong, P. (2019). Secondary metabolites produced by marine actinomycete *Micromonospora* sp. A258. *Vietnam Journal of Chemistry*, 57(6), 707-711. <https://doi.org/10.1002/vjch.201900098>.
- Vasconcelos, E. S., Salla, R. F., & Cruz-Hernandez, I. L. (2018). Production of lipase from *Streptomyces*. *J Bacteriol Mycol*, 6(2), 102-103. DOI: 10.15406/jbmoa.2018.06.00184
- Vashist, P., Kanchana, R., Devasia, V. L. A., Shirodkar, P. V., & Muraleedharan, U. D. (2019). Biotechnological implications of hydrolytic enzymes from marine microbes. In *Advances in biological science research* (pp. 103-118). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00007-0>.
- Verma, E., Chakraborty, S., Tiwari, B., & Mishra, A. K. (2018). Antimicrobial compounds from actinobacteria: synthetic pathways and applications. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 277-295). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00019-9>.
- Verma, M. L. (2019). Biotechnological applications of lipases in flavour and fragrance ester production. In *Microbial Technology for the Welfare of Society* (pp. 1-24). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8844-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8844-6_1).
- Vishnoi, N., Dixit, S., & Mishra, J. (2020). Microbial lipases and their versatile applications. In *Microbial enzymes: Roles and applications in industries* (pp. 207-230). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_8).

- Vivek, K., Sandhia, G. S., & Subramaniyan, S. J. B. A. (2022). Extremophilic lipases for industrial applications: A general review. *Biotechnology Advances*, *60*, 108002. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108002>.
- Vojnovic, S., Aleksic, I., Ilic-Tomic, T., Stevanovic, M., & Nikodinovic-Runic, J. (2024). *Bacillus* and *Streptomyces* spp. as hosts for production of industrially relevant enzymes. *Applied microbiology and biotechnology*, *108*(1), 185. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12900-x>.
- Vyas, A., & Yakubu, A. (2020). Microbial enzymes from in vitro to market. In *Microbial diversity, interventions and scope* (pp. 185-215). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4099-8\\_12185](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4099-8_12185).
- Wang, L., Sun, Y., Li, J., Tigabu, M., Xu, Q., Ma, X., & Li, M. (2023). Rhizosphere soil nutrients and bacterial community diversity of four broad-leaved trees planted under Chinese fir stands with different stocking density levels. *Frontiers in forests and global change*, *6*, 1135692. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2023.1135692>.
- Wang, Y., & Jiang, Y. (2016). Chemotaxonomy of actinobacteria. *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*, 1-29. <http://dx.doi.org/10.5772/61482>.
- Wei, Q. Y., Li, W., Zhang, Y., & Wei, X. (2020). Distribution diversity of fungi and bacteria communities in the pure plantation of *Larix gmelinii* and *Fraxinus mandshurica*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-97361/v1>.
- Welz, P., Swanepoel, G., Weels, S., & Le Roes-Hill, M. (2021). Wastewater from the edible oil industry as a potential source of lipase-and surfactant-producing actinobacteria. *Microorganisms*, *9*(9), 1987. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091987>.
- Wink, J., Mohammadipanah, F., & Kazemi Shariat Panahi, H. (2017). Practical aspects of working with actinobacteria. In *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (pp. 329-376).
- Xie, F., Rangseekaew, P., & Pathom-aree, W. (2022). Actinobacteria from arid environments and their biotechnological applications. In *Natural products from actinomycetes: diversity, ecology and drug discovery* (pp. 91-118). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-6132-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-16-6132-7_4).

