

N° d'Ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Intitulé du thème :

**Isolement et caractérisation de bactéries productrices
de protéase**

Présenté par : **Melle** Boukerche Maghnia

Melle Mostari Radjâa

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury : **Mr** Benine Mohamed Lamine (M.C.A/ UDL/SBA)

Examineur : **Mme** Ghalem. Mimouna (M.C.B/ UDL/SBA)

Promoteur : **Melle** Kanoun Khedoudja (M.C.A/ UDL/SBA)

Co-Promoteur : **Mme** Nourine Zeyneb (Doctorant/ UDL/SBA)

Année universitaire 2019 - 2020

Session : « Septembre »

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier en premier lieu « الله » le tout puissant de nous avoir donné la force et le courage pour réaliser ce travail.

Nous tenons à présenter nos respectueuses reconnaissances et remerciements à notre encadreur Dr **Kanoun. K**, pour son aide technique, son orientation et aussi pour la confiance qu'elle nous a accordée en acceptant cet encadrement.

Nos remerciements vont en particulier à notre co-encadreur M^{me} **Nourine. Z** de nous avoir proposé ce sujet et de diriger notre travail par ses précieux conseils et encouragements.

Nos sincères remerciements vont aussi aux membres de jury pour l'honneur qu'ils auront fait en acceptant de juger ce travail :

À Mr. **Benine. M. L** d'avoir accepté de présider ce travail.

À Mme **Ghalem. M** d'avoir consacré son temps pour examiner ce travail.

Nous tenons à remercier chaleureusement tous nos enseignants, qui nous ont suivis le long de notre cursus d'études.

Nos remerciements vont aussi aux ingénieurs du laboratoire de Microbiologie Appliquée et de Microbiologie Générale pour leurs accueils, leurs patiences, aides et valeureux conseils.

C'est avec un réel plaisir que nous adressons nos sincères reconnaissances et notre profonde gratitude à tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour réaliser cette étude.

Enfin, nous remercions tout particulièrement nos familles pour leur soutien constant durant toutes ses années d'études.

Boukerche Maqnia & Mostari Radjâa

Dédicaces

Avant tout, je remercie « الله », le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui m'aide et me donne le courage de tout faire. Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut. Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect et la reconnaissance.

Ainsi, c'est tout simplement que je dédie ce mémoire

À mes très chers parents, les prunelles de mes yeux.

À ma mère Yamina qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privatisations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ces enfants.

À mon cher papa Ali qui a su se montrer patiente, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

Veillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel. Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur.

À mes chères sœurs Zahîya, Marwa et Aya. Que Dieu vous protège.

À toute ma famille entière « Boukerche /Mostari ».

À mon encadreur Dr Kanoun, je vous remercie pour votre disponibilité et vos précieux conseils.

À mon co-encadreur M^{me} Nourine.

À tous mes amies et collègues de la promotion.

À tous ceux que j'ai

Mostari Radjâa

Dédicaces

À ma mère

À Qui je dois la vie et une part essentielle de ma personnalité. Qu'elle sache que l'amour qu'elle me donne continue à m'animer et me permet d'envisager l'avenir comme un défi.

À mon père

Décédé trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

À mes chères sœurs

Farida et Fouzia pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral. Que Dieu vous protège.

À mes oncles

Pour leurs soutiens, leurs aides et leurs conseils..... Je leurs dis merci !

À mes grands-parents paternels

Pour ces louanges, je leurs souhaite également une longue convalescence.

Et pour terminer je dédie ce travail à mes proches, toute ma famille et tous mes amis sans prononcer les noms pour ne pas oublier certaines personnes et pour tous ceux qui m'aiment et à tout ceux que j'aime...Merci.

Boukerche Maghnia

Résumé

La demande industrielle des préparations actives des enzymes protéolytiques, produites par des microorganismes appropriées, aux pH et aux températures extrêmes stimule à continuer la recherche de nouvelles souches productrices de protéase à intérêt biotechnologique. Ces enzymes constituent un rôle important dans divers utilisations commerciales, telle que l'industrie pharmaceutiques et les traitements des eaux usées industrielles.

La présente étude devrait porter sur l'isolement et la caractérisation des bactéries protéolytiques. Dans cette optique des échantillons devraient être prélevés à partir de sols riches en protéines et de source thermale, au niveau de la région de Sidi-Bel-Abbès et d'Ain Temouchent en Algérie. La première partie devrait consiste à purifier les souches bactériennes ayant une activité protéolytique par un screening primaire. Après isolement et purification des isolats sur gélose nutritive additionnée au lait écrémé, on devrait passer à la sélection des souches les plus performantes, par mesure de la zone d'hydrolyse, sur un milieu spécifique à la production de l'enzyme protéase.

L'identification phénotypique des souches sélectionnées est devrait basée sur plusieurs critères, qui sont définies par différentes techniques : l'étude macroscopique et microscopique des isolats, la détermination du type respiratoire, la mobilité, la formation des spores ainsi que l'étude des caractères biochimiques tel que la recherche de catalase et d'oxydase, ainsi que l'utilisation de la galerie API20E pour définir le genre des isolats.

La production de l'enzyme est estimée par le dosage de l'activité protéolytique, sur le milieu de production liquide. L'activité enzymatique devrait mesurée a l'aide d'un spectrophotomètre, qui nous permet aussi d'étudier les propriétés de l'enzyme protéase tel que le pH, la température et la durée d'incubation optimale, pour une production enzymatique maximale. L'étude rétrospective que nous avons faite s'avère que, la plupart des bactéries productrices de protéase sont des bactéries à Gram positif comme *Bacillus sp.*

Mots clés : protéase, caractérisation, bactéries protéolytique, identification, activité protéolytique.

Abstract

The industrial demand for active preparations of proteolytic enzymes, produced by appropriate microorganisms, at pH and temperature extremes, stimulates further research into new protease-producing strains of biotechnological interest. These enzymes play an important role in various commercial industry and industrial wastewater treatment.

The present study focused on the isolation and characterization of proteolytic bacteria. With this in mind, samples were taken from soils rich in proteins and from a thermal spring, in the region of Sidi-Bel-Abbes and Ain temouchent in Algeria. The first part consists in purifying the bacterial strains having a proteolytic activity by a primary screening. After isolation and purification of the isolates on nutrient agar added to skimmed milk, the selection of the best performing strains is carried out, by measuring the hydrolysis zone, on a medium specific to the production of the protease enzyme.

The phenotypic identification of the selected strains is based on several criteria, which are defined by different techniques: the macroscopic and microscopic study of the isolates, the determination of the respiratory type, the mobility, the formation of the spores as well as the study of the biochemical characters such as the search for catalase and oxidase, as well as the use of the API20E gallery to define the genus of isolates.

The production of the enzyme is estimated by assaying the proteolytic activity on the liquid production medium. The enzymatic activity is measured using a spectrophotometer, which also allows us to study the properties of the protease enzyme such as pH, temperature and optimal incubation time, for maximum enzyme production. The retrospective study that we made turns out that most of the bacteria producing protease are bacteria with Gram positive such as *Bacillus sp.*

Keywords: protease, characterization, proteolytic bacteria, identification, proteolytic activity.

ملخص

ان الطلب الصناعي على المستحضرات النشطة للانزيمات المحللة للبروتين، التي تنتجها الكائنات الدقيقة المناسبة، عند درجة الحموضة و درجات الحرارة المثالية يحفز على مواصلة البحث عن سلالات جديدة تنتج البروتياز ذات الاهمية التكنولوجية الحيوية. تلعب هذه الانزيمات دورا مهما في الاستخدامات التجارية المختلفة، مثل صناعة الادوية و معالجة مياه الصرف الصناعي.

ركزت الدراسة الحالية على عزل و توصيف البكتيريا المحللة للبروتين. و من هذا المنطلق، تم اخذ عينات من تربة غنية بالبروتينات و من نبع حراري بمنطقة سيدي بلعباس و عين تموشنت بالجزائر. يتكون الجزء الاول من تنقية السلالات البكتيرية ذات النشاط التحللي للبروتين عن طريق الفحص الاول. بعد عزل و تنقية العزلات على اجار المغذيات المضافة الى الحليب منزوع الدسم، ننتقل الى اختيار افضل السلالات اداء، من خلال قياس من التحلل، على وسط خاص بانتاج انزيم البروتياز.

يعتمد تحديد النمط الظاهري للسلالات المختارة على عدة معايير يتم تحديدها بواسطة تقنيات مختلفة: الدراسة المجهرية و الميكروسكوبية للعزلات، و تحديد نوع الجهاز التنفسي، و التنقل، و تكوين الجراثيم و كذلك دراسة الخصائص البيوكيميائية مثل البحث عن الكتالاز و الاوكسيداز، و كذلك استخدام معرض ابي 20 او لتحديد جني العزلات.

يتم تقدير لنتاج الانزيم بمعايرة نشاط التحلل للبروتين على الوسط. يتم قياس نشاط الانزيم باستخدام مقياس الطيف الضوئي، و الذي يسمح لنا ايضا بدراسة خصائص انزيم البروتياز مثل درجة الحموضة و درجة الحرارة و وقت الحضانه الامثل، لتحقيق اقصى انتاج للانزيم. اظهرت الدراسة باثر رجعي التي اجريناها ان معظم البكتيريا المنتجة للبروتياز هي بكتيريا موجبة الجرام مثل

Bacillus sp.

الكلمات الدالة : البروتياز، توصيف، البكتيريا المحللة للبروتينات، تحديد، الانشطة البروتينية.

Table des matières

Remerciements	II
Dédicaces	III
Dédicaces	II
Résumé	III
Abstract	IV
ملخص	V
Liste des abréviations	XII
Liste des tableaux	XIII
Liste des figures	XIV
Liste des annexes	XV
Introduction	1
Synthèses bibliographiques	4
1 Généralités sur les enzymes	5
1.1 Définition des enzymes	5
1.2 Classification des enzymes	5
1.3 Marché des enzymes.....	6
1.4 Origine des enzymes industrielles.....	7
2 Les enzymes protéolytiques	7
2.1 Historique et évolution des protéases	7
2.2 Définition des protéases.....	8
2.3 La classification et nomenclature.....	8
2.3.1 Selon longueur de la chaîne polypeptidique.....	9
2.3.2 Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....	9
2.3.3 Selon la nature du résidu impliqué dans le site actif	10
2.3.4 Selon le pH d'activité.....	13
2.4 La structure de protéases.....	13
2.5 Masse moléculaire.....	14
2.6 Mode d'action	14
2.7 Substrat des protéases.....	15
2.7.1 Définition d'une protéine	15
2.7.2 Structure d'une protéine.....	16
2.7.3 Principales propriétés d'une protéine.....	17

2.8	Propriétés analytiques de la protéase.....	18
3	Les facteurs influençant la production de protéases.....	20
3.1	Les facteurs abiotiques influençant la production de protéases	20
3.1.1	Effet de la température	20
3.1.2	Effet de pH.....	20
3.1.3	Aération et agitation	20
4	Les facteurs biotiques influençant la production de protéases.....	21
4.1	Influence de source de carbone	21
4.2	Influence de la source d'azote.....	21
4.3	Influence du solvant organique.....	22
4.4	Influence d'ions métalliques.....	22
4.5	Influence des éléments de trace	22
5	Origine des protéases	22
5.1	Protéases d'origine végétale	22
5.2	Protéases d'origine animale	23
5.3	Protéases d'origines microbiennes	24
5.3.1	Protéases bactériennes	25
5.3.2	Protéases des mycète.....	25
5.3.3	Protéases des levures.....	25
5.3.4	Protéases virales.....	25
6	Application industrielles des protéases	26
6.1	Industrie alimentaire	27
6.1.1	Préparation du fromage	27
6.1.2	Boulangerie.....	27
6.1.3	Produits à base de soja.....	28
6.1.4	Synthèse de l'aspartame	28
6.2	Domaine pharmaceutique et médical.....	28
6.3	Tanneries	29
6.4	Détergents.....	29
6.5	Traitement des eaux usées industrielles.....	29
6.6	Industrie chimique.....	30
7	Tendances en recherche et développement pour la production de protéases	30
7.1	Nouvelles souches productrices de protéases	30
7.2	Production de protéases dans les milieux de cultures alternatifs	32

Matériels et méthodes	33
1 Matériels et produits utilisés	34
2 Objectifs	34
3 Échantillonnage	34
4 Isolement des souches protéolytiques	35
5 Purification des souches protéolytiques	36
6 Screening des souches protéolytiques les plus performantes	36
7 Identification phénotypique des souches	38
7.1 Critères morphologique	38
7.2 Étude microscopique	38
7.2.1 Observation microscopique a l'état frais	38
7.2.2 Observation microscopique à l'état fixé	39
7.3 Détermination du type respiratoire (gélose viande foie)	39
7.4 Mobilité (milieu mannitol mobilité)	40
7.5 Conservation des souches isolées	41
7.6 Étude biochimique	41
7.6.1 Recherche de l'oxydase	41
7.7 Recherche de la catalase	42
7.8 Métabolisme des molécules large	42
7.8.1 Recherche de lipase	42
7.8.2 Recherche d'amylase	42
7.8.3 Recherche de cellulase	43
8 Étude de l'activité protéolytique	43
8.1 Dosage de l'activité protéolytique	43
8.2 Préparation de l'inoculum	43
8.2.1 Milieu de production de la protéase	43
8.2.2 Préparation de pré-culture	44
8.2.3 Culture en batch	44
8.2.4 Suivi de la cinétique de la croissance	44
8.3 Mesure de l'activité protéolytique	44
8.4 Étude des propriétés de l'enzyme	45
8.4.1 Étude de l'effet de la durée d'incubation	45
8.4.2 Influence du pH	45
8.4.3 Influence de la température	46

9 Identification biochimique par la galerie API 20 E	46
Résultats et discussions	47
Conclusion.....	56
Références bibliographiques	58
Annexes	70

Liste des abréviations

A : *Aspergillus*.

B : *Bacillus*.

BHIB: Brain Heart Infusion Broth

CMS: Carboxy méthyl cellulose

Dalton : unité de masse atomique unifiée.

DFP : di-isopropylfluorophosphate.

E.coli : *Escherichia coli*.

EC : est le signe d'Enzyme Commission numbers.

EDTA : Acide Diaminoétracarboxylique.

kDa: Kilodalton

Nm : Nanomètre.

ONPG: Orto-nitro-phényl- β -D-galactopyranoside.

P: *Penicillum*.

PCMB : p-chloromercuribenzoate.

pH : le potentiel hydrogène.

Phe-Met : phénylalanine-méthionine.

pK : constante d'acidité ou constante de dissociation acide.

PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyle.

rpm : Rotation par minute.

SIDA : Syndrome d'Immuno- Déficience Acquise.

TCA : solution d'acide trichloracétique.

Liste des tableaux

	Numéro de page
Tableau .01 : Principales classes des enzymes.....	06
Tableau .02 : Illustration de la spécificité des protéases.....	08
Tableau .03 : Classification des protéases.....	09
Tableau .04 : Propriétés analytiques de quelques enzymes protéolytiques.....	19
Tableau .05 : Quelques protéases microbiennes.....	24
Tableau .06 : Exemples de protéases commerciales.....	26
Tableau .07 : Nouveaux microorganismes producteurs de protéases aux propriétés intéressantes faisant l'objet de travaux de recherches.....	31
Tableau .08 : Substrats alternatifs pour la production de protéases faisant l'objet de travaux de recherche.....	32
Tableau .09 : Bactéries protéolytiques identifiées par d'autres chercheurs.....	48
Tableau .10 : Propriétés de l'enzyme protéase pour une activité maximale.....	51
Tableau .11 : La liste des équipements ainsi que le matériel utilisé par nous dans la réalisation de ce travail.....	75

Liste des figures

	Numéro de page
Figure .01 : Distribution des ventes des enzymes.....	07
Figure .02 : Mode d'attaque de la chaine polypeptidique.....	10
Figure .03 : Présentation des quatre types d'endopeptidase.....	12
Figure .04 : Présentation de la structure tridimensionnelle de protéases.....	14
Figure .05 : Mécanisme d'action des protéases.....	15
Figure .06 : Structure générale d'une acide amine.....	15
Figure .07 : Formule développée d'une protéine.....	16
Figure .08 : Structure secondaire d'un protéine.....	16
Figure .09 : Structure tertiaire d'une protéine.....	17
Figure .10 : Structure quaternaire d'une protéine.....	17
Figure .11 : Station thermale de Hammam Bouhadjar dans la Wilaya d'Ain Temouchent.....	36
Figure .12 : Plan expérimental de l'enchainement des méthodes utilisées.....	38
Figure .13 : Détermination de type respiratoire.....	42
Figure .14 : Galerie API 20E et leur catalogue témoin.....	45

Liste des annexes

Annexe A : Composition des milieux de culture utilisés.

Annexe B : Composition des colorants utilisés.

Annexe C : Composition des réactifs utilisés.

Annexe D : Compositions de solutions utilisées.

Annexe E : Matériel non biologique.

Introduction

Introduction

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques indispensables à la vie cellulaire, aucune des réactions métaboliques ne serait possible sans elles. Les enzymes présentent également une grande importance économique, notamment dans le domaine agro-alimentaire, ainsi qu'une importance médicale considérable, étant donné que certaines d'entre elles sont utilisées comme biomarqueurs de pathologies, d'autres sont des médicaments ou des cibles des diverses thérapeutiques. Les enzymes sont aussi des outils essentiels dans les laboratoires de recherche, par exemple pour découper des protéines ou des acides nucléiques.

Au cours des dernières décennies, les enzymes sont devenues une star des paillasses en biotechnologies. Il convient de souligner que la forte présence de ces biocatalyseurs résulte de l'intérêt économique qu'elles présentent dans les différents secteurs de bio-industries (**Rao et al., 1998**).

La plus grande partie du marché des enzymes est liée aux enzymes de type hydrolytique, parmi les enzymes hydrolytiques les plus vitales. Les protéases, ces dernières occupent une position centrale, elles représentent environ 60 % du marché global des enzymes (**Mahajan et Badgajar, 2010**) et offrent de nombreuses possibilités d'utilisation en thérapie (plusieurs études cliniques rapportent leur application en oncologie), en industries alimentaires (panification, brasserie, fromagerie, attendrissage de la viande, ...ect), en tannerie, en cosmétique, dans les détergents...etc (**Vishwanatha et al., 2010**).

Les protéases sont ubiquistes, elles se retrouvent aussi bien chez les microorganismes que chez les animaux et les plantes. Cependant, grâce à leur diversité biochimique extensive, les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases (**Botton et al., 1999; García-Gómez et al., 2009**), en raison de la grande variété d'activités catalytiques potentiellement disponible, des rendements de production élevés, de la facilité de la manipulation génétique, l'approvisionnement régulier en raison de l'absence de fluctuations saisonnières et la croissance rapide de microorganismes sur des substrats peu coûteux (**Scriban, 1993**).

Actuellement, la compétition est très forte dans le monde des enzymes industrielles et les prix de ces produits de hautes technologies sont à la baisse, entraînant des réductions majeures dans les coûts de production. La capacité de l'industrie de produire des enzymes à un faible coût est donc essentielle pour maintenir sa compétition. (**Meunier, 1999**).

