République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieure Et De La Recherche Scientifique
Université Yahia Farés De Médéa

Faculté Des Technologies

Département De Génie Des Procédés

Projet De Fin D'étude

Préparé Pour L'obtention Du Diplôme

De Master En Génie Des Procédés

Spécialité : Génie Des Procédés De L'environnement

THEME

Valorisation des rejets de l'industrie laitière dans l'isolement et l'identification de nouvelles souches productrices d'hydrolase

Préparé et présenté par

LAIDANI Khadidja

SELLAM Aicha

Proposé et dirigé par :

Dr. BENKIAR Amina

Année universitaire 2019-2020

Remerciement

Il est primordial de remercier

« ALLAH »

Le Tout-Puissant de tout ce qu'il nous apporté

dans la vie et de nous avoir donné la force et le courage pour réaliser ce travail.

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profonde gratitude

et nos sincères remerciements à notre encadreur, ***Dr BENKIAR Amina***

pour son savoir-faire, ses conseils, sa compétence, sa patience, son enthousiasme

et l'attention particulière avec laquelle elle a suivie et diriger ce travail.

NOUS vifs remerciements vont également à ***Monsieur***

BOUKHALFA Mohamed

NOUS voudrions également lui témoigner NOUS gratitude pour

Sa patience Et son soutien qui NOUS avons

été précieux afin de mener NOUS travail à bon Port.

Un grand merci pour tous ceux qui ont participé de près

de loin à la réalisation

De ce mémoire

Dédicace

Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant, pour
avoir guidé mes pas versun avenir inchaallah
prometteur, où le travail, la persévérance et la quête du
savoir seront ma devise

Je dédie ce travail à mes chers parents que j'aime tant
sans lesquels je ne serai jamais arrivée là où j'en sui

A mes frères et mes charmantes soeurs et toute ma famille
dont le soutien et les encouragements m'ont étésalutaires

A tous mes collègues de promotion
A mon cher binôme AICHA
A tous ceux que j'aime

Et à mon encadreur BENKIAR Amina

Et enfin à toute la famille laidani

KHADIDJA .

Dédicace

Je dédie ce travail….

A mes très chers parents Aucun mot, aucune dédicace

ne serait exprimer à leurs juste valeur, l'ampleur de l'affection et de l'admiration que j'éprouve pour eux

A ma très chère sœur et mes chers frères

A mes petits neveux et nièces IMAD FADI ADEM YASSIN MOHAMED MALAK ISSRAE TASSNIM

A mon cher binôme KHADIDJA pour son entente et sa sympathie

A toute la famille

A toutes mes amies pour leurs encouragements NOURA RATIBA NADJAT HOUDA

Et enfin à mon encadreur Mme BENKIAR Amina

Sans oublier Mon cousin et mon frère Mohamed BOUKHALFA

et sa famille ; leur souhaite une vie pleine de santé et de joie.