- Xu, L., Li, J., Zhang, H., Zhang, M., Qi, C., & Wang, C. (2025). Biological modification and industrial applications of microbial lipases: A general review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140486. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140486>.
- Yao, W., Liu, K., Liu, H., Jiang, Y., Wang, R., Wang, W., & Wang, T. (2021). A valuable product of microbial cell factories: Microbial lipase. *Frontiers in Microbiology*, 12, 743377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.743377>.
- Yaradoddi, J. S., Kontro, M. H., Banapurmath, N. R., Ganachari, S. V., Sulochana, M. B., Hungund, B. S., ... & Oli, A. (2022). Extremophilic Actinobacteria. In *Actinobacteria: Ecology, Diversity, Classification and Extensive Applications* (pp. 55-67). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9_4).
- Yaradoddi, J. S., Kontro, M. H., Ganachari, S. V., Banapurmath, N. R., Oli, A., Katti, A. S., & Sulochana, M. B. (2022). Actinobacteria in marine environments. In *Actinobacteria: Ecology, Diversity, Classification and Extensive Applications* (pp. 21-38). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9_2).
- Yasar, G., Gulhan, U. G., Guduk, E., & Aktas, F. (2020). Screening, partial purification and characterization of the hyper-thermophilic lipase produced by a new isolate of *Bacillus subtilis* LP2. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(5), 367-375. <https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1751829>.
- Yassin, S. N., Jiru, T. M., & Indracanti, M. (2021). Screening and Characterization of Thermostable Amylase-Producing Bacteria Isolated from Soil Samples of Afdera, Afar Region, and Molecular Detection of Amylase-Coding Gene. *International journal of microbiology*, 2021(1), 5592885. <https://doi.org/10.1155/2021/5592885>.
- Yildiz-Dalginli, K. (2025). Catalytic performance of lipase-inorganic hybrid nanoflower in the presence of some oils/fat/waste oils and detergents/surfactants. *Chemical Papers*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11696-025-04168-4>.
- Zago, E., Joly, N., Chaveriat, L., Lequart, V., & Martin, P. (2021). Enzymatic synthesis of amphiphilic carbohydrate esters: Influence of physicochemical and biochemical parameters. *Biotechnology Reports*, 30, e00631. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00631>.
- Zerizer, H., Boughachiche, F., Mebarki, A., Sinacer, O., Rachedi, K., & Ait Kaki, A. (2024). Partitioning purification, biochemical characterization, and milk coagulation efficiency of

protease from a newly *Streptomyces* sp. isolate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55(3), 2179-2187. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01386-y>.

Zhang, J., Doll, B. A., Beckman, E. J., & Hollinger, J. O. (2003). A biodegradable polyurethane-ascorbic acid scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 67(2), 389-400. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10015>.

Zhang, L., Zhang, H., Huang, Y., Peng, J., Xie, J., & Wang, W. (2021). Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrolling Fusarium wilt of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Frontiers in Microbiology*, 12, 763038. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.763038>

Zhao, J., Ma, M., Zeng, Z., Yu, P., Gong, D., & Deng, S. (2021). Production, purification and biochemical characterisation of a novel lipase from a newly identified lipolytic bacterium *Staphylococcus caprae* NCU S6. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 36(1), 249-257. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1861607>.

Zhu, D., Wu, Q., & Hua, L. (2019). Industrial enzymes. In M. Moo-Young (Éd.), *Comprehensive biotechnology* (3e éd., Vol. 3, pp. 1–13). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00148-8>.

Zulaika, A., Ningrum, S. S., & Guntama, D. (2021). Preliminary study of Actinomycetes as potential biocatalyst in biodiesel production through microbial lipase activity. *Jurnal Presipitasi: Media Komunikasi dan Pengembangan Teknik Lingkungan*, 18(3), 512-523. <https://doi.org/10.14710/presipitasi.v18i3.512-523>.

Zulaika, A., Rahman, H., Ningrum, S. S., & Maulida, A. F. (2024). Exploring microbial lipases: Screening and identification for biocatalyst potential in bioethanol synthesis from glycerol-based biodiesel waste. *Results in Engineering*, 23, 102427. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2024.102427>.

# **Annexes**

## Annexe 1

## 1. Milieux de culture

<b>Caséine- d'amidon agar (SCA)</b>	
Amidon soluble	10 g/L
Caséine	0.30 g/L
KNO <sub>3</sub>	2 g/L
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0.05 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g/L
NaCl	2 g/L
CaCO <sub>3</sub>	0.02 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01 g/L
Agar	18 g/L
pH	7,2
<b>GYM</b>	
Glucose	4 g/L
Extrait de levure	4 g/L
Extrait de malt	10 g/L
CaCO <sub>3</sub>	2 g/L
Agar	12 g/L
pH	7,2
<b>Bennett</b>	
Glucose	10 g/L
Peptone	2 g/L
Extrait de levure	1 g/L
Extrait de viande	1 g/L
Agar	15 g/L
Ph	7,3

<b>ISP 2</b>	
Extrait de malt	10 g/L
Extrait de levure	4 g/L
Glucose	4 g/L
Agar	15 g/L
pH	7,2