Le présent projet de recherche très bien vise donc à analyser les études réalisées sur les bactéries protéolytiques, afin d'étudier les différentes techniques employées pour la caractérisation de ces souches microbiennes, l'optimisation de leurs activité enzymatique et l'interprétation des résultats obtenus.

*Synthèses
bibliographiques*

1 Généralités sur les enzymes

1.1 Définition des enzymes

Les enzymes sont des protéines de très hauts poids moléculaires (10 000 à 1 000 000 Daltons) et sont constituées de longues chaînes d'acides aminés retenues ensemble par des liens peptidiques (**Pelczar et Chan, 1981**). Ce sont toutes des macromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaires. Certaines sont des holoprotéines constituées uniquement d'un enchaînement d'acides aminés, d'autres sont des hétéroprotéines possédant une partie non protéique, le cofacteur, nécessaire à l'activité catalytique et lié plus ou moins fortement à la protéine (**Arnaud et al., 1993**). Elles sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (**Simon et Meunier, 1970 ; Arnaud et al., 1993**).

Les enzymes agissent comme des catalyseurs de réactions chimiques. Leur plus grande particularité est leur très grande sélectivité à catalyser ces réactions chimiques, car contrairement aux catalyseurs inorganiques comme les acides, les bases, les métaux et les oxydes métalliques, les enzymes sont très spécifiques. Ainsi, chaque enzyme peut briser ou synthétiser un composé particulier (**Arnaud et al., 1993**).

De façon générale, la majorité des réactions enzymatiques peut être représentée par l'équation suivante:



Où l'enzyme E et le substrat S se combine pour former le complexe enzyme-substrat ES qui se brise pour donner le produit P. L'enzyme demeure intacte au cours de cette réaction et elle est réutilisée jusqu'à ce que tout le substrat ait été consommé (**Meunier, 1999**).

1.2 Classification des enzymes

La nomenclature et la classification des enzymes ont été normalisées par la Commission sur les Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie, créée en 1955, afin de remédier à la confusion qui régnait alors dans ce domaine et risquait de s'aggraver avec les progrès rapides des connaissances sur les enzymes (**Arnaud et al., 1993**). Une classification des enzymes en six groupes a donc été établie selon leur action spécifique est présentée dans le (**Tableau .01**)

Ces principaux groupes sont ensuite subdivisés en plus petits ensembles encore plus spécifiques quant aux réactions biochimiques catalysées (**Meunier, 1999**).

Tableau .01 : Principales classes enzymes (Benlounissi, 2004).

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductases	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atomes d'hydrogène).
Transférases	Transfert de radicaux (Groupement phosphates, amines, méthyle, ect.).
Hydrolases	Réactions d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau).
Lyase	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse.
Isomérases	Réactions d'isomérisation (réaction où un composé est transformé en un de ses isomères).
Ligases	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP.

1.3 Marché des enzymes

La plus grande partie de ce marché est liée aux enzymes de type hydrolytique comme les protéases, les cellulase et les lipases. La plus grande partie de ces enzymes hydrolytiques (80%) se retrouvent dans l'industrie des détergents tandis que, les 20% restants sont majoritairement dans l'industrie alimentaire et l'industrie de textile. D'ailleurs, globalement, l'industrie des détergents accapare 34% du marché total des enzymes industrielles, soit plus du double des industries alimentaires et de l'industrie des textiles (**Meunier, 1999**).

Les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes, soit environ 60% (**Garcia-Gomez et al., 2009 ; Rai et Mukherjee, 2010**) (**Figure .01**). Les ventes industrielles des protéases sont estimées à plus de 350 millions US\$ annuellement (**Kumar et al., 2008a**).

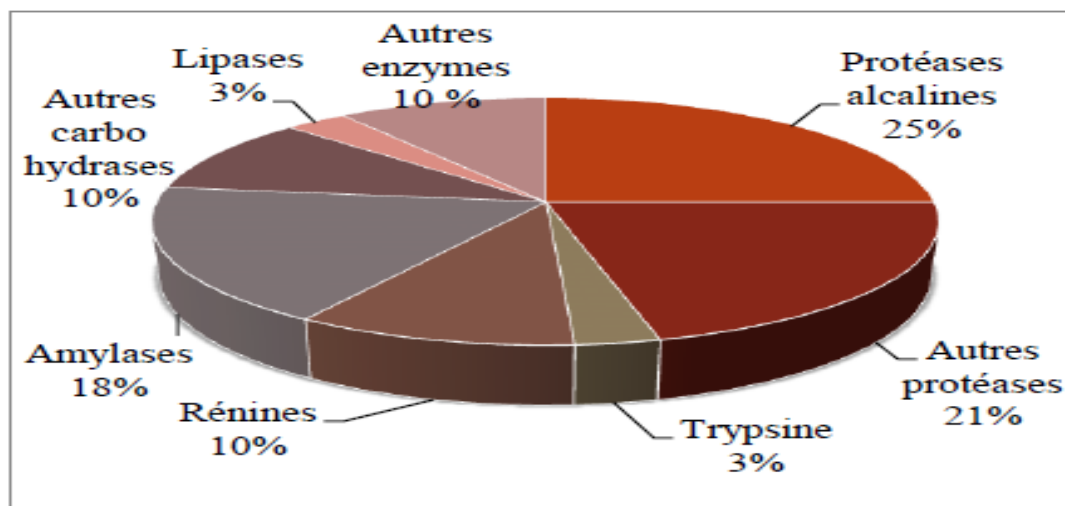


Figure .01 : Distribution des ventes des enzymes (Rao *et al.*, 1998).

1.4 Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles peuvent avoir plusieurs origines dont les plantes, les animaux et les microorganismes (Aviron-Violet *et al.*, 1982 ; Arnaud *et al.*, 1993).

La synthèse d'enzymes à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler. Dès lors, la production d'enzymes à partir de la flore microbienne est l'avenue privilégiée par les productions ; puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants. En fait, les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont ; une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (Arnaud *et al.*, 1993).

2 Les enzymes protéolytiques

2.1 Historique et évolution des protéases

L'industrie d'enzymes protéolytiques est en pleine progression et enregistre un chiffre d'affaire important avec une augmentation considérable depuis les années 80 (Aehle *et al.*, 1993). En 1998, les hydrolases ont présenté 75% des enzymes industrielles (Rao *et al.*, 1998).

La Takadiastase, est la première protéase industrielle, utilisée dans l'industrie de textile et les tanneries, découverte par Takamine en 1890 et produite par *A. oryzae* sur un milieu à

base de blé (**Sadek, 2000**). Par ailleurs, la Subtilisin Carlsberg, découverte en 1947, produite par *B. licheniformis* et commercialisée depuis 1960 par la compagnie Novo Nordisk (Danemark) (**Yeza, 2005**). Cependant, les protéases pancréatiques sont utilisées pour le délainage des peaux et comme agent de pré-lavage en 1910, et actuellement remplacées par des protéases d'origine microbienne (**Bezawada et al., 2010**).

2.2 Définition des protéases

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases (**Sekar et al., 2016**). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites extracellulaires comme intracellulaires. Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogène inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux. L'activation du zymogène en enzyme active nécessite une modification covalente irréversible. La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysât de protéines, ou d'un mélange d'acides aminés. Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulateurs plus spécifiques (**Drouin, 2005**). Le **(Tableau .02)** montre la spécificité des protéases.

Tableau .02 : Illustration de la spécificité des protéases (**Rao et al., 1998**).

Enzyme	Liaison peptidique à cliver
Trypsine	-Lys (ou Arg) ↓.....
Chymotrypsine, subtilisine.....	-Trp (ou Try, Phe, Leu) ↓...
<i>Staphylococcus</i> V8protéase.....	-Asp (ou Glu) ↓...
Papaïne.....	-Phe(ou Val, Leu)-Xaa ↓....
Thermolysine.....↓ Leu (ou Phe).....
Pepsine.....	-Phe (ou Try, Leu) ↓Trp(ouPhe, Try)

La flèche indique le site d'action des protéases ; Xaa, n'importe quel acide aminé.

2.3 La classification et nomenclature

Dans la nomenclature internationale officielle des enzymes, les protéases représentent la catégorie EC 3.4 où le 3 fait référence aux hydrolases et le 4 aux peptidases. Selon la

classification de référence, disponible dans la base de données électronique Merops (**Rawlings et al., 2006**). Cependant, elles ne se soumettent pas facilement dans ce système de classification à cause de la complexité de leur structure et de leur mécanisme d'action ; leur classification se base sur plusieurs critères tels que : la longueur de la chaîne polypeptidique, le mode d'attaque de la chaîne et le pH d'action et la nature de résidu impliqué dans le site actif (**Colwelle et Grigorova, 1989 ; Rao et al., 1998**).

2.3.1 Selon longueur de la chaîne polypeptidique

C'est le premier critère de classification des enzymes protéolytiques. Il existe deux catégories ; les protéases, qui scindent la molécule protéique en fragments polypeptidiques et les peptidases qui hydrolysent les polypeptides et les transforment en acides aminés libres (**Frazier, 1967 ; Clewell et Grigorova, 1989**).

2.3.2 Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique

Les peptidases sont subdivisés en deux classes : les endopeptidases et les exopeptidases (**Scriban, 1999 ; Moodie, 2001**). Ces dernières sont-elles –mêmes subdivisées en deux sous-classes les aminopeptidases et les carboxypeptidases (**Figure .02**). Le (**Tableau .03**) représente les classes et les sous-classes des protéases.

Tableau .03 : Classification des protéases (**Rao et al., 1998**).

Type de protéase	Classes et sous-classes
Exopeptidases	Aminopeptidases - Endopeptidases. - Peptidyle peptidase. - Dipeptidyle peptidases. - Tripeptidyle peptidases. Carboxypeptidases - Sérine carboxypeptidase. - Metallocoarboxypeptidase. - Cystéine carboxypeptidase.
Endopeptidases	Protéases sérines - Protéases cystéines ou protéases thiols. - Protéases aspartiques ou protéases acides. - Métallo-protéase.

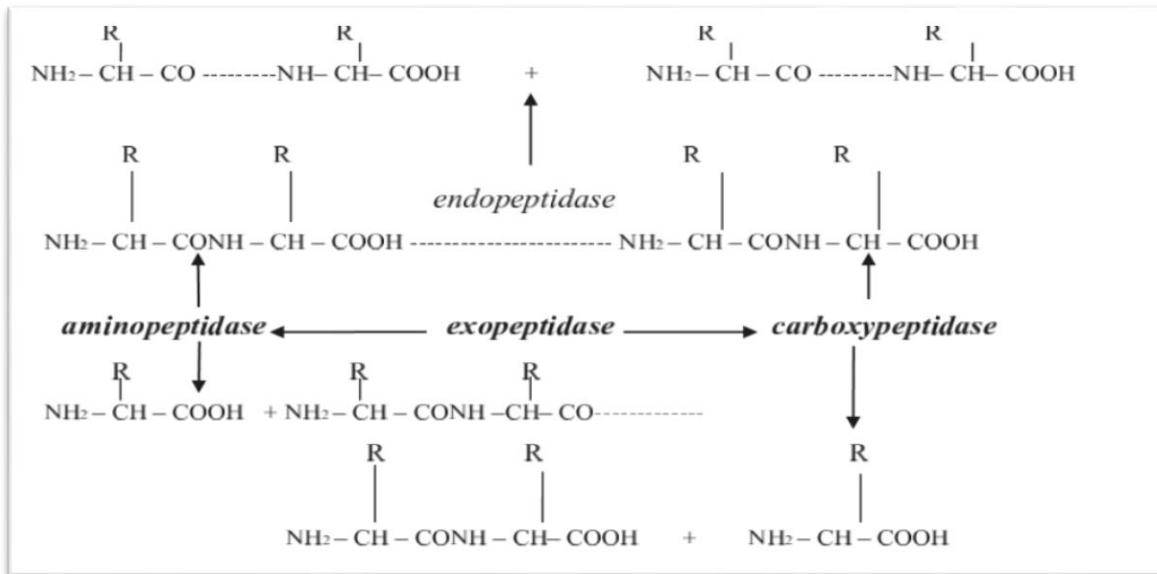


Figure .02 : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (Scriban, 1999).

2.3.2.1 Exopeptidase

Les exopeptidase hydrolysent le lien peptidique près des extrémités N ou C terminal des protéines. Ces enzymes sont faiblement utilisées en industrie (Puri *et al.*, 2002).

➤ Les aminopeptidases

Les aminopeptidases sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité N-terminale des protéines. Elles libèrent ainsi un seul acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide, d'où les sous-classes. Beaucoup d'aminopeptidases sont spécifiques aux protéines ayant un résidu méthionine en position N-terminale, qui est alors libéré sous l'action de ses protéases (Rao *et al.*, 1998).

➤ Les carboxypeptidases

Les carboxypeptidases sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité C-terminale des protéines. Elle libère ainsi un seul acide aminé ou un dipeptide. Les carboxypeptidases sont divisées en trois sous-classes, soit les sérines carboxypeptidases, les métallo-carboxypeptidases et les cystéines carboxypeptidases, selon la nature des acides aminés présents au site actif de l'enzyme et selon le mécanisme catalytique (Rao *et al.*, 1998).

2.3.3 Selon la nature du résidu impliqué dans le site actif

2.3.3.1 Endopeptidases

La plupart des enzymes utilisées en industrie sont des endopeptidases. Elles sont caractérisées par leur action hydrolytique à un site spécifique de la chaîne polypeptidique liant

des extrémités N-terminale et C- terminale. La présence d'un groupement amino ou carboxyle libre peut avoir un effet répresseur sur l'activité de ces protéases. Les endopeptidases sont divisées en 4 classes selon leur mécanisme catalytique : les protéases cystéines, les métallo-protéases, les protéases aspartiques et les protéases sérines (**Rao et al., 1998 ; Fogarthy et Kelly, 1990**).

2.3.3.1.1 Protéases cystéines

Les protéases cystéines, ou thiols, sont très peu utilisées en industrie. Ces protéases sont présentes autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. La plupart des protéases de cette classe sont activées seulement en présence d'agents réducteurs comme la cystéine ou l'acide cyanhydrique. Leur activité n'est pas affectée en présence de diisopropylfluorophosphonate (DFP) et d'agents chélatant, mais elle est inhibée par la présence d'agents sulfhydryles comme le p-chloromercuribenzaote (PCMB) (**Rao et al., 1998**).

2.3.3.1.2 Métallo-protéases

Les métallo-protéases forment un groupe de protéases très variées. Ces enzymes contiennent un ion métallique divalent, le plus souvent le Zn^{2+} , nécessaire à leur activité. Les métallo-protéases sont habituellement des protéases dites neutres, ayant un pH optimum se situant près de 7,0. Toutefois, certaines métallo-protéases sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de 10 (**Rao et al., 1998**). La stabilité de ces protéases augmente considérablement si des ions Ca^{2+} sont ajoutés au milieu et diminue lorsque des agents séquestrants sont ajoutés. Ainsi, ces protéases sont inactivées en présence d'agents chélateurs forts (ex : EDTA), qui enlèvent le Zn^{2+} , alors que l'élimination des ions Ca^{2+} affecte seulement leur thermostabilité. Les métallo-protéases sont formées par plusieurs espèces du genre *Bacillus*, comme *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium* et *B. stearothermophilus* (**Keay et al., 1972**). La (**Figure .03**) ci-dessous représente les types d'endopeptidases classées selon la nature du résidu impliqué dans le site actif.

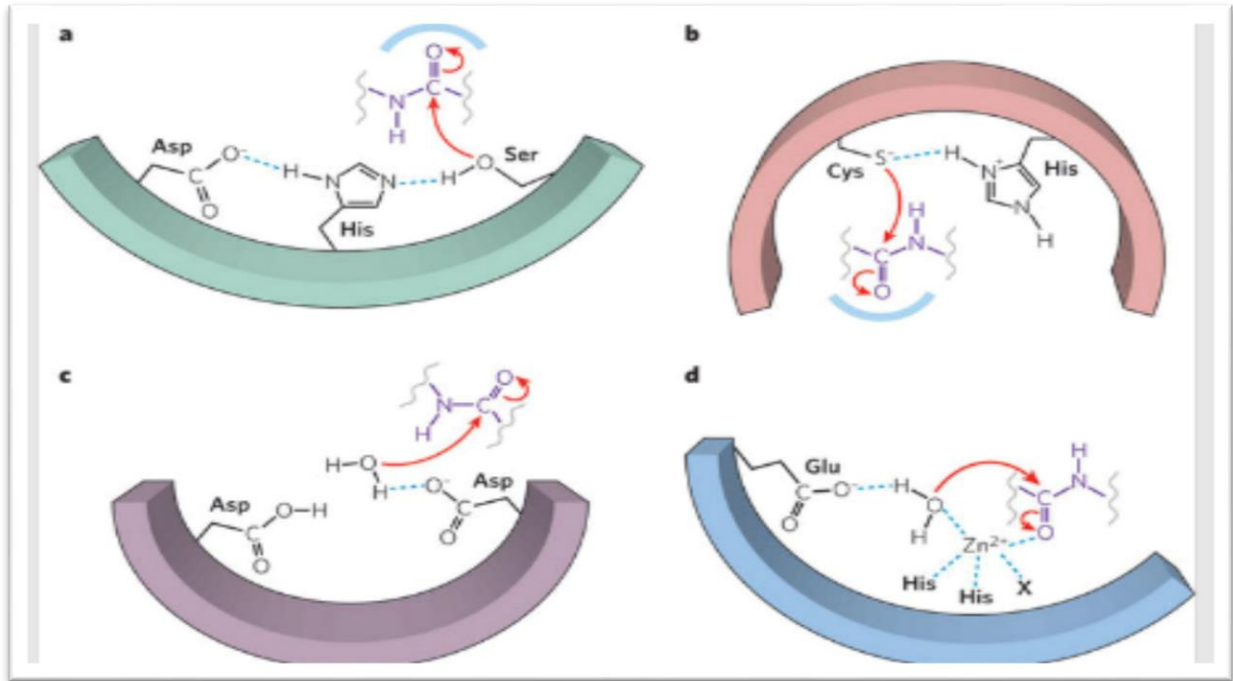


Figure.03 : Présentation des quatre types d'endopeptidase (Jaspard, 2013).

2.3.3.1.3 Protéases aspartiques ou Aspartylprotéases

Les protéases aspartiques, également connues sous le nom de protéases acides, sont des protéases dont l'activité catalytique, dépend d'un résidu acides aspartique présent au site actif de l'enzyme. La plupart des protéases aspartiques ont une activité maximale à de faibles pH, généralement entre 3 et 4. Leur masse moléculaire se situe généralement entre 30 et 45 kDa (Rao *et al.*, 1998). Ces enzymes sont répandues chez les eucaryotes, les champignons et des vertébrés, certains sont élaborées par des rétrovirus (Sarcome et Rous). Les protéases aspartiques sont inhibées par la pepstatine ou par époxyde (Pelmont, 1995).