AICHA

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Introduction générale

Introduction générale…… 01

Etude bibliographique

I.1 Introduction…… 03

I.2. Définition des enzymes…….. 03

I.3. Structure de l'enzyme…… 04

I.4. Réactivité…… 05

I.5. Nomenclature et classification des enzymes…… 07

I.5.1. Enzymes d'oxydoréduction…….. 07

I.5.2.Transférases……..…….. 07

I.5.3. Hydrolases……...…….. 08

I.5.4. Lyases ou Synthétases……...…… 08

I.5.5. Isomérases……...……. 08

I.5.6. Ligases……..…… 08

I.6. Origines des enzymes…….. 09

I.6.1. Origine végétale…… 09

I.6.2. Origine animale…… 09

I.6.3. Origine microbienne…… 09

I.7. Marché en enzymes……. 10

I.8. Propriétés des enzymes…… 11

I.8.1. Réaction enzymatique…… 11
I.8.2. Dénaturation des enzymes……. 12
I.8.3. Activité enzymatique……..… 12
I.9. Les protéases…… 15
I.9.1. Classification des protéases…… 16
I.9.1.1. Les exoprotéases……. 16
I.9.1.2. Les endoprotéases…… 16
I.9.2. Origines des protéases …….. 18
I.9.2.1. Origine végétale …… 18
I.9.2.2. Origine animale…….. 19
I.9.2.3. Protéases produites par microorganismes……..…… 20
I.9.3. Les protéases alcalines…….. 21
I.9.4. Applications des protéases……. 21
I.9.4.1. Industrie alimentaire ……..... 22
I.9.4.2. Domaine pharmaceutique et médical……. 22
I.9.4.3. Tanneries…….. 23
I.9.4.4. Détergents…… 23
I.9.4.5. Traitement des eaux……. 24
I.10. Conclusion……. 25

Matériels et méthodes

II.1. Introduction …….. 26
II.2. Matériels et méthodes…… 26
II.2.1. Matériel biologique……. 26
II.2.2. Verreries et petites matériels……... 26
II.2.3. Produits et réactifs……... 27
II.2.4. Milieux de culture……... 27
II.2.5.Méthodes utilisées ……. 28
II.2.5.1. caractérisation environnementale de lactosérum……. 28
II.2.5.1. Isolement des souches bactériennes protéolytiques ……..…. 30
II.2.5.2. Test d'identification rapide de la souche protéolytique…….……. 30
II.2.5.3. Conservation des souches bactériennes …… … 31
II.2.5.4. Cinétique de croissance…….…. 31

II.2.5.5. Identification de la souche bactérienne……...… 31
a. Historique…….…… 31
b. . Principe de la spectrométrie de type MALDI-TOF……...… 32
c. Application de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans l'identification des microorganismes…….…… 33
II.4. Conclusion ……..……. 33

Résultats et discussions

III.1. Introduction …….……..…… 34
II.2. Caractérisation environnementale de lactosérum……. 34
III.3. Isolements des souches bactériennes protéolytiques…… 35
III.4. Test qualitative de l'activité protéolytique……... 37
III.5. Cinétique de croissance……. 38
III.6. Identification de la souche isolée……..……... 40
III.7. Conclusion…… 41

Conclusion générale

Conclusion générale…….. 42
Annexe…… 44
Références et bibliographie

Liste des figures

Figure I.1: Diagramme de comparaison entre l'énergie d'activation d'une réaction métabolique avec et sans catalyseur (enzyme)…….…….. 04

Figure I.2: Formation de complexe enzyme-substrat (réaction enzymatique Dans le cas d'holoenzyme)…….. 06

Figure I.3: Formation de complexe enzyme-substrat (réaction enzymatique dans le cas d'hétéroenzyme)…….…. 06

Figure I.4: Distribution des ventes des enzymes…… 11

Figure I.5: Réaction enzymatique ……..…….. 12

Figure I.6: Effet de la température sur l'activité enzymatique……..... 13

Figure I.7: Variation de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du pH ..…. 14

Figure I.8: Influence de la concentration du substrat sur la vitesse d'une réaction enzymatique…….…. 15

Figure II.1: Principe de la spectrométrie de type MALDI-TOF…… 32

Figure III.1: Dilutions et ensemencement……..…… 36

Figure III.2: Résultat de la croissance de la souche protéolytique sur un GNL successivement à 30 et 37°C…….…..….. 36

Figure III.3: Isolement et l'incubation de la souche protéolytique à des températures différentes …… 37

Figure III.4: Aspect d'halo produit par la souche protéolytique sur GNL……. . 37

Figure III.5: Profils de croissance de la souche en culture sur milieu liquide à pH=10…….. 39