<b>Milieu xylane</b>	
Xylane (Sigma-Aldrich)	2 g/L
Extrait de levure	0.5 g/L
Peptone	0.0015 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g/L
KCl	0.5 g/L
Agar	20 g/L
pH	7,0

<b>Milieu CMC</b>	
Peptone	10 g/L
CMC	10 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,3 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g/L
Agar	20 g/L
pH	7,0

<b>ISP4</b>	
Amidon soluble	10g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1g/L
CaCO <sub>3</sub>	2g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g/L
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1g/L
NaCl	1g/L
Agar	20g/L
pH	7,3

<b>ISP5</b>	
L-asparagine	10g
Glycerol	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
Agar	20g
Eau distillée H <sub>2</sub> O	1000 mL
pH	7,2
Solution de sels traces	1 mL
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	1 g/100mL
MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	1 g/100mL
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	1 g/100mL

<b>ISP 9</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.64 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.38 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.31 g
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	1g
Agar	15g
pH	7,3

<b>Solution de sels traces</b>	1 mL
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0.64 g/L
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0.11 g /L
MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	0.15g /L
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0.79 g /L

#### Gélose nutritif

Extrait de levure	5 g/L
Peptone	10 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	20 g/L
pH	7,0

#### Tween 80

Bouillon nutritif	8 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g/L
Tween 80	10 mL/L
Agar	15 g/L
pH	7,0

## 2. Solutions

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

Acétate de sodium	4,10 g/L
Acide acétique glacial	2,85 g/L

#### Tampon phosphate 50 Mm

pH 6	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,84g/L
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,03g/L
pH 7	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,85g/L

---

$K_2HPO_4$	5,04g/L
------------	---------

---

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

Tris 0,05 M	50 mL
HCl 0,05 M	0,2 mL
Eau distillée	49,8 ml

---

**Solution NaOH 50 mM**

NaOH	0,2 g
Eau distillée	100 ml

---

**Solution NaCl 1M**

NaCl	5,85 g
Eau distillée	100 ml

---

**Solution rouge Congo 1%**

Rouge Congo	1g
Eau distillée	100 ml

---

**Solution de Lugol**

Iodure de potassium (KI)	2 g
Iode métalloïde ( $I_2$ )	1 g
Eau distillée	100 ml

---

## Annexe 2

## 1. Test d'utilisation des sources de carbone glucidiques

Tableau 12 : Classification de la croissance lors des tests de sources de carbone et du milieu de base (Shirling et Gottlieb 1966)

La croissance observée est	Symbole
Inférieur au contrôle négatif	–
Mieux que dans le contrôle négatif, mais pas aussi bien que dans le contrôle positif	(+)
Similaire au contrôle positif	+
Meilleur que le contrôle positif	++

## 2. quantification des protéines par méthode de Bradford

- Préparation de réactif de Bradford

Bleu de Coomassie G250 100 mg

Ethanol 95% 50 ml

Agitation pendant 2 heures on ajoute :