2.3.3.1.4 Protéases sérines ou Sérylprotéases

Les protéases sérines sont une sous-classe d'endopeptidase d'une grande importance au niveau industriel. La très grande majorité des protéases alcalines, très employées en industrie, sont des protéases de type sérine. Ces protéases sont caractérisées par la présence d'un résidu sérine au niveau de leur site actif, ainsi que de résidus aspartate et histidine, formant le complexe avec le résidu sérine. Elles sont présentes chez les virus, les bactéries et les eucaryotes. Ces protéases ont généralement un pH optimal de 10, mais il peut varier entre 7 et 11. Ces enzymes sont inhibées par le DFP et le PMSF. Certaines protéases sérines sont aussi inhibées par des agents thiols, comme le PCMB, à cause de la présence d'un résidu cystéine près du site actif. Leur masse moléculaire se situe généralement entre 18 et 35 kDa.

Certaines protéases dépendent du Ca^{2+} pour leur stabilité. Elles sont divisées en trois groupes selon leur site d'attaque sur protéine :

- Les protéases sérines de type trypsine, qui hydrolysent les protéines après un résidu chargé positivement.
- Les protéases sérines de type chymotrypsine, qui hydrolysent les protéines après un résidu hydrophobe de haut poids moléculaire.
- Les protéases sérines de type élastase, qui hydrolysent les protéines après un résidu hydrophobe de faible poids moléculaire. (**Rao et al., 1998 ; Meunier, 1999 ; Polgar, 1989**).

2.3.4 Selon le pH d'activité

Selon ce paramètre, les enzymes protéolytiques de différentes origines sont classées en trois groupes : des protéases acides ; neutres et alcalines (**Hartely, 1960 ; Martinelli et Kinghorn, 1994**). Dans ce contexte, les moisissures représentent un groupe de microorganismes physiologiquement différents des autres groupes, elles possèdent une gamme d'enzymes actives à des pH différents, c'est le cas des protéases produites par *Aspergillus oryzae*, *P. camemberti* et *P. roqueforti*. Certaines protéases fongiques ont des optima de pH très acides de 2,5 à 5,0 (**Bontton et al., 1999 ; Auberger et al., 1985 ; Mechakra et al., 1999**).

2.4 La structure de protéases

Les protéases sont variées et ont des rôles biologiques bien différents. Leurs structures sont donc elles aussi très variées. Elles possèdent, comme les enzymes en général, un site actif qui assure l'hydrolyse des liaisons peptidiques et un site de reconnaissance du substrat pour agir sur la protéine cible (**Gordan et al., 2005**). La (**Figure .04**) ci-dessous montre la structure tridimensionnelle des protéases.

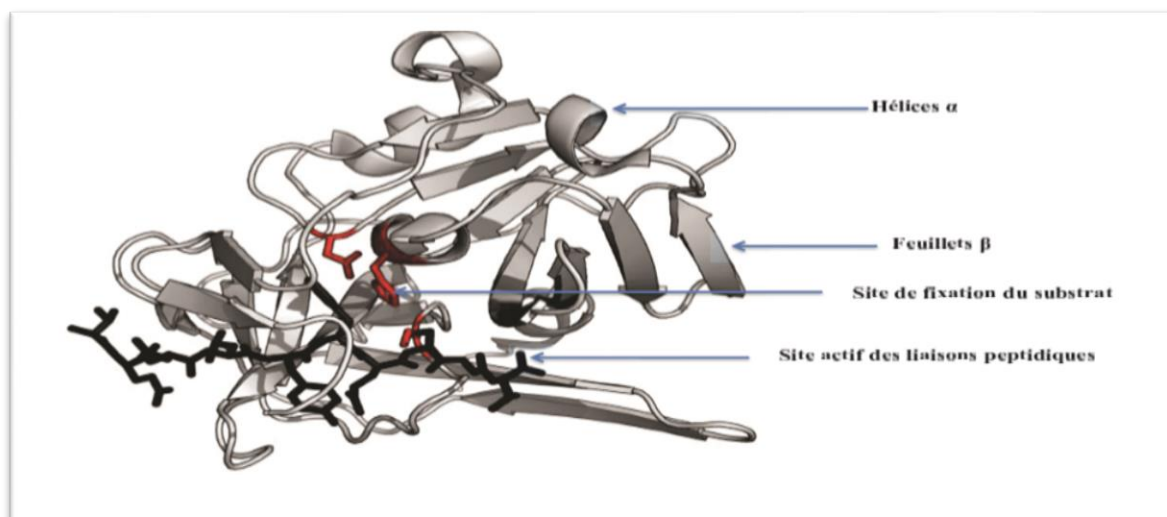


Figure .04 : Présentation de la structure tridimensionnelle de protéases (**Gordan et al., 2005**).

2.5 Masse moléculaire

Les masses moléculaires des protéases alcalines vont de 15 à 30 kDa (**Kumar et Takagi, 1999**) avec quelques rapports de masses moléculaires plus élevés de 31,6 kDa (**Freeman et al., 1993**), 33 kDa (**Larcher et al., 1996**), 36 kDa (**Tsujibo et al., 1990.**, **Nilegaonkar et al., 2007**; **Reddy et al., 2008**) et 45kDa (**Kwon et al., 1994**; **Nilegaonkar et al., 2007**). Toutefois, une enzyme de *Kurthia spiroforme* avait un poids moléculaire extrêmement faible de 8kDa (**Steele et al., 1992**). Dans certains *Bacillus sp.* de multiples formes électrophorétiques des protéases alcalines ont été observées (**Kumar, 1997**; **Kobayashi et al., 1996**).

2.6 Mode d'action

Le mode d'action des protéases diffère d'une enzyme à l'autre par leur site actif, bien qu'elles aient toutes le même principe de base. Ce processus catalytique est résumé dans trois étapes :

- Dans les deux premières étapes, l'enzyme déforme la liaison peptidique et renforce la polarité du carbonyle, qui facilite son attaque nucléophile, conduisant à la formation d'une liaison covalente transitoire entre le morceau portant le carbonyle du substrat et l'enzyme avec la libération de l'autre morceau (le premier produit) protoné par un proton cédé d'un résidu enzymatique.
- Dans la troisième étape, une nouvelle substitution nucléophile est exercée par le OH d'une molécule d'eau et libère le deuxième produit de la réaction, ou le site actif de l'enzyme se trouve régénérer par un proton (de l' H_2O) (**Pelmont, 1995**) (**Figure .05**).

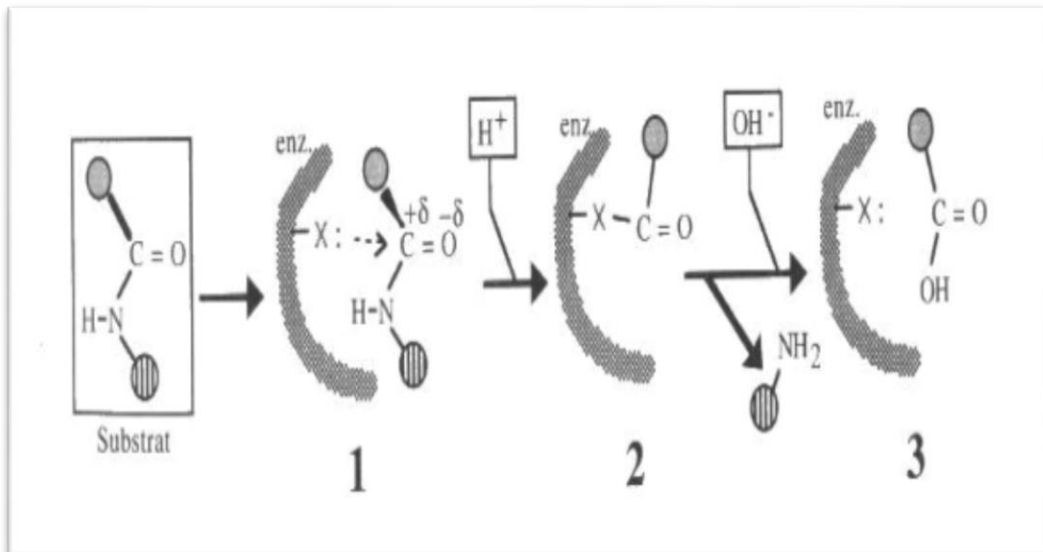


Figure .05 : Mécanisme d'action des protéases (Pelmont, 1995)

2.7 Substrat des protéases

2.7.1 Définition d'une protéine

Les protéines sont des macromolécules naturelles azotées, dont le poids varie entre plusieurs milliers et plusieurs millions de Daltons ; formées de nombreux acides aminés unis entre eux par des liaisons peptidiques (Ansari et Halins, 2005).

Ils sont des éléments essentiels de la vie de la cellule. Leurs fonction couvrent pratiquement l'ensemble des opérations réalisées au sein d'un organisme, elles jouent un rôle : catalytique (l'amylase salivaire), de transport (l'hémoglobine), et de protection de l'organisme (les anticorps) (Lodish *et al.*, 2005). La (Figure. 06) ci-dessous représente la structure d'un acide aminé constituant la protéine.

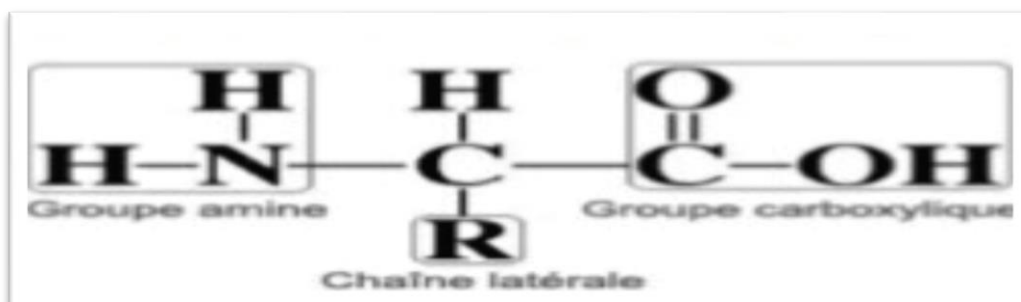


Figure .06 : Structure générale d'un acide aminé (Ansari et Halins, 2005).

2.7.2 Structure d'une protéine

Linderstrom-Lang et Shellman (1959), ont proposé une classification, définit par quatre niveaux structuraux : la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire.

2.7.2.1 Structure primaire

Cette structure est définit par l'enchaînement polymérisé de monomères d'acides aminés. Le lieu peptidique est formé par la condensation du groupement carbonyle en α d'un acide aminé et du groupement aminé, la formule développée est représentée ci-dessous (**Figure .07**) (**Boumaza, 2015**).

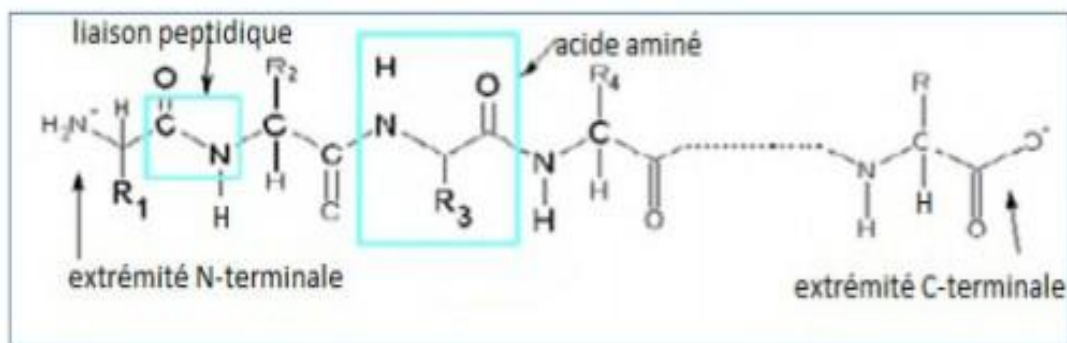


Figure .07 : Formule développée d'une protéine (**Boumaza, 2015**).

2.7.2.2 Structure secondaire

Elle correspond à des repliements locaux au sein des protéines dus à la formation de liaison hydrogène entre des résidus proches dans la séquence. Il existe deux types de structures secondaires régulières : les hélices α et les brins β (**Figure. 08**) (**Boumaza, 2015**).

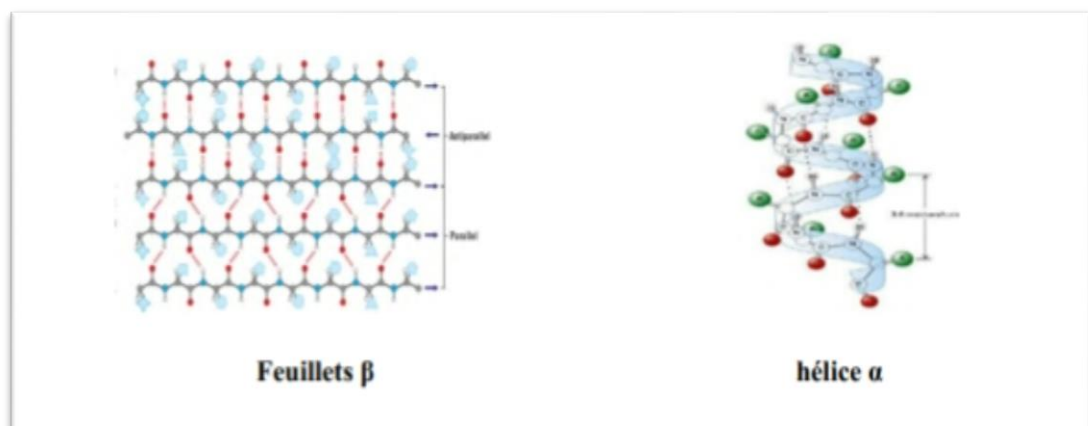


Figure .08 : Structure secondaire d'un protéine (**Boumaza, 2015**).

2.7.2.3 Structures tertiaires

La structure tertiaire se définit comme étant la structure tridimensionnelle d'une protéine. Elle décrit l'interaction spatiale des structures tertiaires : les liaisons disulfures, les liaisons hydrogènes, les ponts salins se forment entre deux acides aminés ionisés et les interactions hydrophobes, sont formées entre groupements non polaires (**Figure .09**) (**Boumaza, 2015**).

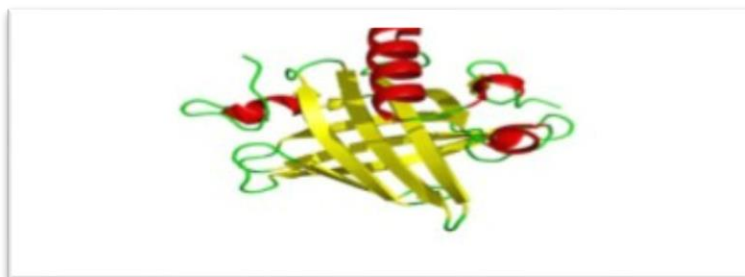


Figure .09 : Structure tertiaire d'une protéine (**Boumaza, 2015**).

2.7.2.4 Structure quaternaire

Cette structure est le niveau le plus élevé d'organisation des protéines. Elle concerne les protéines constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques. L'assemblage de ces sous-unités entre elles par des liaisons faibles constitue alors, la structure quaternaire de la protéine (**Ansari et Helms, 2005**) (**Figure .10**).



Figure.10: Structure quaternaire d'une protéine (**Boumaza, 2015**).

2.7.3 Principales propriétés d'une protéine

2.7.3.1 La solubilité

Trois catégories de protéines en fonction de leur solubilité sont obtenues :

- Les protéines solubles dans l'eau pure telles que les albumines.

- Les protéines solubles dans les sels neutres ou un milieu légèrement acide ou faiblement alcalin telles que les globulines.
- Les protéines insolubles telles que les scléroprotéines (**Bahar et al., 1999**).

2.7.3.2 La masse moléculaire

Cette propriété diffère d'une protéine à l'autre (**Bahar et al., 1997**).

2.7.3.3 Propriétés optique

Les solutions protéiques ne sont pas limpides, elles absorbent et diffusent de la lumière, l'axe d'orientation du faisceau lumineux dépend de l'activité optique de la protéine (**Cody et al., 1993**). Ces propriétés sont importantes pour l'étude et le dosage des protéines (**Heim et al., 1994**).

2.7.3.4 La viscosité

Les solutions protéiques sont visqueuses, leur viscosité dépend de la forme, la taille et la concentration des molécules (**Adil, 2012**).

2.7.3.5 Propriétés chimiques

Les propriétés chimiques des protéines sont celles des chaînes latérales des acides aminés, elles ont comme propriété principale l'amphotérie : toutes les protéines possèdent un nombre important de groupements ionisables, (groupement amide, acide carboxylique, thiol et phénol). Selon le pH de la solution par rapport à leur pK, ces groupements sont plus ou moins ionisés et la protéine se comportera soit comme un acide ou une base, soit comme un anion (excès de charges négatives) ou comme un cation (**Adil, 2012**). Ces propriétés sont importantes pour la séparation et la caractérisation des protéines (électrophorèse ou chromatographie) (**Carugo et Pongor, 2002**).

2.8 Propriétés analytiques de la protéase

L'activité protéolytique, comme toute réaction enzymatique, dépend fortement du pH et de la température. Pour la plupart des enzymes, on distingue facilement une étroite zone dite de pH optimum et de température optimale où la vitesse de la réaction est la plus grande. La vitesse des réactions enzymatiques dépend aussi de la présence de certains activateurs ou des inhibiteurs (**Penasse, 1974**). Le (**Tableau .04**) ci-dessous présente les propriétés analytiques de quelques enzymes protéolytiques.

Tableau.04: Propriétés analytiques de quelques enzymes protéolytiques (Deymié *et al.*, 1981)

Classe	Exemple	Origine	pH optimal	T° optimale	Inhibiteur
Serylprotéases	Chymotrypsine	Pancréas	8,0-8,5	35	Nombreux aa
	Trypsine	≠	7,5-8,0	45	PPN ou OP
	Subtilisine	<i>B .subtilis</i>	7,4	60	α TSF
	p.extracellulaire	<i>B .licheniformis</i>	10	56	inhibiteurs
	endopeptidase	<i>B .amyloliquefaciens</i>	10	60	naturels
		<i>Fusarium culmorum</i>	8,3-9,6	50	PMSF
	<i>Trichoderma viride</i>	7,0-8,0	40	Nombreux aa	
Cystéylprotéases	Papaine	<i>Carica papaya</i>	8,0-8,5	35	Hg
	Ficine	<i>Ficus globrata</i>	4,0-6,0	35	EDTA
	Protéase neutre	<i>Geotrichum</i>	7,0	42	Oxydants
	Aminipeptidase	<i>Candidum</i>	7,0	37	Agent chélateurs
	Streptopain	<i>Lactobacillus</i>	7,2	37	≠et EDTA
	Cathepsine K	<i>helveticus</i> <i>Streptococcus sp</i> Cellules animales	6,5		
Aspartylprotéases	Pepsine A	Estomac	1,5-2,5	40	Alcools
	Chymosine	Estomac de veau	4,0-4,5	40-42	Pepstatine des
	Cathepsine D	Cellules animales	2,5-3,5	37	époxydes (EPNP
	P .extracellulaire	<i>Trichoderma</i>	4,5	40	et le DAN)
	≠	<i>harzianum</i> <i>Aspergillus niger</i>	4,5	50	
Métalloprotéases	Carboxypeptidase A	L'intestin grêle des	7,5	37	certaines aa
	Carboxypeptidase B	vertébrés	8,0	37	certaines aa
	P.bactérienne	≠	7,4	50	agent chélateurs
	Collagénase	<i>Micrococcus</i> <i>caseolyticus</i> cellules animales	7,4	38	

3 Les facteurs influençant la production de protéases

3.1 Les facteurs abiotiques influençant la production de protéases

3.1.1 Effet de la température

Les enzymes thermostables sont d'un intérêt particulier pour les applications industrielles en raison de leur stabilité, sous des températures élevées et la large gamme de pH. Les protéases thermophiles catalysent la réaction et maintiennent la stabilité à haute température. En outre, des températures plus élevées peuvent accélérer les vitesses de la réaction, augmenter la solubilité des gaz non-réactifs produits et réduire l'incidence de la contamination microbienne par des germes mésophiles (**Vikram *et al.*, 2016**).