Liste des tableaux

Tableau III.1: Caractéristiques de lactosérum……..……..... 34

Tableau III.2: Résultats de test qualitatif…….…… 37

Tableau .III.3: Résultats de test d'identification par MALDI-TOF……..... 39

Liste des abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique
- ATP : Adénosine Triphosphate
- CRAPC : Centre de Recherche scientifique et technique d'Analyse Physico-chimiques
- °D : degré dornic
- Dc : Diamètre de colonie
- Dh : Diamètre d'halo
- Do : Densité optique
- E : Enzyme
- E_1, E_2 : Energie d'activation
- (E.C) : Enzyme Commission
- (ES) : Enzyme-Substrat
- GNL : Gélose nutritive au lait
- LB : Luirat-Bertani
- LF : Lethhal factor (Facteur létal)
- MALDI-TOF/MS : Matrix assisted laser desorption ionization – Time of Flight / mass spectrometry
- MES : Matière En Suspension
- MRPK : Mitogen activated protein kinases
- NaCl : Chlorure de sodium
- NaOH : L'hydroxyde de sodium
- PH : Potentiel d'Hydrogène
- Rpm : Tour par minute
- S : Substrat
- UI : unité international

Résumé

Les protéases sont le groupe le plus important d'enzymes industrielles qui représentent environ 60% des enzymes totales sur le marché mondial. Parmi les différentes protéases, les protéases alcalines produites par les micro-organismes sont d'intérêt principal d'un point de vue biotechnologique. Le but de notre travail est de valoriser le lactosérum, qui est le produit restant après la coagulation de lait pour la préparation des fromages, dans la recherche de nouvelles souches bactériennes productrices de protéase et la mise en évidence de leurs pouvoir protéolytique dans une application industrielle notamment la coagulation de lait comme un agent substitut de présure animale. Le travail est basé sur l'isolement et l'identification de la souche qui s'avère du genre ***Aeromonas Bestiarm.***

Mots clés : Hydrolase, Protéase alcaline, *Aeromonas Bestiarm***,** Application biotechnologique.

ملخـص

البروتياز هو أكبر مجموعة من الإنزيمات الصناعية التي تمثل حوالي 60٪ من إجمالي الإنزيمات في السوق العالمية. من بين أنواع البروتياز المختلفة ، تعتبر البروتياز القلوية التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة ذات أهمية أساسية من وجهة نظر التكنولوجيا الحيوية. الهدف من عملنا هو تعزيز مصل اللبن ، وهو المنتج الذي يبقى بعد تخثر الحليب لتحضير الجبن ، في البحث عن سلالات بكتيرية جديدة تنتج البروتياز وإثبات قوتها التحليلية للبروتين في التطبيقات الصناعية ، ولا سيما تخثر الحليب كبديل عن المنفحة الحيوانية. يعتمد العمل على العزلة و تحديد السلالة الذي تبين أنها من نوع Aeromonas Bestiarm

الكلمات المفتاحية : هيدرولاز، البروتياز القلوي ، *Aeromonas Bestiarum* ، تطبيق التكنولوجيا الحيوية

Abstract

Proteases are the largest group of industrial enzymes which account for around 60% of total enzymes on the world market. Among the various proteases, alkaline proteases produced by microorganisms are of primary interest from a biotechnological point of view. The goal of our work is to promote whey, which is the product that remains after the coagulation of milk for the preparation of cheeses, in the search for new bacterial strains producing protease and the demonstration of their proteolytic power in a industrial application, in particular the coagulation of milk as a substitute for animal rennet. The work is based on isolation and identification of the strain turns out to be from the genus ***Aeromonas Bestiarm*.**

Keywords: Hydrolase, Alkaline protease, *Aeromonas Bestiarum*, Biotechnological application.

Introduction générale

Introduction générale

La coagulation du lait joue un rôle déterminant dans la technologie fromagère. Elle est réalisée en vue d'exploiter une propriété particulière des gels lactés qui est de s'égoutter spontanément. Cette évolution se traduit par la séparation progressive de la majorité de l'eau constitutive du lait sous forme de lactosérum et d'un substrat semi-solide (le caillé) constituant le fromage sous l'action d'un agent coagulant.