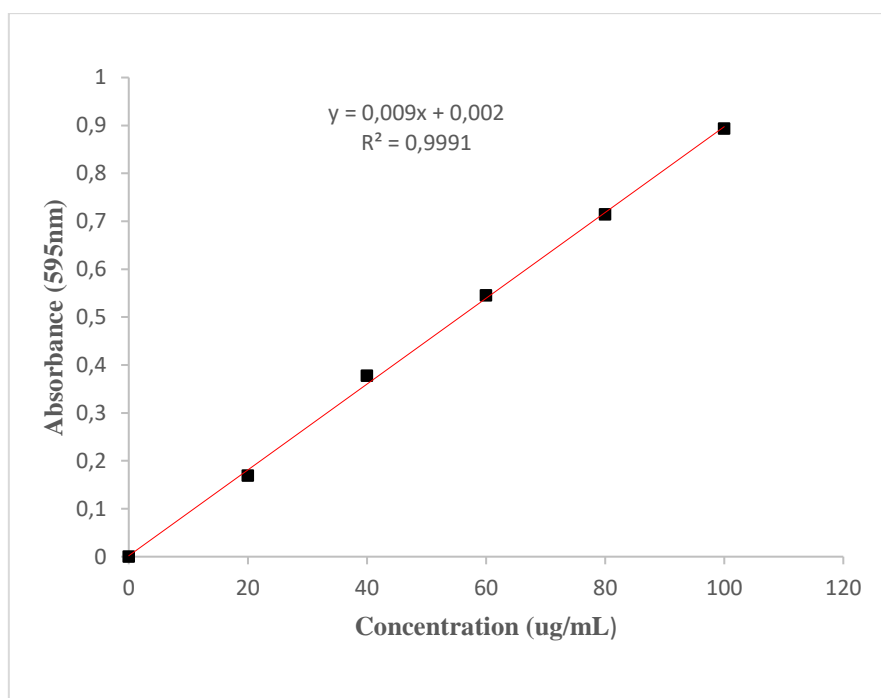
Acid ortho phosphorique 100 ml

H<sub>2</sub>O distillée q.s.p 1000 ml

- Préparation de la gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (SAB) de 0,1 mg/ml.

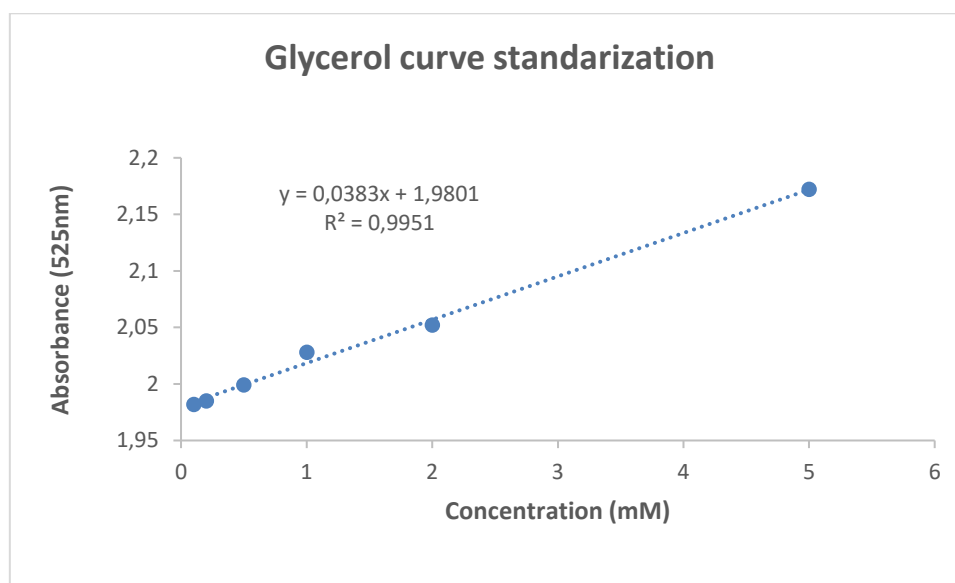
Tableau 13 : Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (BSA)

Tubes	1	2	3	4	5	6
BSA (µL)	00	20	40	60	80	100
Eau distillée (µL)	100	80	60	40	20	00
Réactif BBC (mL)	4	4	4	4	4	4



**Figure 29** : Courbe d'étalonnage de la BSA

### 3. Réalisation de courbe d'étalonnage du glycérol (cinétique enzymatique)



**Figure 30** : courbe d'étalonnage du glycérol à 1 M

Dans notre cas, au lieu de mesurer directement l'absorbance du glycérol (dans le domaine UV), nous avons suivi la consommation du permanganate. Ainsi, l'absorbance diminue au fur et à mesure de l'oxydation du glycérol. En d'autres termes, la diminution de l'absorbance de  $\text{KMnO}_4$  est due à sa consommation lors de la réaction d'oxydation avec le glycérol dans un milieu acide.

La courbe décroissante obtenue a été convertie en une courbe croissante. Pour ce faire, l'absorbance initiale  $A_0$ , correspondant à la concentration initiale de permanganate en l'absence de glycérol, a d'abord été mesurée. L'absorbance liée uniquement à la consommation de permanganate a ensuite été calculée selon l'expression :

$$A_{\text{consommé}} = A_0 - A$$

Pourquoi la courbe ne passe pas par zéro :

L'absorbance initiale non nulle : la solution initiale contient de  $\text{KMnO}_4$  présente une absorbance élevée et maximale à 525 nm avant que la réaction avec le glycérol ne commence. Ainsi, même en l'absence de glycérol (concentration = 0 mM), l'absorbance mesurée n'est pas nulle.