3.1.2 Effet de pH

Le pH est un facteur important qui influence la croissance des microorganismes. Le pH a également une forte influence sur la production de protéases. (**Hameed *et al.*, 1999**) ont démontré que, le pH affecte les mécanismes de régulation métabolique de la production de protéases chez *B. licheniformis* et *B. subtilis* (**Gupta *et al.*, 2002 ; Kumar *et al.*, 1999**). De plus, des variations importantes de pH au cours de la fermentation peuvent mener à la désactivation des protéases excrétées dans le milieu (**Kumar *et al.*, 1999**). Il est donc nécessaire de maintenir en tout temps le pH à un niveau optimal, lors de la fermentation afin d'obtenir de bons rendements de production de protéases (**Mathieu, 2005**).

3.1.3 Aération et agitation

L'agitation assure un environnement nutritionnel et physique homogène pour toutes les cellules. Un tel environnement est indispensable pour une production maximale de protéases (**Calik *et al.*, 2000**). Des taux d'aération et agitation contrôlés et optimaux sont nécessaires, afin d'assurer un transfert d'oxygène adéquat lors des fermentations. En effet, le transfert d'oxygène dans le milieu de culture est un des facteurs influençant de façon majeure la production de protéases (**Calik *et al.*, 1998 et 2000; Yezza *et al.*, 2004; Hameed *et al.*, 1999**). Également, l'agitation et l'aération peuvent avoir un effet néfaste si elles sont maintenues à des niveaux trop élevées. En effet, il a été noté lors de plusieurs études que, le maintien d'une agitation et d'une aération trop élevée augmente les forces de cisaillement dans le milieu de culture, ce qui peut mener à la dénaturation des protéases excrétées à l'extérieur de la cellule bactérienne (**Calik *et al.*, 2000; Hameed *et al.*, 1999**).

4 Les facteurs biotiques influençant la production de protéases

4.1 Influence de source de carbone

Les milieux servant à la production de protéases en industrie sont généralement complexes et contiennent des concentrations élevées en sources de carbone et d'azote (**Kumar et al., 1999**). Le choix de la source de carbone a une grande importance, car il influence les performances du procédé. Une grande variété de substrats peut être utilisée, dont de nombreux glucides. L'emploi du glucose a été largement étudié. Il a été établi que le glucose inhibe la production de protéases par un mécanisme de répression catabolique (**Ferrero et al., 1996; Frankena et al., 1985; Gupta et al., 2002a; Kumar et al., 1999; Puri et al., 2002; Sinha et al., 1991**). D'autres sucres simples peuvent aussi être utilisés et leurs effets sur la production de protéases sont variables. Par exemple, dans un milieu à base de soja, permet une meilleure production de protéases que le même milieu,

comprenant une quantité équivalente de glucose. Par contre, une diminution dans la production de protéases est observée lorsque tous ces sucres sont présents en plus grandes concentrations (**Mabrouk et al., 1999**).

4.2 Influence de la source d'azote

B. licheniformis peut métaboliser l'azote sous forme organique et inorganique pour produire les acides, les protéines, dont les protéases, et les composantes de parois cellulaires nécessaires à sa survie. La production de protéases est donc dépendante de la biodisponibilité des sources d'azote appropriées (**Kumar et al., 1999**). Généralement, de faibles productions de protéases sont obtenues avec l'emploi d'azote inorganique comme seule source. La synthèse d'enzymes est inhibée par la présence de sources d'azote inorganiques rapidement métabolisables comme les acides aminés et l'ion ammonium (**Giesecke et al., 1991; Kumar et al., 1999**). Le même phénomène est observé chez *B. subtilis* auquel *B. licheniformis* s'apparente étroitement (**Kembhavi et al., 1993**). Par contre, quelques rapports indiquent l'absence de répression associée à l'usage de sels d'ammonium (**Kumar et al., 1999; Sinha et al., 1991**). Avec l'utilisation de sources d'azotes organiques, la production de protéases est généralement plus élevée. Par exemple, le soja est une excellente source d'azote qui permet d'obtenir une production plus élevée de protéases (**Kumar et al., 1999; Mabrouk et al., 1999; Sinha et al., 1991**).

4.3 Influence du solvant organique

Ces dernières années, une classe de solvants microbes tolérants ont attiré l'attention. Ces organismes sont attrayants pour les applications dans la biorestauration solvant et la biotransformation dans les milieux non aqueux, et constituent une source riche de solvants enzymes stables (**Thumar et Singh, 2009**).

4.4 Influence d'ions métalliques

Les ions métalliques protègent l'enzyme contre la dénaturation et jouent un rôle vital dans le maintien de la conformation actif de l'enzyme à des températures plus élevées et des concentrations en sel. Le Ca^{2+} est connu pour activer la protéase et augmenter la thermo stabilité. D'autre part les forts effets inhibiteurs des ions Hg^{2+} et du Cu^{2+} sur les protéases alcalines de certains *Bacillus sp* sont également étudiés (**Gupta., 2003**).

4.5 Influence des éléments de trace

Certains ions comme le calcium, le cobalt, le cuivre, le bore, le magnésium, le manganèse et le molybdène peuvent avoir un effet bénéfique sur la croissance de *B. licheniformis* et la production de protéases. Certains éléments comme le calcium contribuent à la stabilité des protéases (**Kumar et al., 1999**). Le phosphate de potassium est utilisé comme source de phosphore dans la majorité des études et peut avoir un effet tampon sur le milieu de culture. De faibles concentrations (2 g/L) seraient optimales pour la production de protéases. En revanche, de plus grandes concentrations ont un effet inhibiteur sur la croissance et la production de protéases (**Kembhavi et al., 1993; Kumar et al., 1999**).

5 Origine des protéases

Les protéases sont extraites aussi bien des plantes que des animaux ou des microorganismes (**Rao et al., 1998**).

5.1 Protéases d'origine végétale

Les enzymes d'origine végétale et spécialement les protéases sont par ordre décroissante en technologie. La papaïne, la bromélaïne, la kératinases et la ficine représentent quelques-unes des protéases bien connues d'origine végétale (**Rao et al., 1998**).

➤ **Les kératinases** : sont produites par certains groupes botaniques de plantes pour dégrader les cheveux et la laine. Cette digestion est importante pour la production d'acides

aminés essentiels tels que, la lysine et pour la prévention du colmatage des systèmes de traitement des eaux usées (**Rao et al., 1998**).

➤ **La papaïne** : en provenance du latex de fruit, *Carica papaya* qui se développe dans les régions subtropicales de l'ouest et du centre d'Afrique, ainsi qu'en Inde. Elle est largement utilisée dans l'industrie pour la préparation des hydrolysats de protéines très solubles et aromatisés (**Scriban, 1993; Pelmont, 1995; Rao et al., 1998**).

➤ **La bromélaïne** : est extraite à partir de l'ananas (*Ananas comosus*). Elle est moins thermostable que la papaïne (**Rao et al., 1998**).

➤ **La facine** : est issue de la figue (*Ficus glabrata*) (**Scriban, 1993**).

5.2 Protéases d'origine animale

Les protéases sécrétées par l'estomac des ruminants présentent un intérêt industriel tel que la présure, une enzyme ancienne largement répandue, préparée à partir de la caillette (le quatrième estomac) des veaux, ainsi que les pepsines bovines et porcines. L'activité non spécifique des enzymes pancréatiques telle que, les trypsines et chymotrypsines, les rendent moins importantes que les enzymes gastriques (**McKenzie, 1971 ; Alais, 1975 ; Scriban, 1999**). Des études antérieures réalisées par (**Trap et Boireau, 2000**) sur la caractérisation de certaines protéases chez les helminthes : *Schistosoma sp*, *Fasciola sp*, *Taenia sp*, *Haemonchus sp* ; ont rapporté leur utilisation comme cibles potentielles majeures en thérapie et en vaccination antiparasitaire.

➤ **La trypsine** : est une protéase à sérine, elle est la principale enzyme digestive intestinale responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires. L'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du goût très amer qu'elle entraîne (**Rao et al., 1998**).

➤ **La rénine** : *Pepsin-like* protéase (chymosine ; EC 3.4.23.4) (**Rao et al., 1998**). Est une protéase à aspartate. C'est un constituant majeur de la présure utilisé en industrie laitière comme agent principal de caillage du lait (**Pelmont, 1995**). Elle a la propriété de couper la liaison Phe-Met dans la κ -caséine pour générer une *para*- κ -caséine et un glycopeptide C-terminal (**Rao et al., 1998**).

➤ **La pepsine** : est une protéase acide présente dans l'estomac de presque tous les vertébrés (**Rao et al., 1998**), seules les pepsines bovines et porcines présentent un intérêt industriel (**Scriban, 1993**).

➤ **La chymotrypsine** : La chymotrypsine pure est très coûteuse et elle est utilisée uniquement pour les applications de diagnostic et d'analyse (**Rao et al., 1998**).

5.3 Protéases d'origines microbiennes

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources, car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (Sandhya *et al.*, 2005b). Elles sont produites par une grande variété de bactéries, dont les Actinomycètes, de moisissures et de levures (Devi *et al.*, 2008). Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial (Sandhya *et al.*, 2005). Le grand succès des protéases microbiennes dans les systèmes biotechnologiques est attribué à la diversité biochimique très large, à la faisabilité de la culture de masse, et la facilité des manipulations génétiques (Ferrero, 2000; Wu *et al.*, 2006). Quelques exemples de microorganismes producteurs de protéases sont présentés dans le (Tableau .05).

Tableau .05 : Quelques souches microbiennes (Rao *et al.*, 1998).

Sources	Espèces	Références
• Moisissures	<i>Aspergillus oryzae</i>	Garcia-gomez <i>et al.</i> ,2009
	<i>Mucor circinelloides</i>	Sathya <i>et al.</i> ,2009
	<i>Conidiobolu scoronatus</i>	Laxman <i>et al.</i> ,2005
	<i>Penicillium sp.</i>	Wu <i>et al.</i> ,2006
	<i>Aspergillus terreus</i>	Agrawal <i>et al.</i> ,2005
	<i>Bauverria felina</i>	Hajji <i>et al.</i> ,2007
	<i>Aspergillus clavatus ES1</i>	
• Levures	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Chi <i>et al.</i> ,2007
	<i>Candida lipolytica</i>	Tobe <i>et al.</i> ,1976
• Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i>	Ferrero <i>et al.</i> ,1996
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	George <i>et al.</i> ,1995
	<i>Bacillus subtilis</i>	Soares <i>et al.</i> ,2005
	<i>Bacillus pumilus</i>	Fellehi <i>et al.</i> ,2016
	<i>Bacillus sp.</i>	Patel <i>et al.</i> ,2005
	<i>Virgibacillus sp.SK33</i>	Sinsuwan <i>et al.</i> ,2008
	<i>Synergistes sp.</i>	Kumer <i>et al.</i> ,2008a
• Actinomycètes	<i>Streptomyces sp.</i>	Mehta <i>et al.</i> ,2006
	<i>Nocardiopsis alkaliphila sp.</i>	Hozzein <i>et al.</i> ,2004

5.3.1 Protéases bactériennes

Les protéases bactériennes telles que la subtilisine ou subtilase, essentiellement produite chez *B. subtilis* et d'autres genres qui sont caractérisées par leur stabilité et leur résistance à l'action des détergents (**Frazier, 1967 ; Calk et al., 2000**). Les bactéries psychrotrophes du lait et en particulier, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* produisent des métalloprotéases thermorésistantes, utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage des fromages. Ces bactéries sont détruites par la pasteurisation mais les protéases extracellulaires qu'elles produisent ne sont que partiellement inactivées (**Cousin et al., 1982**). Par ailleurs, les protéases extracellulaires de *Streptococcus lactis* sont utilisées dans l'affinage des fromages (**Desmarzeaud, 1978**).

5.3.2 Protéases des mycètes

Les mycètes élaborent une plus grande variété d'enzyme comparées à celles des bactéries. Par exemple, *Aspergillus oryzae* produit les protéases acides, neutres et alcalines. Les protéases fongiques sont produites chez certaines souches, appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucos*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucos* et *Endothia*. Elles sont largement utilisées en industrie telle que la boulangerie, l'industrie alimentaire humaine et animale, la production des détergents, dans les tanneries et en industrie pharmaceutique (**Frazier, 1967 ; UI-haq et al., 2003**).

5.3.3 Protéases des levures

Certaines levures appartenant aux genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida* et *Debaryomyces* sont largement utilisées dans la production des protéases. Par exemple, *Saccharomyces cerevisiae* produit trois types de protéases, l'aspartylprotéase, la sérine protéase et la métalloprotéase. L'activité protéolytique de ces genres est particulièrement utilisée dans l'affinage des fromages (**Kreze, 1991 ; Boiron, 1996**).

5.3.4 Protéases virales

Les protéases virales ont gagné de l'importance due à leur participation fonctionnelle dans le traitement des protéines des virus, qui causent certaines maladies mortelles telles que les SIDA et le cancer. Des peptidases de sérine, aspartiques, et de cystéine sont trouvées dans divers virus. Toutes les peptidases virus-encodées sont des endopeptidases, il n'y a aucune métallopeptidase. Les protéases d'aspartyl de Rétrovirus qui sont exigées pour l'assemblage et la réplique virales, sont des homodimères et sont exprimées comme partie du

précurseur de polyprotéine. La protéase mûre est libérée par l'autolyse du précurseur. Une littérature étendue est disponible sur l'expression, la purification, et l'analyse enzymatique de la protéase aspartique rétroviral et de ses mutants. La recherche étendue s'est concentrée sur la structure tridimensionnelle des protéases virales et de leur interaction avec les inhibiteurs synthétiques, en vue de concevoir les inhibiteurs efficaces qui peuvent combattre implacablement la propagation et épidémie de dévaster du SIDA (Mala *et al.*, 1998).

6 Applications industrielles des protéases

Les protéases occupent une part du marché des enzymes industrielles. Ces protéases produites à partir de différentes sources microbiennes sont commercialisées sous plusieurs noms, par quelques compagnies hautement spécialisées (Tableau.06) (Meunier ; 1999).

Tableau .06 : Exemples de protéases commerciales (Aunstrup *et al.*, 1980).

Microorganismes	Noms commerciaux	Fabricants
<i>Aspergillus niger</i>	Protase® Pamprosin ®	Novo Nordsik (Danemark) YakultBiochemicals (Japon)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Veron P® Panasyme® Prozyme ®, Biozyme A® Sanzyme ® Sumyzyme AP® Protéases fongiques Newlase®	RohmGmbh (Danemark) Associated British Maltstes (Angleterre) Amano (Japon) Snkyo (Japon) Shin Nihon (Japon) Miles (Etats-Unis) Aman (Japon)
<i>Rhizopus sp.</i>		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (<i>Bacillus subtilis</i>).	Neutrase ® Rapidermase ® Proteinase18® Protin® Biopraser®, Nagase ® Rhosyme ®	Novo Nordsik (Danemark) Société Rapidase (France) Associates British Maltstens (Angleterre) Daiwa Kasei (Japon) Nagase (Japon) Rhom and Haas (Etats-Unis)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Alcalase ® Optimase ®	Novo Nordsik (Danemark) Miles Kali-Chemie GmbH

<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	Maxatase P® Termose ®,Thermolysin®	(Allemagne) Gist Brocades N.V (Hollande) Diwa Kasei (Japon)
<i>Bacillus alcalophilus</i> <i>Endothia parasitica</i>	Esperase ®,Savinase® Protéases hautement alcalines Surecurd® ,Suparen®	Novo Nordsdik (Danemark) GistBrocades N.V (Hollande) Pfizer (Etats-Unis)
<i>Mucor miehei</i>	Rennilase ® Fromase ® Morcurd ®	Novo Nordsdik (Danemark) Gist Brocades N.V (Hollande) Pfizer (Etats-Unis)
<i>Mucor pusillus</i>	Marzyme ® Emporase ®,Meitorennet®, Nourylab®	Miles (Etats-Unis) Meito Sangro (Japon)

6.1 Industrie alimentaire

6.1.1 Préparation du fromage

L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages (**Rao et al., 1998**). Les protéases employées sont surtout des protéases acides. La majorité des protéases employées sont produites par *Mucor. sp*, *Bacillus subtilis* et *Endothia parasitica*. Elles sont utiles pour la coagulation des protéines du lait. La présure de veau a longtemps été l'enzyme utilisée à cette fin. Cependant, elle est de moins en moins utilisée, car elle provient du système digestif de très jeunes veaux. Comme il n'est pas économiquement viable de sacrifier les veaux aussi jeunes, elle tend à être remplacée par des protéases microbiennes (**Rao et al., 1998**).

6.1.2 Boulangerie

La farine de blé est grandement utilisée en boulangerie. Cette farine contient du gluten, une protéine insoluble, qui est responsable des propriétés de la pâte. Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten, à un degré plus ou moins important, selon les caractéristiques désirées de la pâte. Le traitement de la pâte facilite sa manipulation et permet la production d'une grande variété de produits. Également, des protéases d'origine bactérienne sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (**Rao et al., 1998**).

6.1.3 Produits à base de soja

Des protéases neutres et alcalines sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce soja, ainsi que d'autres produits à base de soja. Les modifications des protéines du soja par les protéases aident à augmenter leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, le traitement de ces protéines par la protéase alcaline à pH 8 ; permet la mise au point d'hydrolysats de protéines solubles avec des propriétés nutritives très intéressantes. Ces hydrolysats sont utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans les formulations d'aliments diététiques (**Rao et al., 1998**).

6.1.4 Synthèse de l'aspartame

L'aspartame est un dipeptide composé d'un résidu acide L-aspartique et d'un résidu L-phénylalanine. La configuration en *L* de la molécule est responsable du goût sucré. Le maintien de cette configuration est donc crucial, mais engendre des coûts très importants lorsque des méthodes de synthèse chimiques sont employées. La synthèse enzymatique de l'aspartame est donc préférable. Si les protéases sont considérées comme des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse, sous certaines conditions bien précises. Une préparation immobilisée de thermolysin provenant de *Bacillus thermoprotolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartame (**Rao et al., 1998**).

6.2 Domaine pharmaceutique et médical

La grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme un assistant à la digestion chez certains individus, souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. Également, des collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement de brûlures et de plaies. (**Kudry et Simonenko, 1994**) ont trouvé qu'une élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes. Enfin, une asparaginase provenant de *E. coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie (**Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002a**).

6.3 Tanneries

Dans la tannerie, le délainage enzymatique est utilisé depuis le début du siècle dernier et plusieurs souches microbiennes et diverses méthodes ont été suggérées (**Meunier, 1999**). Les protéases sont utilisées pour leur capacité à libérer les poils et la laine des peaux. Cette opération se fait à des pH élevés, et nécessite donc des protéases alcalines, comme celles produites par *B. licheniformis*. Après l'enlèvement des poils, les peaux subissent le reverdissage, étape essentielle afin de rendre la peau douce et élastique. Les préparations enzymatiques servant pour le reverdissage peuvent contenir des protéases d'*A. oryzae*, *B. amyloliquefascis* ou, *B. licheniformis*. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emplois souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients, dont des impacts majeurs sur la sécurité des travailleurs et sur l'environnement (**Meunier, 1999; Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002a; Kumar et al., 1999**).

6.4 Détergents

A l'heure actuelle, les protéases sont ajoutées comme des ingrédients clé dans la formulation des détergents pour usage domestiques (détergents à lessive et détergents à vaisselles), les produits de nettoyage pour usage industriels et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le marché le plus important au niveau de détergents est de loin celui des détergents à lessive (**Kumar et al., 2008b**). Une protéase détergente idéale doit avoir une large spécificité de substrat et stable dans les conditions défavorables de la machine à laver (température élevée et pH alcalin) (**Rao et al., 1998**). Bien que la pepsine soit utilisée depuis 1913 (**Hajji et al., 2007**), la plupart des protéases ajoutées dans les détergents sont produites par des souches de *Bacillus sp* (**Gupta et al., 2002**). Clear-lens Pro®, une marque de Novozyme Danemark est utilisée pour enlever les dépôts à base de protéines ainsi que les films protéiniques présentent dans les lentilles cornéennes (**Sumantha et al., 2006**).

6.5 Traitement des eaux usées industrielles

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. En effet, les protéases peuvent traiter les rejets riches en protéines. Des essais effectués dans différentes industries alimentaires produisant des rejets riches en protéines, ont donné des résultats très intéressants ; qui permettent de constater le potentiel des protéases pour le traitement de ces déchets (**Kumar et al., 1999**). (**Dalev, 1994**)

qui utilisé ; des protéases alcalines provenant de *B. subtilis* pour le traitement des rejets semi-solides des abattoirs de volailles. Des protéases sont aussi utilisées pour traiter les eaux usées riches en kératine provenant des chaînes d'abattage de volailles (**Ichida et al., 2001**). (**Gupra, 2002a**) ont démontré qu'une préparation à base d'enzymes de *B. subtilis*, *B. amylolique fasciens* et *Streptomyces .sp* est commercialement disponible pour le nettoyage des drains domestiques.

6.6 Industrie chimique

Les enzymes sont des biocatalyseurs qui interviennent dans des réactions de la synthèse chimique, à travers la dégradation des matières organique. Cependant, une conséquence majeure de cette approche est que l'activité enzymatique est réduite dans des conditions de déshydratation assez poussée. Des protéases aussi utilisés dans la synthèse des peptides dans des milieux de cultures organiques (**Chen et al., 1991 ; Nagashima et al., 1992 ; Gololobov et al., 1994**). Par ailleurs, **Wilson et ces Collaborateurs (1994)**, ont rapporté la synthèse des peptides en présence des enzymes immobilisées sur des supports insolubles.

7 Tendances en recherche et développement pour la production de protéases

7.1 Nouvelles souches productrices de protéases

Des efforts en recherche et développement sont présentement en cours , afin de créer de nouveaux produits à base d'enzymes. Ainsi, de nombreux efforts sont orientés vers la biologie moléculaire, afin de modifier les souches productrices de façon à les rendre plus performantes, pour la production de protéases et de façon à améliorer les caractéristiques catalytiques des protéases produites. Ces efforts ont pour but d'améliorer les performances des procédés et d'accroître davantage l'étendue des applications enzymatiques (**Barnabé, 2003**). Également, de nouvelles souches productrices de protéases aux propriétés intéressantes font l'objet de nombreux travaux de recherche. Le (**Tableau .07**) résume quelques exemples.

Tableau. 07 : Nouveaux microorganismes producteurs de protéases aux propriétés intéressantes faisant l'objet de travaux de recherche.

Souches bactériennes	Caractéristiques de la protéase	Référence
<i>Nocardiopsis sp.</i>	Protéase très stable en présence de surfactants et d'agents blanchissants	(Moreire et al.,2002)
<i>Bacillus sp.</i>	Protéase hautement thermostable avec pic d'activité à 90°C	(Kaur et al.,2001)
<i>Bacillus horikoshii</i>	Nouvelle protéase alcaline	(Joo et al.,2002)
<i>Bacillus sp.</i>	Protéase très stable en présence d'agents blanchissant	(Gupta et al.,1999)
<i>Bacillus brevis</i>	Nouvelle protéase alcaline thermostable	(Banerjee et al.,1999)
<i>Bacillus sphaericus</i>	Nouvelle protéase stable en présence de chlore	(Singh et al.,1999)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Nouvelle souche qui produit des kératinases	(Manczinger et al.,2003)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Nouvelle protéase alcaline thermostable	(Rahman et al.,1994)
<i>Bacillus mojavensis</i>	Protéase alcaline stable en présence d'agents blanchissants	(Beg et al.,2002)
<i>Bacillus subtilis K2</i>	Capacité du microorganisme de coire dans des effluents de tannerie et protéase efficace pour le traitement des peaux	(Hameed et al.,1999)
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Protozoaire produisant des protéases extracellulaires	(Coninck et al.,2000)
<i>Bacillus clausii</i>	Microorganisme capable de coire dans des conditions hautements alcalines	(Denizci et al.,2004)

7.2 Production de protéases dans les milieux de cultures alternatifs

Bien que les enzymes présentent de nombreux avantages au niveau industriel et environnemental, leurs marchés sont peu développés, car l'offre est faible et la domination des produits chimiques moins dispendieux découragent les investissements pour leur commercialisation (Barnabé, 2003). Afin de rendre les enzymes plus compétitives par rapport aux produits chimiques, il est essentiel d'en abaisser les coûts de leurs production. Pour la production des protéases, 30 à 40% des coûts de production sont reliés au substrat de production employé (Kumar et Parrack, 2003; Joo *et al.*, 2002). Généralement, les protéases sont produites dans des milieux synthétiques complexes (Gupta *et al.*, 2002). Donc, afin de réduire leurs coûts de production, des efforts de recherches sont orientés dans le but de trouver des substrats alternatifs, moins coûteux et efficaces pour la production des enzymes. À cet effet, l'utilisation de matières tertiaires en tant que substrats alternatifs, disponibles en grandes quantités et à coûts moindres, serait une solution qui amènerait des diminutions importantes dans les coûts de production (Mathieu, 2005). Le (Tableau .08) présente quelques substrats alternatifs faisant l'objet de recherches pour la production de protéase.

Tableau .08 : Substrats alternatifs pour la production de protéases faisant l'objet de travaux de recherche.

Substrat	Microorganisme employé	Référence
Liqueurs résiduelles de maïs	<i>Bacillus sp.</i>	(Barnabé, 2003 Mabrouk <i>et al.</i> , 1999)
Résidus d'amidon végétal	<i>B. lentus</i>	(Ganeshkumar et Parrach, 2003)
Sang de bovin	<i>Mucor sp.</i>	(Barnabé, 2003)
Hydrolysats de résidus de poisson	<i>B. subtilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Elouz <i>et al.</i> , 2001) (Elouz <i>et al.</i> , 2003)
Petit lait	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	(De Souza <i>et al.</i> , 2001)
Mélasses de canne à sucre	<i>B. subtilis</i>	(Calik <i>et al.</i> , 2004)

Matériels et méthodes

1 Matériels et produits utilisés

La liste des équipements ainsi que le matériel nécessaires pour la réalisation de ce travail est présentée dans l'**annexe E**.

2 Objectifs

L'objectif de cette étude est l'isolement d'une large gamme de bactéries protéolytiques isolées à partir des sols riches en protéines et de sources thermales.

Les principaux points tracés pour la réalisation de ce projet sont :

- L'isolement et le screening des bactéries productrices de l'enzyme protéase, à partir des milieux riches en protéines.
- La sélection des souches protéolytiques par la mesure des diamètres des zones d'hydrolyses, formées sur un milieu de culture solide.
- La caractérisation phénotypique des souches les plus performantes.
- L'optimisation des différents paramètres impliqués dans la production de la protéase, tels que le pH et la température.
- L'identification des bactéries sélectionnées productrices de la protéase, par l'utilisation de la galerie API20E.

3 Échantillonnage

Les échantillons qu'on allait étudiés dans ce projet préviennent des eaux de sources thermales et des sols riches en protéines, ils devraient être prélevés à partir de différents sites de la région du Nord-Ouest Algérien (Sidi-Bel-Abbès et Ain Temouchent). Le choix des échantillons à traiter devrait être réalisé, de façon à varier la nature et le lieu de prélèvement.

L'eau est de nature saline, bicarbonatée calcique et chlorurée sodique, avec dégagement d'hydrogène sulfuré. Elle est exploitée par les stations thermales environnantes (**Boughlali, 2003**).

Le sol est caractérisé par sa richesse en déchets protéiques, afin de pouvoir augmenter la possibilité d'isoler des bactéries productrice de la protéase.

- Échantillonnage à partir du sol : Les échantillons devraient être prélevés à l'aide d'une spatule stérile dans des conditions d'asepsie. La couche des trois premiers centimètres devrait être écartée de la couche superficielle de sol (**Buhot, 1973 ; Mihail et Ailcorel, 1987 ; Saadoune et Momani, 1997**). Une Pesée de (100 à 150) g du sol devrait être recueillie dans des flacons stériles avec étiquetage, et transportés directement au laboratoire.
- Échantillonnage à partir de sources thermales : Les échantillons devraient être prélevés dans des flacons en verre stériles de 500 ml à environ 20 cm de la surface d'eau, au niveau d'un point avoisinant la source de l'eau thermale, à une distance de quelques mètres, dont la température est égale à 45°C.

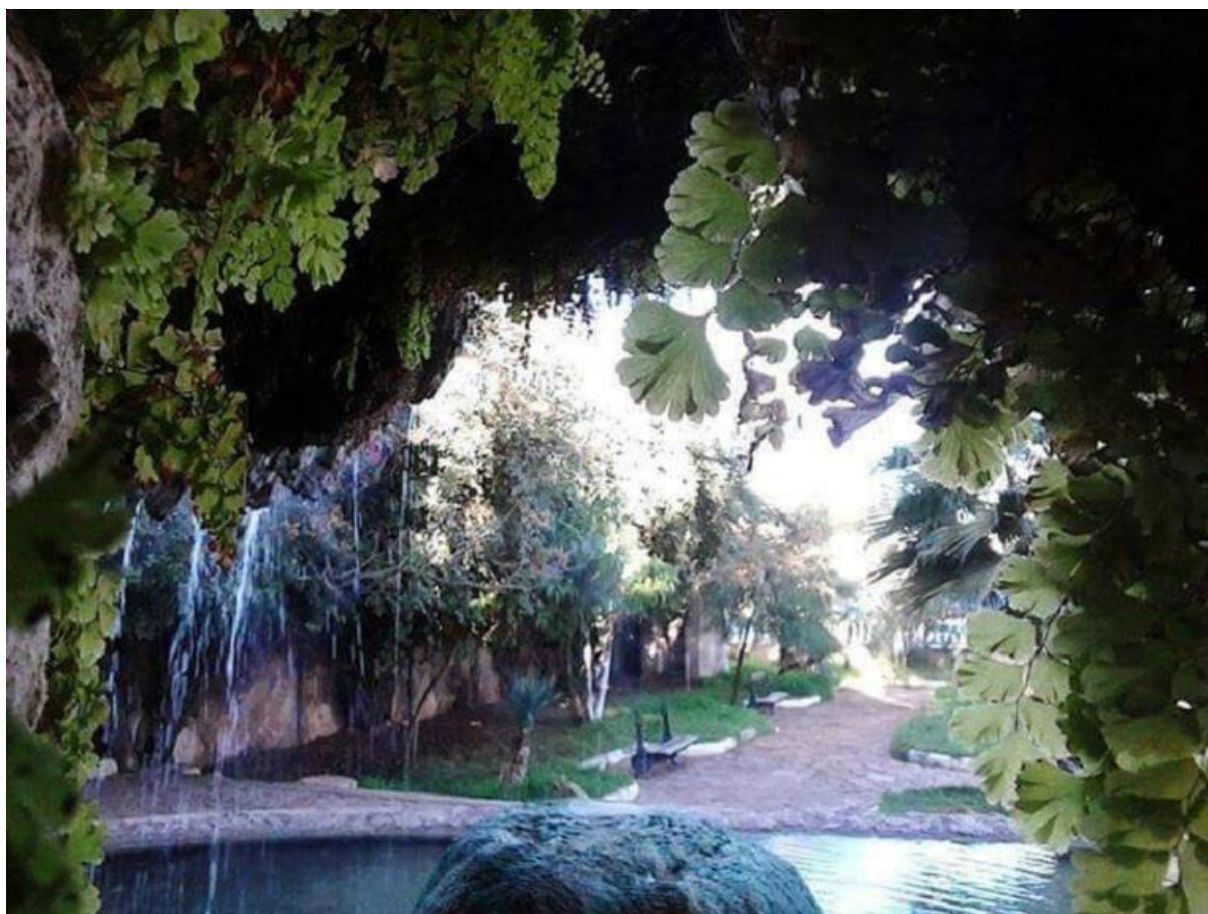


Figure .11: Station thermale de Hammam Bouhadjar dans la Wilaya d'Ain Temouchent (**Boukerche et Mostari,2020**).

4 Isolement des souches protéolytiques

Pour la préparation des suspensions bactériennes, on devrait suspendre ou agiter une quantité de 1g ou 1 ml de chaque échantillon dans un volume de 9 ml d'eau physiologique

stérile, L'homogénéisation de la suspension devraient être effectuée pendant 30 min à l'aide d'un agitateur vortex.

Des dilutions en série devraient ensuite être préparées à partir de la solution mère (10^{-2} - 10^{-7}), en déposant un volume de 1 ml de chaque dilution dans une quantité de 9 ml d'eau physiologique stérile supplémentaire. L'isolement sélectif aurait été réalisé par étalement de 0,1 ml de chaque dilution sur milieu de culture gélosé au lait écrémé (**Annexe A**). Les boites inoculées devraient être incubées à une température de 30 °C pendant 24-48 heures (**Gaurav et al.,2014**).

5 Purification des souches protéolytiques

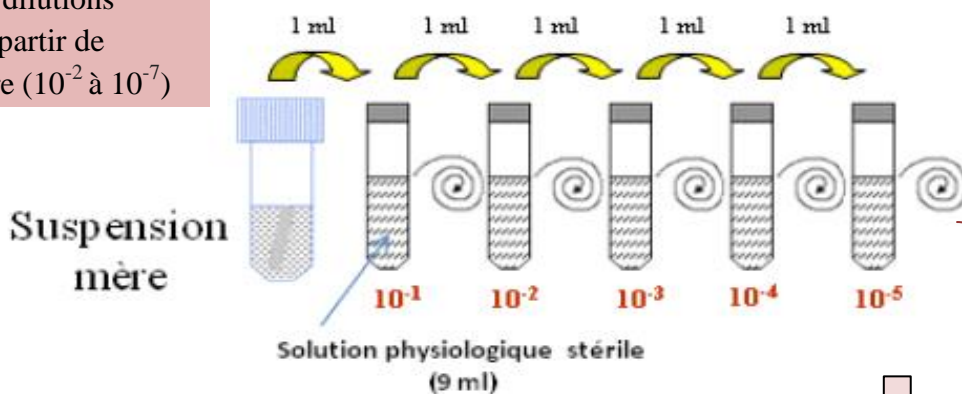
Les isolats devraient par la suite être purifiés par repiquage successif sur le milieu d'isolement, puis incubés à une température de 30°C pendant 24 heures. L'opération devrait être répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention de colonies pures et uniformes. L'ensemencement des boites aurait été réalisé en surface par la méthode des cadrants (stries serrés) pour la mise en évidence de l'aspect des colonies et l'élimination de toute éventuelle contamination (**Yilmaz et al., 2005**).

6 Screening des souches protéolytiques les plus performantes

Dans le but de mettre en évidence l'activité enzymatique des souches productrices de la protéase, chaque souche devrait être ensemencée par spot au centre du milieu spécifique à la production de l'enzyme protéase, contenant (g/l), K_2HPO_4 (2.0g), glucose (1.0g), peptone (5.0g), gélatine (15.0g), et l'agar (15.0g). Le diamètre des zones d'hydrolyses devrait être mesuré après incubation à 28°C pendant 24 à 48 heures, en inondant les boites avec une solution de chlorure mercurique (**Abdel Galil, 1992**). Les souches montrant des zones d'hydrolyse maximales devraient être sélectionnées pour la suite des études.

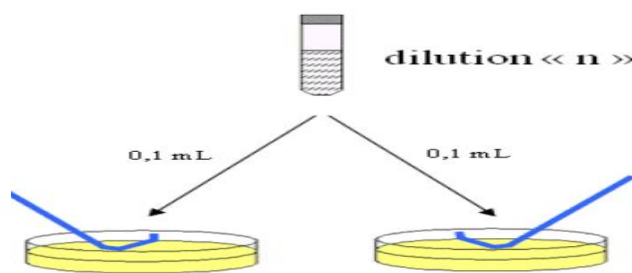
La (**Figure .12**) ci-dessous présente le plan expérimental de l'enchaînement des techniques qui devraient être utilisées pour la réalisation de notre travail.

Réaliser des dilutions décimales à partir de solution mère (10^{-2} à 10^{-7})



Isolement des souches protéolytiques

Incubation à 37°C pendant 24 à 48 h



Purification des souches protéolytiques

Screening des souches protéolytiques les plus performantes

Etude enzymatique

Identification phénotypiques des souches protéolytiques

Suivi de la cinétique de la croissance

Effet de la durée d'incubation

Effet du pH et de la température

Étude morphologiques

Métabolisme des molécules larges

Études biochimiques

Étude macroscopique

Étude microscopique

Réaction de catalase

Test d'oxydase

La galerie

Coloration de Gram

Coloration des spores

Figure .12 : Plan expérimental de l'enchaînement des méthodes utilisées (Boukerche et Mostari,2020).

7 Identification phénotypique des souches

L'identification préliminaire des souches isolées est basée essentiellement sur l'étude des caractères macroscopiques (couleur, relief, bordure, taille, élévation, opacité et surface des colonies), l'étude microscopique (coloration de Gram et coloration de spores), l'étude des enzymes respiratoires terminales (recherche de la catalase et de l'oxydase), l'étude des caractères biochimiques : métabolismes des molécules de haut poids moléculaire (lipase, amylase et caséinase), test de mobilité ainsi que l'utilisation de la galerie API20E (**Thomas et al., 1970**).