La loi de Beer-Lambert reste néanmoins applicable, car elle décrit une relation linéaire entre la variance de l'absorbance de permanganate consommé et la concentration de glycérols oxydé. Cependant, l'axe des ordonnées est décalé en raison de l'absorbance initiale

#### 4. Résultats de Criblage primaire enzymatiques des isolats d'actinomycètes

**Tableau 14** : diamètres des halos enzymatiques des isolats d'actinomycètes en (mm)

Région	Isolat	Activité enzymatique (mm)		
		Amylase	Protéase	Lipase
Aïn Sefra	AS1	30	+	29
	AS2	26	12	27
	AS3	-	+	31
	AS4	29	+	28
	AS5	28	+	30
	AS6	25	27	24
	AS7	18	20	30
	AS8	+	22	31
	AS9	11	19	32
	AS10	30	28	22
	AS11	+	+	26
	AS12	16	+	33
	AS13	20	16	40
	AS14	16	19	13
	AS15	18	-	+
Naâma	NS1	24	21	31
	NS2	30	+	28
	NS3	30	9	21

	<b>NS4</b>	16	30	30
	<b>NS5</b>	+	10	-
	<b>NS6</b>	-	+	32
	<b>NS7</b>	25	20	29
	<b>NS8</b>	30	+	30
	<b>NS9</b>	21	+	33
Béchar	<b>BEC1</b>	30	-	25
	<b>BEC2</b>	21	26	23
	<b>BEC3</b>	28	16	31
	<b>BEC4</b>	32	22	30
	<b>BEC5</b>	18	31	20
Saida	<b>CEq1</b>	24	20	33
	<b>CEq2</b>	22	-	26
	<b>CEq3</b>	16	-	22
	<b>CEq4</b>	23	-	27
	<b>CEq5</b>	21	-	30
	<b>CEq6</b>	22	-	19
	<b>CEq7</b>	-	+	22
	<b>CEq8</b>	16	-	-
	<b>CEq9</b>	+	21	-
	<b>CEq10</b>	22	-	-
	<b>CEq11</b>	20	-	15
	<b>CEq12</b>	19	-	-
	<b>CEq13</b>	17	10	25
	<b>CEq14</b>	22	-	13
	<b>CEq15</b>	23	12	28
	<b>CEq16</b>	+	15	21
	<b>CEq17</b>	30	+	20
	<b>CEq18</b>	20	+	16
	<b>CEq19</b>	18	25	25
	<b>CEq20</b>	-	-	30
	<b>CEq21</b>	+	24	-
	<b>CEq22</b>	24	28	-
	<b>CEq23</b>	20	-	27
	<b>CEq24</b>	+	-	18
	<b>CEq25</b>	27	-	22
	<b>CEq26</b>	10	+	-
	<b>CEq27</b>	21	-	23
	<b>ERP1</b>	-	20	24
	<b>ERP2</b>	-	+	13
	<b>ERP3</b>	28	21	25
	<b>ERP4</b>	23	16	32
	<b>ERP5</b>	+	20	19
	<b>ERP6</b>	32	+	26

Saida	<b>ERP7</b>	18	-	33
	<b>ERP8</b>	20	-	29
	<b>ERP9</b>	22	+	18
	<b>ERP10</b>	20	-	25
	<b>ERP11</b>	33	-	26
	<b>ERP12</b>	20	10	-
	<b>ERP13</b>	-	-	25
	<b>ERP14</b>	27	-	22
	<b>ERP15</b>	-	-	19
	<b>ERP16</b>	16	-	18
	<b>ERP17</b>	23	21	19
	<b>ERP18</b>	22	+	19
	<b>ERP19</b>	22	28	18
	<b>ERP20</b>	33	-	+
	<b>ERP21</b>	5	29	-
	<b>ERP22</b>	33	+	23
	<b>ERP23</b>	30	26	-
	<b>ERP24</b>	17	-	25
	<b>ERP25</b>	19	16	22
	<b>ERP26</b>	18	21	33
	<b>ERP27</b>	22	25	20
	<b>ERP28</b>	21	15	+
	<b>ERP29</b>	-	-	+
	<b>ERP30</b>	23	25	16
	<b>ERP31</b>	23	20	26
	<b>ERP32</b>	21	-	28
	<b>ERP33</b>	20	-	23
	<b>ERP34</b>	+	+	34
	<b>ERP35</b>	+	+	27
	<b>ERP36</b>	26	18	+
	<b>ERP37</b>	28	20	-
	<b>ERP38</b>	22	28	40

**Note :** (+) activité faible ; (-) activité non détectée