7.1 Critères morphologiques

C'est la première étape qui oriente le processus d'identification des bactéries. Elle porte sur la description des colonies obtenues sur les milieux solides en se basant sur les caractères morphologiques. L'observation à l'œil nu est basée sur les éléments d'identifications données par (**Thomas et al., 1970**) :

- La forme des colonies : circulaire, filamenteuse, ondulée
- La taille des colonies : punctiforme (<1mm de diamètre), non punctiforme (>1mm).
- La chromogène : couleur de pigment.
- L'opacité : transparente, translucide ou opaque.
- L'élévation : colonie plate, convexe ou concave.
- L'aspect de la surface : lisse, sèche, rugueuses, brillant ou émoussée.
- L'aspect de contour : régulier ou non (denté, étoilé....).
- La consistance : visqueuse ou non visqueuse.

7.2 Étude microscopique

L'observation microscopique devrait s'effectuer à l'aide d'un microscope optique.

7.2.1 Observation microscopique à l'état frais

L'observation des bactéries protéolytiques à l'état frais se fait en absence de toute fixation ou coloration. Selon **Marchal et Bourdon (1982)**, cette méthode permet d'observer la morphologie des microorganismes, leur taille, leur mode de regroupement, ainsi que leur mobilité. La procédure consiste à déposer entre lame et lamelle une goutte de la suspension microbienne (à partir d'une culture jeune et pure) à l'aide d'une pipette pasteur, puis l'observer au microscope photonique au grossissement x40.

7.2.2 Observation microscopique à l'état fixé

7.2.2.1 La coloration de Gram

La coloration de Gram consiste à déposer quelques gouttes de violet de gentiane sur un frottis fixé pendant 1 minute, après rinçage on verse quelques gouttes de lugol et on laisse agir 1 minute, les bactéries décolorées par la suite à l'alcool 95°, puis on devrait rincer avec de l'eau distillée. Enfin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl devraient être versées sur la lame qu'on laisse agir 20 secondes. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on devrait passer à l'observation microscopique (**Larpent et Larpent, 1990**).

Les isolats devraient être soumis à la coloration de Gram, celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les couques et de nous renseigner sur le mode d'association (**Larpent et Larpent, 1990**).

7.2.2.2 La coloration des spores par le vert de malachite

La spore bactérienne est un organe facultatif. On la trouve seulement chez certaines espèces bactériennes (généralement à Gram positif : *Bacillus*). Elle représente une forme de résistance de la bactérie aux conditions défavorables de vie (chaleur et dessiccation). Pour mieux la mettre en évidence, on devrait réaliser une coloration au vert de malachite. (**Delarras, 2007**). Cette coloration devrait être effectuée uniquement pour l'isolat de forme bacille, Gram positive. Après avoir réalisé le frottis bactérien comme précédemment, on devrait verser quelques gouttes de la solution aqueuse de vert de malachite 5 %, et on devrait chauffer pendant 10 minutes. Après le lavage du frottis à l'eau, on devrait être ajoutée la solution aqueuse de fuchsine basique à 5% et on laissant agir pendant 1 minute. Le frottis devrait être lavé à l'eau distillée et devrait être séché soigneusement (**Dorner, 1926**). L'observation du frottis aurait été faite à la microscopie optique (objectif à immersion x 100). Les spores devraient apparaître de couleurs vertes dans des corps bactériens roses. La position dans la cellule, la déformation du bacille et la forme de la spore, sont des renseignements taxonomiques intéressants et importants.

7.3 Détermination du type respiratoire (gélose viande foie)

Ce test devrait être effectué selon la technique décrite par **Guiraud (1998)**, la gélose viande foie coulée dans des tubes aurait été régénérée pendant 30 minutes au bain d'eau bouillante. Les souches bactériennes auraient été ensemencées à l'aide d'une pipette Pasteur

fermée et chargée en remontant en spirale dans la gélose. Après 24 heures d'incubation, on devrait observer à quel niveau du tube il y a eu une culture :

- Culture à la surface : type aérobie stricte ;
- Culture partout sauf à la surface : Type anaérobie strict ;
- Culture dans tout le tube : Type aéro-anaérobie facultatif ;
- Culture près de la surface du tube : Type micro aérophile (**Denis et al., 2007**).

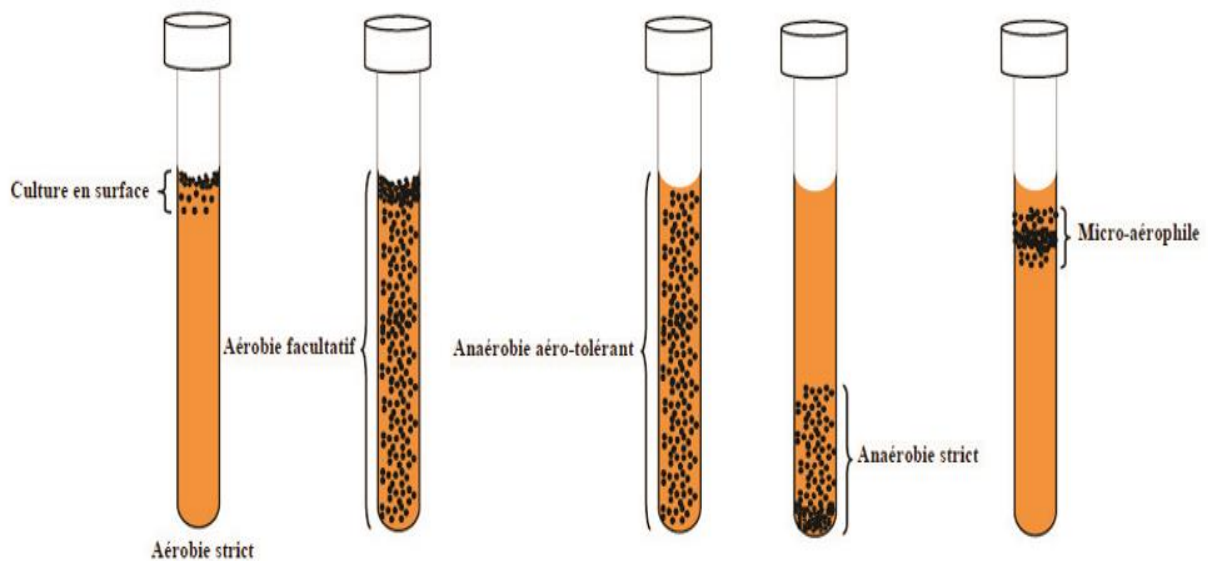


Figure .13 : Détermination de type respiratoire (**Prescott,2002**).

7.4 Mobilité (milieu mannitol mobilité)

Principe : Le milieu Mannitol Mobilité permet d'orienter l'identification des Entérobactéries par la mise en évidence de certaines de leurs caractéristiques métaboliques :

- ✓ Fermentation du mannitol
- ✓ Étude de la mobilité

La fermentation du mannitol induit une acidification qui provoque une coloration jaune du milieu ; changement de couleur de l'indicateur de pH : Rouge de phénol.

La mobilité est devrait être mise en évidence par l'apparition d'un trouble homogène (capacité des bactéries à envahir l'ensemble de ce milieu faiblement gélosé).

Technique

- Ensemencement sur le milieu Mannitol Mobilité par pique centrale jusqu'au fond du milieu à partir d'une culture pure.

- Incuber pendant 24 heures à 37°C.

Lecture

- Le milieu prend une coloration jaune : mannitol (+)
- Le milieu reste rouge translucide : mannitol (-)
- les bactéries mobiles envahissent le milieu en donnant un trouble homogène.
- Les bactéries immobiles donnent une culture limitée à pique d'ensemencement
(Marchal et Bourdon, 1982).

7.5 Conservation des souches isolées

➤ **Conservation à courte durée**

La conservation à courte durée des souches pures, productrices de la protéase devrait être procédée sur gélose inclinée, incubée à une température de 30°C pendant 24 heures. Les cultures devraient ensuite être maintenues à + 4°C et repiquées toutes les 4 semaines **(Badis et al., 2005).**

➤ **Conservation à longue durée**

La conservation des souches isolées, productrices de la protéase à longue durée devrait être effectuée sur bouillon BHIB glycérolé à 30%, devrait être inoculé à partir des pré-cultures jeunes âgées de 18 heures qui devraient être préalablement purifiées et incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Les cultures seraient ensuite conservées en suspension dense dans des Eppendorfs à (-20°C) **(Gallagher et Wiley, 2008).**

7.6 Étude biochimique

7.6.1 Recherche de l'oxydase

La recherche de l'oxydase est utilisée pour l'identification des bacilles à Gram négatif. La présence de l'enzyme phénylène diamine oxydase, est mise en évidence après le dépôt du disque d'oxydase sur une lame propre et leur imprégnation avec une suspension bactérienne pendant 2 minutes. Une réaction positive de la présence de l'oxydase se manifeste par le virage de la couleur du disque au rose-rouge **(Joffin et Leyral, 2006).**

Technique

- Déposer sur une lame propre, un disque d'oxydase.

- Mettre une goutte d'eau distillée.
- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur une colonie et y déposer sur le disque.

Lecture

- Coloration violette : oxydase positive.
- Aucune coloration : oxydase négative (**Joffin et Leyral, 2006**).

7.7 Recherche de la catalase

Principe : En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène (**Carbonnelle et al., 1988**).



Technique

- Déposer sur une lame de verre une ou deux gouttes d'eau oxygénée.
- Prélever à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur un fragment de colonie et dissocier la culture dans l'eau oxygénée.

Lecture

- Un dégagement de bulles de gaz : catalase positive.
- Aucun dégagement gazeux : catalase négative (**Carbonnelle et al., 1988**).

7.8 Métabolisme des molécules larges

7.8.1 Recherche de lipase

La mise en évidence de la présence de l'enzyme lipase chez des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase devrait être effectuée par ensemencement en spots, ou en stries de la surface de la gélose nutritive, additionnée d'une concentration de Tween 80 (**Annexe A**). Les cultures seront incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Une lecture positive de la production de la lipase se manifeste par l'apparition d'un halo opaque, autour de la colonie dû à la précipitation d'acides gras de la lipolyse (**De Vos et al., 2009**).

7.8.2 Recherche d'amylase

Ce test devrait être réalisé en cultivant la souche d'intérêt sur une gélose nutritive contenant 1% d'amidon (**Annexe A**). Après avoir obtenue une bonne culture bactérienne, la

surface de la gélose devrait être inondée par une solution de lugol. L'hydrolyse de l'amidon devrait être ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie, par contre un résultats négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (**De Vos et al., 2009**).

7.8.3 Recherche de cellulase

Le milieu de base supplémenté par 0.5% de CMC (**Annexe A**) devrait être utilisé pour sélectionner les souches bactériennes ayant une activité cellulolytique (**Bragger et al., 1989**). Les boîtes devraient être incubées à 45°C pendant 48h. Après incubation, les boîtes de Pétri devraient recouvertes d'une solution de rouge Congo à 0.1% (**Annexe D**) et placées pendant 15 à 30 minutes à 45°C. Les boîtes sont lavées par une solution à 1M de NaCl pendant 5 à 10 minutes à température ambiante avant la lecture. La production de cellulase devrait être appréciée par l'apparition de zones claires autour des colonies (**Bragger et al., 1989**).

8 Étude de l'activité protéolytique

8.1 Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée à partir de l'effet de l'enzyme sur la caséine. Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par la protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés (**Mathieu, 2005**). Cette quantité de tyrosine libérée, peut être mesurée directement par la méthode colorimétrique (absorbance à 275 nm), décrite par, (**Auberger et al. 1995**) et (**Mechakra et al. 1999**).

8.2 Préparation de l'inoculum

8.2.1 Milieu de production de la protéase

Le milieu de culture préconisé pour la production de la protéase, devrait être préparé dans un Erlenmeyer d'un volume de 500 ml et est composé de : 1 g/l glucose, 1 g/l caséine, 10 g/l peptone, 0,2 g/l extrait de levure, 0,1 g/l MgSO₄, 0,1 g/l CaCl₂ et 0,5 g/l K₂HPO₄. Le pH du milieu est ajusté à une valeur de 7 et stérilisé à 121°C pendant 15 minutes (**Qadar et al., 2009**).

8.2.2 Préparation de pré-culture

À partir d'une culture de chaque souche, une suspension de 9 ml d'eau distillée stérile devrait être préparée, ajustée à des intervalles de temps réguliers (1 heure), pour atteindre une concentration finale de 0,5 Mc Farland, qui correspond à une population bactérienne de 10^6 - 10^8 UFC/ml, qui devrait être mesurée par absorption à une longueur d'onde de 600 nm. Ensuite, 1 ml de la suspension bactérienne standardisée devrait être inoculé dans un volume de 100 ml du milieu de culture de production à raison de 1%, devrait être incubé avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C, pendant 24 heures, Les pré-cultures devraient par la suite être vérifiées au microscope afin de s'assurer de la bonne croissance des souches dans le milieu (**Boukhtache, 2018**).

8.2.3 Culture en batch

Un volume de 2 ml de chaque pré-culture devrait être inoculé dans un volume de 100 ml du milieu de culture de production, devrait être incubé avec une agitation de 130 rpm à une température de 30°C, pendant 48 heures. Pour chaque expérience, 3 cultures en batch auraient été préparées dans des Erlenmeyers de 500 ml de capacité (**Boukhtache, 2018**).

8.2.4 Suivi de la cinétique de la croissance

Les souches pures sélectionnées productrices de la protéase, devraient être inoculées dans des fioles Erlenmeyers de 250 ml contenant un volume de 100 ml du même milieu de production liquide, devraient être incubées à une température ambiante avec une agitation de 100 rpm pendant 24 heures. La biomasse des cultures devrait être mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 275 nm, des prélèvements d'un volume de 1 ml à des intervalles de temps réguliers de 3 heures devraient être effectués, en utilisant une micro-cuvette en verre de 1 cm de chemin optique (**Boukhtache, 2018**).

8.3 Mesure de l'activité protéolytique

Un volume de 2 ml d'une suspension bactérienne de chaque culture en batch devrait être prélevé dans un Eppendorf stérile, devrait être centrifugé à une vitesse de 8000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Ensuite, le surnageant récupéré devrait être dilué dans le tampon borate et devrait être ajusté à un pH de 8,2 (**Calik et al., 2000b**) (les préparations des solutions sont mentionnées dans (**Annexe D**)). La réaction enzymatique aurait été effectuée en ajoutant 1 ml de la solution enzymatique à tester, à 5 ml de la solution de caséine (1,2% dans

le tampon borate à pH 8,2) (**Beg et al., 2002**). Le mélange caséine-protéase devrait être maintenu à 37°C pendant 10 minutes, avec une faible agitation constante, dans un bain-Marie à agitation. Après cette période, la réaction devrait être arrêtée par l'ajout de 5 ml de TCA. Le mélange est incubé à 37°C durant 30 minutes afin de s'assurer de la précipitation totale de la caséine non hydrolysée. Parallèlement aux échantillons, des blancs devraient être préparés par l'ajout de 5 ml de TCA à un volume de 5 ml de caséine et devrait être incubés à une température de 37°C pendant 10 minutes. Par la suite, les échantillons et les blancs devraient être filtrés sur papier Wathman de grade et devrait être analysés au spectrophotomètre UV-Visible à 275 nm (**Drouin, 2005 ; Beg et al., 2002**).

8.4 Étude des propriétés de l'enzyme

Il est très connu que la production des protéases microbiennes extracellulaires est remontes fortement par la durée de l'incubation, les facteurs physicochimiques (température, pH) (**Djekrif-Dakhmouche et al., 2006**).

8.4.1 Étude de l'effet de la durée d'incubation

L'effet du temps d'incubation sur l'activité protéolytique des souches isolées, sélectionnées est mise en évidence sur un milieu de culture de production. Le milieu de culture synthétique devrait être inoculé avec 2 ml de chaque culture en batch et devrait être incubé à 30°C avec agitation de 130 rpm à des intervalles de temps (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 et 120 heures). À la fin de chaque période, le surnageant devrait être récupéré par centrifugation à une vitesse de 8000 rpm pendant 10 minutes à + 4°C, l'activité protéolytique devrait être évaluée par mesure de l'absorbance à 275 nm (**Calik, 2002**).

8.4.2 Influence du pH

L'influence du pH sur l'activité enzymatique devrait être estimée par l'addition (au mélange réactionnel) de tampons afin d'obtenir différentes valeurs de pH, c'est-à-dire des pH compris dans l'intervalle [4-9]. Pour cela, on devrait ajoute les systèmes tampons suivants :

- Pour l'intervalle [4 –5] : citrate de sodium (0,1 M) / phosphate monosodique (0,2 M) ;
- Pour l'intervalle [5 –7] : phosphate monosodique (0,2 M) / phosphate disodique (0,2 M) ;
- Pour l'intervalle [7 –9] : phosphate disodique (0,2M) /NaOH (1N) (**Lakba et Soucha, 2015**).

8.4.3 Influence de la température

L'effet de la température d'incubation devrait être déterminé par mesure de l'activité protéique de l'extrait brut, devrait être incubé pendant 1 heure à des différentes températures, à pH optimal (Lakba et Soucha, 2015).

9 Identification biochimique par la galerie API 20 E

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes devraient être inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests d'identification biochimiques. Les réactions produites pendant la période d'incubation (24 h à 48 h), se traduisent par des visages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Delarras, 2007).

La lecture de ces réactions devrait se faire à l'aide d'un tableau de lecture et l'identification, devrait être obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (Delarras, 2007).

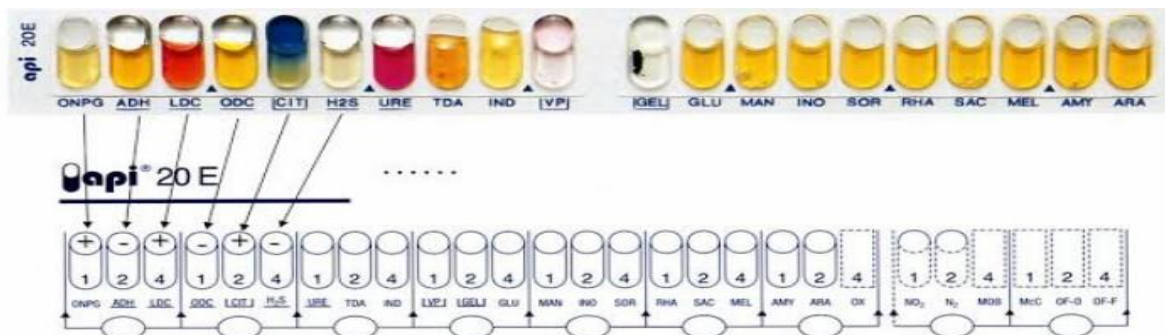


Figure .14 : Galerie API 20E et son catalogue témoin (Delarras, 2007).

Résultats et discussions

Dans le cadre de ce projet, concernant l'étude des enzymes protéases produites par des bactéries, provenant de différents milieux riches en protéines et de milieux aux conditions extrêmes. Nous avons fait des recherches sur des travaux antérieurs, réalisés par d'autres chercheurs, dans l'optique de découvrir ces souches protéolytiques déjà isolées et identifiées, ainsi de montrer les différentes techniques employées pour la caractérisation de ses souches microbiennes, l'optimisation de leurs activité enzymatique et l'interprétation des résultats obtenus. Nous avons sélectionné sept travaux sur les bactéries protéolytiques, dont les résultats sont présentés ci-dessous (**Tableau .09**) et (**Tableau .10**).

Tableau .09 : Bactéries protéolytiques identifiées par d'autres chercheurs.

Titre de thèse / article	La nature et le site de prélèvement	Identification phénotypique	Zone d'hydrolyse	Références
Production, optimisation et purification partielle de la protéase à partir de <i>Bacillus subtilis</i> .	Le sol prélevé sur des routes secondaires à Chennai.	La souche identifiée comme <i>Bacillus subtilis</i> .	22 mm	Gaurav et al., 2014
Isolement et criblage des protéases extracellulaires produites par un nouveau <i>Bacillus sp</i> isolée.	L'eau de mer et de sédiments (30 m de profondeur) de la côte de la mer rouge Jeddah. Arabie Saoudite.	Une bactérie sporulée mobile, Gramme-positif, en forme de bâtonnet, identifiée comme <i>Bacillus. sp</i> .		Hanan et Alnahdi, 2012

<p>Isolement et identification de certaines bactéries productrice de protéase provenant de plumes de poulet.</p>	<p>Les plumes de poulet rapportées de l'abattoir d'Ouled Boughalem de Wilaya de Mostaganem en Algérie.</p>	<p>4 isolats identifiés respectivement comme suit : <i>Bacillus licheniformis</i>, <i>B. macerans</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Enterococcus</i>spp. Identification biochimiques -Catalase : S1 et S3 positive et S2 et S4 négative. - Test de Mannitol mobilité : positive. - Amylase : S1et S3 positive, S2 et S4 négative.</p>	<p>S1: 3.8mm. S2:5.2mm. S3: 3.28. S4:3.6mm.</p>	<p>Mekdour et Haraoui, 2017</p>
<p>Screening et optimisation de la production de protéase à partir d'un <i>Bacillus licheniformis</i> halotolérant isolé à partir de sédiments salins</p>	<p>Sédiments de mers salées (Tuticorin) d'Inde.</p>	<p>-15 bactéries halotolérantes provenant de mers salines ont été criblées pour la production de protéase ; -Colonie : grande, ronde, irrégulière. -bâtonnet Gram positif -Coloration de spore formatrice -Identification biochimiques : -Catalase : +. -Oxydase : - -Amidon :+.</p>	<p>Six souches les plus performantes ont été identifiées par mesure des zones d'hydrolyses autour des colonies. La plus part sont des <i>Bacillus. sp</i> 3 -5 ,2 mm de longueur et 0,4 – 0,7 mm de largeur.</p>	<p>Suganthi et al., 2013</p>

<p>Isolement et caractérisation de bactéries productrices de la protéase.</p>	<p>Sols riches en protéines de région de la Chlef d'Algérie.</p>	<p>15 souches sélectionnées Gram positif, bâtonnets. L'identification selon le système galerie API20E, montre les espèces bactériennes suivantes : <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Enterococcus facium</i>, <i>Enterobactersp</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>P. fluorescens</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>B. cereus</i>, <i>B. licheniformis</i> et <i>Bacillus. sp.</i> L'identification biochimique : -catalase : + -Oxydase : +</p>	<p>15 souches sélectionnées par la formation des zones d'hydrolyses de diamètres entre 32 et 40 mm.</p>	<p>Boukhtache, 2018</p>
<p>Production, purification et caractérisation de l'enzyme protéase de <i>Bacillus subtilis</i>.</p>	<p>La souche <i>Bacillus subtilis</i> préalablement isolée de l'eau.</p>	<p>Gram positive, sporulée</p>		<p>Elsafey et AbdulRaouf, 2004.</p>
<p>Production de protéases alcalines par des cellules immobilisées à l'aide de <i>B. licheniformis</i></p>	<p>Cellules de <i>Bacillus licheniformis</i> immobilisées sur du chitosane, des rafles de maïs.</p>			<p>Vida et al., 2013.</p>

Tableau .10 : Propriétés de l'enzyme protéase pour une activité maximale.

<i>Activée enzymatique</i>	<i>Le pH optimal</i>	<i>La température optimale</i>	<i>La durée incubation</i>	<i>Références</i>
10.8U/ml	7.4	40-50°C	36 h	Gaurav et al., 2014
243U/ml.			72 h	Hanan et Alnahdi, 2012
	S1: 9. S2: 5. S3 : 7. S4 : 5.	S1: 45°C. S2: 30°C. S3: 55°C. S4: 55°C.		Mekdour et Haraoui, 2017
109 ,52U/mg	7 à 11.		La production d'enzyme est maximale à une durée d'incubation de 24h à 30h avec une production de 101,30U/mg.	Suganthi et al ., 2013
les 15 souches sont dotées d'une activité maximale entre 1.10 et 1.80 U/ml.	Le pH 5.5 et 7.5 chez les souches isolées.	La température où l'activité protéolytique est maximale à 30°C pour la majorité des souches.	48 h	Boukhtache. 2018
La purification de la protéase aboutie à une activité enzymatique de 6381.72 U/mg	Une activité maximale à pH 7.	une température d'incubation optimale était mesurée à 35°C.	Période d'incubation optimale pendant 30h	Elsafey et AbdulRaouf. 2004

L'activité protéolytique est de 176.7 U/ ml	La production enzymatique maximale était obtenue à pH = 7, 6.	La température optimisée pour l'activité enzymatique était 37 ° C.	Le taux de croissance le plus élevé a été atteint après 72 h d'incubation.	Vida et al., 201
---	---	--	--	-------------------------

Discussion

Plus de 300 tonnes d'enzymes, principalement des protéases, sont produites chaque année à partir de *Bacillus sp.* Les protéases microbiennes jouent un rôle important dans les processus biotechnologiques (**Perez et al., 2007**). Ces enzymes peuvent être produites à partir de bactéries, de champignons et de levures. Les bactéries du genre *Bacillus* sont des producteurs actifs de protéases alcalines extra-cellulaires. (**Potumarthi et al., 2007**). L'objectif de cette présente étude consiste à analyser l'ensemble des résultats obtenus par d'autres chercheurs qui ont réalisé des projets sur l'isolement et la caractérisation de bactéries protéolytiques et l'optimisation de leurs activités enzymatiques.

Les échantillons dans la plupart des études sont prélevés à partir des sols riches en protéine ; l'eau de mer, station d'épuration, laiterie, abattoir ainsi que les plumes de poulet ; et ceci pour le but de favoriser l'isolement des souches protéolytiques, possédant les caractéristiques désirés par la demande industrielle.

Plusieurs techniques d'isolement ont été effectuées, pour le criblage et la sélection des bactéries protéolytiques appartenant à différents genres. La première partie qui consiste à identifier les bactéries isolées (observations macroscopique et microscopique, les tests biochimiques et galerie API20E), a mené à l'identification de différents genres bactériens, comme *B. subtilis* trouvée par (**Gaurav et al., 2014**), de même pour les résultats rapportés par (**Elsafey et Abdul Raouf, 2004**), qui ont obtenu, des bacilles à Gram positif, sporulés. Également pour la bactérie du genre *Bacillus. sp* identifiée par (**Hanan et Alnahdi, 2012**). Ces résultats sont très proche de ceux trouvé par (**Suganthi et al., 2013**), d'autre part, les travaux rapportés par (**Boukhtache, 2018**) et (**Mekdour et Haraoui, 2017**) ont montré la présence des bactéries suivants : *B. lichoniformis*, *B. macerans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus. spp*, *Enterobacter. sp*, *Pseudomonas aeruginosa* et *P. fluorescens*.

Chaque bactérie possédant un pouvoir hydrolytique est cultivée sur milieu sélectif solide additionné d'une concentration de 1% de lait écrémé, Le choix des milieux de cultures est déterminé pour l'isolement et aussi dans la mise en évidence de l'activité enzymatique, et surtout le choix aussi de la substance protéique employée comme substrat, pour la production des protéases (**Clarke et Steel, 1966**). Les résultats sont révélés par l'apparition des halos de protéolyses. La zone d'hydrolyse observée autour des colonies de *B. subtilis* est de 22 mm (**Gaurav et al., 2014**), par ailleurs 15 souche sélectionnées par la formation de zones

d'hydrolyses de diamètres entre 32 et 40 mm (**Boukhtache, 2018**), et un diamètre de 3.8 mm mesuré chez *B. lichoniformis* (**Mekdour et Haraoui, 2017**).

D'autre part, l'optimisation des différents paramètres de l'activité enzymatique, a montré plusieurs valeurs qui diffèrent d'une étude à une autre. Une activité protéolytique maximale de 6381.72 (U/mg prot/ml¹) atteinte après 30h d'incubation par *B.subtilis* (**Elsafey et Abdul Raouf, 2004**). Deux autres souches ont montré une production élevée de protéase ; *B. lichoniformis* (**Mekdour et Haraoui, 2017**) et *Bacillus .sp* (**Gaurav et al., 2014**) qui mesure respectivement 176.7U/ml et 2437U/ml, ces valeurs indiquent que, la souches de *Bacillus. sp* est la plus favorable pour une utilisation industrielle. Cette activité protéolytique peut être augmentée en optimisant l'extraction de la protéase par plusieurs paramètres comme les facteurs physicochimiques tel que le pH, la température, la source de carbone, la source d'azote et la durée d'incubation .

Enfin, concernant l'étude des paramètres physicochimiques (l'effet de la température, le pH, la durée d'incubation) sur l'activité protéolytique, les résultats varient. Certains chercheurs (**Gaurav et al., 2014 ; Suganthi et al., 2013, Boukhtache, 2018**) ont rapporté que, le pH optimal est égale à 7. Des études similaires étaient réalisées par (**Elsafey et Abdul Raouf, 2004**) sur *B. subtilis* par contre, ils ont observé une activité de production maximale à pH entre 5 et 11, également pour les travaux effectués par (**Mekdour et Haraoui, 2017**) sur les souches *B. lichoniformis*, *B. macerans*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus. spp*, ont rapporté des valeurs différentes de pH optimal pour les quelles la production est maximale, le changement du pH peut provoquer une dénaturation de l'enzyme avec la perte de son activité catalytique.

En ce qui concerne l'effet de la température sur l'activité protéolytique, la température optimale de 37°C est obtenue par plusieurs chercheurs (**Elsafey et Abdul Raouf, 2004 ; Boukhtache, 2018**). Par ailleurs, quelques protéases bactériennes présentent une activité protéolytique maximale à des températures entre 40°C à 55°C (**Mekdour et Haraoui, 2017 ; Gaurav et al., 2014**).

La mesure de l'activité de protéase à différents intervalles de temps d'incubation montre que la productivité maximale de protéase est atteinte après 24h à 30h, avec une production de 101,30 U/mg ; après cette période, l'activité enzymatique est légèrement diminuée (**Suganthi et al., 2013**). Le même résultat a été obtenu par (**El-safey et Abdul-Raouf, 2004**). Par contre, une activité élevée était également enregistrée à un temps d'incubation de 48h à 72h a

été trouvée par (**Boukhtache, 2018 ; Maghsoodi et al.,2013 ; Hanan et Alnahdi, 2012 ;Gaurav et al., 2014**). La période d'incubation est liée proportionnelle à la production d'enzyme et des autres métabolites dans certaines mesures. Après cela, la production d'enzyme et la croissance des microorganismes commence à décliner, ce qui peut être attribué à la diminution de l'offre de nutriments aux microorganismes et l'accumulation des métabolites toxiques (**Mukhtar et UI-Haq,2009**).

Conclusión

Les industries utilisent des microorganismes qui produisent des enzymes conformément à leurs objectifs commerciaux, et en particulier les bactéries qui constituent des modèles uniques pour des recherches, sur la stabilisation des biomolécules, lorsqu'elles sont soumises à des conditions extrêmes, elles offrent une multitude d'applications réelles ou potentielles dans divers domaines de la biotechnologie (**Eddison, 2013**). Cependant, les protéases microbiennes sont parmi les enzymes les plus employées en industrie, depuis qu'elles présentent les caractéristiques les plus recherchées dans les applications biotechnologiques. En raison de cette grande importance biotechnologique occupée par les protéases microbiennes, nous avons exploité dans ce travail l'objectif de rechercher des bactéries capables de produire des protéases ayant un intérêt industriel à moindre coût.

Dans le cadre de ce travail concernant l'étude des protéases produites par des bactéries provenant, du sol et de sources thermales, on devrait utilisé et dans notre démarche expérimentale des protocoles simplement réalisables, dans le but d'isoler et caractériser une large gamme de bactéries protéolytiques à intérêt biotechnologique et l'optimisation des différents paramètres, impliqués dans la production de cette enzyme telle que le pH, la température ainsi que l'étude de l'activité enzymatique.

Les résultats obtenus dans plusieurs travaux de recherche, ont montré que, la plupart des bactéries productrices de protéases sont à Gram-positif comme *Bacillus sp.*

Ces résultats ouvrent d'autres perspectives qui consistent à :

- L'optimisation du milieu de production pour un meilleur rendement.
- L'immobilisation de l'enzyme pour augmenter d'avantage sa stabilité.
- La purification de l'enzyme s'il est destiné à un usage industriel, l'obtention de cet enzyme à l'état pur permettrait une connaissance beaucoup plus fine des forces et des faiblesses de ce spectre.
- L'application industrielle des protéases et l'utilisation de cette enzyme pour dépolluer les sites contaminés par de divers rejets industriels ou agricoles riches en carbone ou en azote dans l'industrie des détergents.

Enfin il serait intéressant de créer une stratégie visant la découverte de nouvelles dimensions de la diversité moléculaire et technologiques ; pour améliorer les caractéristiques de performance par des modifications *in-vitro* des structures primaires de l'enzyme d'intérêt.

*Références
bibliographiques*

A

1. **Abdel-Galil A, El-Mas M, El-Goweli H, Daabees T. (1997).** Short-term aortic barodenervation diminishes α 1-adrenoceptor reactivity in rat aortic smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*.322 (2):201-210.
2. **Abdel-Raouf M, El Safey E. (2004).** Production, purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *Assint Univ*.14:23-25.
3. **Aehle W, Sobek H, Amory A, et al (1993).** Rational protein engineering and industrial applications. Structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved « washing-performance » -the alkaline protease from *Bacillus alcaliphilus*. *J Biotechnol*. 28:31-40.
4. **Akhtar K, Parvin N, Soheila Y et al (2013).** Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*. *Scientia Iranica*.20 (3):607-610.
5. **Alais C. (1975).** Sciences du lait. (ed) Principes et techniques laitières. Masson, Paris, pp108-645.
6. **Ansari S, Helms V (2005).**Statistical analysis of predominantly transient protein-protein interfaces. *Proteins*, 61(2): 344-355.
7. **Arnaud AC, Berset J, Bocquet M, et al (1993).**Biotechnologies. 4 éd : Scriban R (éd). Technique et Documentation Lavoisier, Paris, France, pp 904.
8. **Asha B, Palaniswamy M. 2018.** Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* .8 (02):119-127.
9. **Auberger B, Lamberet G, Lenoir J (1985)** Les activités enzymatiques de *Penicillium camemberti*. *Le lait*.59 : 244-268.
10. **Aviron-Violet P, Baret JL, Bertrand C, et al (1982).** Les enzymes production et utilisation industrielles. Durand G. et P. Monsan (éd), Bordas, Paris, France, p 349.

B

11. **Badis A, Laouabdia-Sellami N, Guetarni D, Kihal M, Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de cru de chèvre de deux populations caprines locales (Arabia et Kabyle). *Sciences and thecgnologie*.23 :30-37.
12. **Bahar I, Erman B, Jernigan RI, et al (1999).** Collective montions in HIV-1 reverse transcriptase: examination of flexibility and enzyme function. *J Mol Bio*. 285(3):1023-37.

13. **Barnabé S. (2003).** Eaux usées et résidus industriels. matières tertiaires ou matières premières. *Vecteur environnement*.36 (2): 50-62.
14. **Beg Q. K., Saxena R. K., Gupta R. (2002).** De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operation. *Press biochemistry*, 37:1103-1109.
15. **Benlounissi A. (2004).** La protéase acide de *penicillium camemberti*. Production sur lactosérum précipitation par le sulfate d'ammonium et action sur le lait de chèvre. *Thèse de magistère*. Université Mentouni. Constantine.
16. **Bensouilah T, Kirati H, Touati H. (2012).** « Microbiologie des fientes de quelques espèces aviaires nicheuses dans la région de Guelma ». *Mémoire de Master*, Université de Guelma, pp 59.
17. **Bezawada J, Yan S, Tyagi RD, et al (2010).** Comparison of protease activities in different *Bacillus licheniformis* strains using wastewater sludge and synthetic soy medium as raw material. *Environ technol.* 31:63-72.
18. **Boiron P. (1996).** (ed) Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris, 19-79.
19. **Bontton B, Breton A, Fevre M, et al (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. (ed) Importance industrielle. Masson. Paris, pp 12-426.
20. **Boughlali M. 2003.** Thermalisme et thalassothérapie en Algérie. *Therm Climat.* 140:161-165.
21. **Boukhtache H (2017)** Isolement et caractérisation des bactéries productrices de protéase à intérêt biotechnologique. *Thèse de doctorat, Sciences biologiques*, Université de Sidi bel Abbes, Algérie, pp 170.
22. **Boumaza S. (2015).** Evaluation rapide des protéines par turbidimétrie : Application à quelques effluents agro-alimentaires avant et après un traitement de clarification. *Thèse de Doctorat 3ème cycle, Biochimie Appliquée*, Université Badji Mokhtar – Annaba. pp 15.
23. **Bragger JM, DanieL RM., Coolbear T, et al (1989).**Very stable enzymes from extremely *thermophilic archae bacteria and eubacteria*. *Appl Microbiol and Biotech*, 31:556-561.
24. **Buhot D. (1973).** Echantillonnage de sols. Conservation et préparation des échantillons. Problème statistique. *Am. Phytopathol.* 5 : 296-298.

C

25. **Calik P, Calik G, Ozdamar TH. (1998).** Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*. Use of citric acid as the carbon source. *Enzyme and Microbial technology*.23:451-461.
26. **Calik P, Calik G, Ozdamar TH. (2000a).** Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 69 (3): 301-311.
27. **Calik P, Bilir E, Calik G, et al. (2002).** Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*.31:685-697.
28. **Carbonelle D, Kouyoumdjian S, Audurier A. (1988).**Bactériologie médicale techniques. *Biothechnology*.13:345-351.
29. **Carugo O, Pongor S. (2002).**Protein folds similarity by a probabilistic approche based on C (alpha) – c (alpha) distance comparison. *J Mol Biol*. 315(4):887-98.
30. **Chen ST, Hsiao SC, Wang KT (1991).** Stable industrial protease catalyzed peptide hydrophobic cores. *Biochemistry*. 40(50):15280-9.
31. **Clarke P. H. et Steel K. J. (1966).** Rapid and simple biochemical tests for bacterial identification. Academic press. London. pp111.
32. **Clewell RR, Grigoroa R. (1989).** Methods in microbiology (ed) dimundsbert press limited. Great Britain. 133-138.
33. **Cody WC, Prasher DC (1993).***Biochemistry*32:1212-1218.
34. **Cousin D, Matagne A, Laemmli K, et al (1982).**The purification of neutral bacterial proteases *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem Mol Biol Int*. 34: 1557-1166.

D

35. **Dalev PG (1994).**Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresource Technology*. 48: 265-267.
36. **De Vos P, Garrity GM, Jones D, et al (2009).**Bergey's Manual of Systematic Bacterology, (2nd ed). Volume III, The firmicutes. Springer. New York, USA.
37. **Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire. Paris: (ed) TEC &DOC. pp 476.
38. **Denis E, Ploy MC, Martin C, et al (2007).**Bactériologie médicale Techniques usuelles. (2ème éd), Paris, Masson. pp631.
39. **Desmazeaud M. (1978).** Enzymes des microorganismes intervenant dans l'affinage des fromages. XXème Cong. Intern. Lait. Paris, France, pp 251.

40. **Devi MK, Banu AR, Gnanaprabhal GR, et al (2008).** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolates *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*.1 (7): 1-6.
41. **Deymié B, Multon J L, Simon D. (1981).** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. (ed) APRA Paris, Pp238-241.
42. **Djekrif-Dakhmoche S, Gheribi-Aoulini Z, Meraihi Z, Bennamoun L. (2006).** Application of statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*. 73. 190-197.
43. **Dorner W. (1926).** Un procédé simple pour la coloration des spores. Avec une planche en couleurs. *Le lait*.6(51):8-12
44. **Drouin M (2005).** Etude de la production de protéase alcaline par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat.

F

45. **Ferrero MA, Castro GR, Abate CM., et al (1996).** Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45:327-332.
46. **Ferrero MA (2000).** Protein hydrolysis: Isolation and characterization of microbial proteases. *Food Microbiology Protocols*. 14:227-232.
47. **Fogarty WM, Kelly CT. (1990).** Microbial enzymes and biotechnology, (2^{ème} ed). Elsevier science publishing, New-York, Etats-Unis, pp472.
48. **Frankera J, Van Verseveld HW, Stouthamer AH. (1985).** A continuous culture study of the bioenergetics aspects of growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 22:169-176.
49. **Frazier WC. (1967).** Food microbiology. (ed) Academie presse. London, pp 3-429.

G

50. **Gallagher S, Wiley E. (2008).** Current Protocols essential laboratory techniques New York. *John Wiley and Sons Inc*.978:470.
51. **Garsia-Gomez M J, Huert-Ochoa O, Prado-Barragan LA. (2009).** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fiche flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry*.112:604-608.

52. **Gaurav P, Anil P, Pavani JVP et al. (2014)**, production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*. 9(2015):50 -55.
53. **Giesecke UE, Bierbaum G, Rudde H, et al (1991)**. Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 35:720-724.
54. **Gololobov MY, Stepanoov VM, Voyushia TL, et al (1994)**. Side reactions in enzymatic peptide synthesis in organic media: Effects of enzyme, solvent and substrate concentration. *Enzyme Microb Technol*.16:522-528.
55. **Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM (2005)**. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res Jul*. 30(70):505-15.
56. **Guiraud JP. (1998)**. microbiologie alimentaire microbiologie des principaux produits alimentaires. Ed, Dunod, Paris, pp 625.
57. **Gupta R, Beg QK, Khan S, et al (2002)**. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 381-395.
58. **Gupta R, Beg QK, Lorenz P. (2002a)**. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:15-32.
59. **Gupta R, Gigras P, Mohapatran H, et al (2003)**. Microbial α -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 38:1599-1616.

H

60. **Hajji M, Kanoun S, Nasri M, Gharsallah N (2007)**. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*.42:791-797.
61. **Hameed A, Keshavarz T, Evans C. (1999)**. Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *Journal of Chemical technology and Biotechnology*. 74:5-8.
62. **Hanan S, Alnahdi. (2012)**. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2(9):71-74.
63. **Heim R, et al. (1994)**. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:12501-12504.

I

64. **Ichida JM, Krizova L, Lefebvre C.A, et al (2001).**Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiological Methods.* 47: 199-208.

J

65. **Jakubowski. (2001).** Proteinase chemistry and molecular biology. *J Biochem.*23 (5):1825-1827.

66. **Jaspard E (2013).** Role of protein-solvent interactions in refolding: effects of cosolvent additives on the renaturation of porcine pancreatic elastase at various pH. *Arch Biochem Biophys.* 375:220-228.

67. **Joffin JN, Leyral G. (2006).** Microbiologie technique. Tome 1, dictionnaire des techniques. Académie de bordeaux et crdp d'Aquitaine, France.

68. **Joffin, J.N et Lateral,G., (2006).**Microbiologie technique. Tom 1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux, France: Centre Régional De Documentation Pédagogique, pp 368.

69. **Joo HS, Chang CS (2005).** Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus sp.* I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry.* 40: 1263–1270.

70. **Joo HS, Kumar CG, Park GC, et al (2002).**Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry.* 38:155-159.

K

71. **Kamoun P, Lavoine A, De Verneuil H, et al (2003).** Biochimie et biologie moléculaire. Paris : (Ed) Flammarion. pp473.

72. **Keay L, Moseley H, Anderson RG, et al (1972).** Production and isolation of microbial protease. *Biotechnology and Bioengineering. Symposium.*3:63-92.

73. **Kembhavi AA, Kulkarni A, Pant A (1993).** Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM no.64. *Applied Biochemistry and Biotechnology.*38:83-92.

74. **Kresze GB (1991).** Proteases during purification. *Bioprocess-technol.*12:85-120.

75. **Kudrya VA, Simonenko IA (1994).** Alkaline serine protease and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 41:505-509.

76. **Kumar AG, Nagesh N, Prabhakar TG, et al (2008b).** Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes sp.* utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresource Technology.*99:2364-2372.

77. **Kumar CG, Hiroshi T (1999a)**. Microbial alkaline proteases: From a bio industrial viewpoint. *Biotechnol Adv.* 17:561-594.
78. **Kumar CG, Takagi H (1999)**. Microbial alkaline proteases: From a bio industrial viewpoint. *Biotechnology Advances.* 17: 561-594.
79. **Kumar G, Parrack P (2003)**. Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 19:757-762.

L

80. **Lachhab K, Tyagi RD, Valero JR (2001)**. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry.* 37: 197-208.
81. **Lakba H, Soucha H.**2015. Production des protéases par les mycètes isolés des milieux sahariniens, *Mémoire de master, science biologique.* Université des frère Montouni Constantine, Algérie, pp 69.
82. **Lamouliatte H, Mégrand F, Cayla R (1992)**.*Helicobacter pylori* et pathologie gastroduodénale. Encyclopédie Médico-chirurgicale. (ed) techniques. EMC.
83. **Larpent JP, Larpent GM (1990)**. Mémento technique de microbiologie. (ed) Lavoisier Tecet Doc, Paris, pp471.
84. **Laxman RS, Sonawane AP, More SV, et al (2005)**.Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry.* 40:3152-315.
85. **Linderstrom-Lang KU, Shellman JA. (1959)**. Protein structure and enzyme activity. In: The Enzymes (Paris): Academic Press, pp 973.
86. **Lynn F, Jahir AK, Ruchika P (1999)**.A study on partial purification and characterization of extracellular proteases from *Bacillus subtilis*. *Pelagia Research Library.* 2(3):509-519.

M

87. **Mabrouk SS, Hashem AM, EL-Shayeb NMA, et al (1999)**. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology.* 69:155-159.
88. **Mahajan RT., Badgujar SB (2010)**. Biological aspects of proteolytic enzymes.
89. **Mala BR, Aparna MT, Mohini SG, et al (1998)**.Molecular and biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Review.* 62:3597-635.

90. **Marchal N, Bourdon JL (1982)**. Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. (ed) Doin, Paris, pp 483.
91. **Martinelli SD, Kinghorn, JR (1994)**. *Aspergillus: 50 years on*. (ed) Elsevier. Amsterdam, pp 586-649.
92. **Mathieu D (2005)**. Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. *Thèse présentée par Institut National de la Recherche Scientifique INRS-Centre Eau*. pp 12.
93. **McKenzie HA (1971)**. Milk proteins chemistry and molecular biology. (ed) Berkeley square. London, pp 246-249.
94. **Mechakra A, Auberger B, Remeuf F, et al (1999)**. Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*. 19(6): 663-675.
95. **Meunier N. (1999)**. évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. *Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Université du Québec, Canada*. pp168.
96. **Mihail JD, Alcoren SM. (1987)**. Marcophomina phaseolma spatial patterns in cultivated and sampling strategies. *Phytopathology*.77:1126-1131.
97. **Moodie P. (2001)**. Traditional baking enzymes- proteases. *Enzyme Development Corporation*. 212:736-1589.
98. **Mukhtar H., Ikram UH. (2009)**. Production of Acid Protease by *Aspergillus niger* Using Solid State Fermentation. *Pakistan J. Zool*. 41(4):253-260.

N

99. **Nagashima T, Watanable A, Kise H. (1992)**. Peptide synthesis by proteases in organic solvents: Medium effect on substrate specificity Enzyme. *Microb Technol*.14:842-847.

O

100. **Ole K, Borchert TV, Fuglsang CC. (2002)**. Industrial enzymes applications. Current opinion. *On in Biothechnology*.13:345-351.

P

101. **Pelmont J. (1995)**. Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. (éd.) Sciences Technologie Médecine, Grenoble.619-655.
102. **Pelzar MJ, E.C.S Chan. (1981)**. Éléments de microbiologie. Traduit et adapté par J. Fontaine, (ed) HRW Ltée. Montréal, Canada, pp515.
103. **Penasse I. (1974)**. Enzymes cinétiques et mécanisme d'action. Masson. Paris, pp58-86

104. **Perez M, Piad R. (2011).** (Preparation of crude enzymatic from *Bacillus licheniformes E-44* and its evaluation in the hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Enzyme and Microbial Technology*.40:452– 455.
105. **Polgar L. (1989).** Mechanisms of protease action. CRCP ress. Boca Raton, Etats-Unis, pp211.
106. **Potumarthi R., Subhakar Ch., Jetty A. (2007).** Alkaline proteases production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformes* NCIM-2042: effet des régimes d'aération et d'agitation. *Biochemical Engineering Journal*.34: 185–192.
107. **Prescott L, Harley JP, Klein DA. (1995).**Microbiology, (2ème éd). De Boeck-Wesmael. Bruxelles, Belgique, pp 1014.
108. **Prescott L.M. (2002).** VIII Ecology and Symbiosis. In Microbiology .Fifth(ed). The McGraw-Hill Companies, pp 596-697.
109. **Puri S, Beg QK, Gupta R. (2002).** Optimization of alkaline protease production from *Bacillus sp.* By response surface methodology. *Current Microbiology*. 44:286-290.

Q

110. **Qadar S, Erum S, Samina I, et al. (2009).** Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus sp.* *Indian Journal Biotechnology*. 8:286-290.

R

111. **Rai SK, Mukherjee AK. (2010).** Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilizing-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemistry Engineering Journal* .48:173-180.
112. **Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, et al. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.62:270-272.
113. **Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ, et al (2006).** The peptidase database. *Nucleic Acids Research*.34:270-272.

S

114. **Saadoun IEL, Momani I (1997).** Stryptoyces from Jordan soil active against *Agrobacterium tumefaciens*.*Actinomycetes*.8:29-36.
115. **Sachveda V, Tyagi RD, Valéro JR (2000).** Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization disposal. *Water Science and Technology*. 42:211-216.
116. **Sadek M (2000).** Etudes de protéases bactériennes dans les boues d'eaux usées. Travail dirigé l. INRS-ETE. pp 1-32.

117. **Sandhya C, Nampoothiri KM, Pande A (2005a).** Microbial proteases. *Methods Biotechnology*.17:165-179.
118. **Sandhya, C, Sumantha A, Szakacs G, et al (2005b).**Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*.40:2689-2694.
119. **Sarcome, Rous. (1939).**Archiv fur diegesamte virusforschung.104-113.
120. **Screban R. (1993).** Biologie (4^{ème} éd). Technique et Documentation Lavoisier. Paris, pp 30-695.
121. **Scriban R. (1993).** Biotechnologie. (4^{ème} éd). Paris : *Technique et Documentation*. 39(42):351-356.
122. **Sharma R, Chisti Y, Banerjee S. (2001).** Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnenology Advances*.19:627-662.
123. **Simon J, Charnock, Barry V, et al. (2005).**Technique Extrait de la revue des oenologues.115:1-5.
124. **Simon P, R Meunier. (1970).** Microbiologie industrielle et génie biochimique. (ed) Masson et Cie. Paris, France, pp567.
125. **Sinha N, Satynarayana T. (1991).** Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*. *Indian Journal of Microbiology*. 31(4):425-430.
126. **Sinsuwan S, Rodtong S, Yongsawatdigul J. (2008).** Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus sp.* SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Process Biochemistry*.43:185-192.
127. **Sugantha C, Mageswasi A, Karthikeyn S et al (2013).** Screening and optimiszation of protease production from a halotelerent *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediment. *Journal of Genitic Enginneering and Biothchnology*.11:47-52.
128. **Sumantha A, Larroche C, Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol Biotechnol*. 244: 211–220.

T

129. **Thomas JD, Fischthal JH et al. (1970).** Digenetic trematodes of marine fishes from Ghana: Family Lepocreadiidae. *Journal of Helminthology*.44 (3/4):365-386.
130. **Thumar J T, Singh S P. (2009).** Organic solvent tolerance of an alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. *J Ind Microbiol Biotechnol*.36:211–218.

131. **Trap C, Boreau P. (2000).** Les protéases chez les helminthes. *Vet Res.* 31:461-471.
132. **Tzeng Y, Tsun Y, Chang Y. (1999).** Recovery of thuringiensis with cetylpyridinium chloride using Micellar-Enhanced ultrafiltration process. *Biotechnol Prog.* 15:580-6.

U

133. **UI-Haq I, Daudi S, Sikander A, et al. (2003).** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab condition. *Biotechnology.* 2(1):30-36.

V

134. **Vikram HR, Megha K, Purohit, et al. (2016).** Extracellular proteases from *Halophilic* and *Haloalkaliphilic Bacteria*. *Occurrence and Biochemical Properties.* 422-449.
135. **Vishwanatha KS, Appu Rao AG., Singh SA. (2010).** Acid protease production by solid state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC5341: Optimization of process parameters. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 37:129-138.

W

136. **Wilson SA., Peek K, Daniel RM. (1994).** Immobilization of a proteinase from the extremely thermophilic organism *Thermus Rt 41A*. *Biotechn Bioeng.* 43:225-231.
137. **Wu TY, Mohammed AW, Jahim JMd, et al. (2006).** Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentive of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial.* 39:1223-1229.

Y

138. **Yeza A, Tyagi RD, Valéro JR, et al. (2005).** Wastewater sludge pretreatment for enhancing entomotoxicity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *World journal of Microbiology and biotechnology.* Article sous presse.
139. **Yilmaz M., Soran H., Beryati Y. (2005).** Determination of polyhydroxybutirate production by some *Bacillus* sp. *JMicrob & Biotech.* 21:565-566.

Annexes

 Les milieux de cultures (Annexe. A)

Les compositions des milieux de culture utilisés

- **Gélose nutritive(GN) :**

Extrait de levure.....	2g/l
Peptone	5g/l
Extrait de viande	1g/l
Chlorure de sodium.....	5g/l
Agar.....	5g/l
Eau distillée	1000ml

pH à 7.2
- **Milieu TGEA : (Tryptone, Glucose, Extrait de levure, Agar)**

Extrait de levure.....	2,5g/l
Tryptone	5g/l
Glucose	1g /l
Agar.....	15g/l
Eau distillée	1000ml

Ph à 7
- **Milieu BHIB (Bouillon coeur cervelle)**

Protéose-peptone	10g/l
Infusion de cervelle de veau	12,5g/l
Infusion de cœur de bœuf	5g/l
Glucose	2g/l
Chlorure de sodium	2g/l
Hydrogénophosphate de sodium	2,5g/l
Eau distillée.....	1000ml

pH à 7,4
- **Gélose Tween 80**

Gélose nutritive.....	100ml
Tween 80.....	1,6ml
- **Milieu mannitol-mobilité (milieu d'oxydation-fermentation)**

Peptone	2g /l
Chlorure de sodium.....	5g/l
K ₂ HPO ₄	0,3g/l
Blue de bromothymol	0,03g/l
Eau distillée.....	1000ml

Ph à 7,2
- **Gélose viande foie (semi solide)**

Peptone viande-foie.....	30g/l
--------------------------	-------

Glucose	2g/l
Amidon	2g/l
Sulfite de sodium	2g/l
Citrate ferrique ammoniacal	0,5g/l
Agar	11g/l
Eau distillée.....	1000ml
pH à 7,6	

- **Gélose à l'amidon**

Gélose nutritive.....	100ml
Amidon.....	1%

- **Milieu CMC (composition en g/l)**

Peptone.....	10g
CMC (cellulose microcristalline).....	10g
K ₂ HPO ₄	02g
Agar.....	10g
MgSO ₄	0.3g
(NH ₄) ₂ SO ₄	02g
Gélatine.....	02g
pH=7.	

Les colorants (Annexe. B)

Les compositions des colorants utilisés

- **Fuschine de Ziehl**

Fuchsine basique.....	0.2g
Alcool éthylique à 90°	10g
Phénol.....	5g
Eau distillée.....	100ml

- **Lugol :**

Iode.....	1g
Iodure de potassium	10g
Eau distillée	300ml

- **Violet de Gentiane**

Violet de Gentiane	1g
Ethanol à 90°	10g
Phénol.....	2g
Eau distillée	100ml

Les réactifs (Annexe. C)

Les compositions des réactifs utilisés

- **α -naphтол : réactif pour la réaction de vosges –proskauer**

Naphtol	6g
Alcool éthylique à 60°.....	100ml

-Conserver dans un flacon opaque au réfrigérateur

Les solutions (Annexe D)

Les compositions de solutions utilisées

- **Solution d'eau physiologique**

Chlorure de sodium.....	5,85g
Eau distillée	100ml

- **Tampon phosphate**

KH ₂ PO ₄	9,08g
Na ₂ HPO ₄	9,47g

- **Solution rouge Congo 1%**

Rouge congo.....	1g
Eau distillée.....	100ml

- **Solution du borate**

KCl et H ₂ BO ₃	100ml
NaOH	11,8ml

pH à 8,2

- **Solution de caséine (1,2%)**

1,2 de caséine dilué dans 100ml du tampon borate à pH 8,2

- **Solution de TCA (30%)**

TCA.....	30g
Eau distillée.....	100ml

- **Solution de Borate**

Kcl et H ₂ BO ₃	100ml
NaOH	11,8ml

pH à 8,2

- **Solution de caséine (1,2%)**

1,2 de caséine dilué dans 100ml du tampon borate à pH 8,2

Matériel non biologique (Annexe. E)

Tableau. 11 : La liste des équipements ainsi que le matériel utilisé par nous dans la réalisation de ce travail est présentée dans le tableau suivant

Appareillages et équipements	Verreries et différents matériel
Agitateur-plaque chauffante	Bécher
Autoclave	Boîte de pétri en plastique
Bain- Marie thermostaté	Eprouvette graduée
Bec Bensen	Erlenmeyer de 100ml
Incubateur-agitateur	Flacons
pH mètre	Lames et lamelles
Réfrigérateur	Papier aluminium
Spectrophotomètre	Ependroffes
Vortex	Tubes à essai
–	Spatules
–	L'anse de platine
–	Pipette Pasteure
–	Micropipettes