La présure de veau est l'agent coagulant le plus utilisé pour la coagulation du lait. C'est l'extrait de la caillette de veau non sevré, de la quatrième poche de l'estomac des jeunes ruminants nourris exclusivement au lait. Bien que la présure soit encore l'enzyme coagulante la plus utilisée en fromagerie, sa production connaît une pénurie mondiale croissante. Cette pénurie est due essentiellement à une augmentation croissante de la production et la consommation du fromage, et l'impossibilité d'augmenter en parallèle la production de présure. Cette pénurie a provoqué des fluctuations très importantes de son prix [1]. Cette dernière a encouragé la recherche de substituts de différentes origines : animale, végétale ou microbienne.

D'autre part, nous assistons à la production de quantités importantes de lactosérum par les industries fromagères, ce qui engendre de nombreux problèmes économiques et écologiques. D'un coté, son transport et son recyclage reviennent chers, d'un autre coté, son rejet dans la nature provoque la pollution de l'environnement.

En effet, sa richesse en lactose, en protéines solubles et en sels minéraux a incité plusieurs laboratoires à tenter de valoriser le lactosérum en l'utilisant comme un substrat de production de différents produits par exemple: levures de boulangerie [2], acide lactique [3] et le plus important est son utilisation comme un milieu de culture à moindre cout, il permet en particulier la production de protéases [4].

Parmi les voies de substitution de la présure, la production d'enzymes coagulant le lait à partir de la culture microbienne, suscite un intérêt pour la fromagerie locale et dans le monde où plusieurs souches de microorganismes font l'objet de productions industrielles de protéases coagulantes.

Aujourd'hui, les protéases figurent parmi les enzymes hydrolytiques les plus importantes et les plus largement étudiées depuis l'avènement de l'enzymologie. Ces enzymes catalysent des réactions d'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines et des peptides [5].

Le travail présent rassemble trois chapitres :

- Le premier chapitre réservé à la synthèse bibliographique, elle rapporte des généralités sur : les enzymes en général, les protéases en particulier et leurs propriétés, structures, classification et leurs applications industrielles.
- Le deuxième chapitre illustre les différents matériaux et méthodes utilisés le long de ce travail expérimental relatif à l'isolement et l'identification des souches bactériennes alcalines à partir de lactosérum.
- Le troisième chapitre consacré à présenter les différents résultats obtenus à partir de l'isolement et l'identification de la souche bactérienne protéolytique la plus active. Ensuite, l'évaluation du pouvoir protéolytique de cette enzyme a l'état brut et après des étapes de purification. A la fin, la mise en évidence de ses propriétés protéolytique dans une application industrielle telque la coagulation du lait.

On termine par une conclusion générale, dans laquelle une récapitulation des résultats obtenus montrant les points les plus importants qui ressortent au terme de cette étude.

Chapitre I :

Etude bibliographique

I.1. Introduction

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 bioindustries.

I.2. Définition des enzymes

Les enzymes sont des protéines douées d'une activité biologique particulière : la capacité à catalyser des réactions biologiques. Les catalyseurs sont des outils qui permettant d'accélérer la vitesse des réactions. Ils agissent à faible concentration et son récupérés à la fin de réaction [6].

Par d'autre définition, les enzymes sont des protéines de hautes masses moléculaires (10 000 à 100 000 daltons) et sont constituées de longues chaînes d'acides aminés unis par des liens peptidiques. En effet, contrairement aux agents chimiques qu'elles tendent à remplacer, les enzymes sont très spécifiques (caractérisés par très grande sélectivité à catalyser des réactions chimiques précises).

De façon générale, la majorité des réactions enzymatiques peuvent être représentées de la façon suivante [7].

Enzyme + substrat ↔ complexe enzyme substrat ↔ produit +enzyme

Le catalyseur ou l'enzyme permet d'abaisser grandement l'énergie nécessaire pour amorcer la réaction métabolique. Sans l'enzyme, l'énergie d'activation nécessaire s'avérer trop élevée pour que la réaction se produise ce qui démontre la nécessité de l'enzyme.

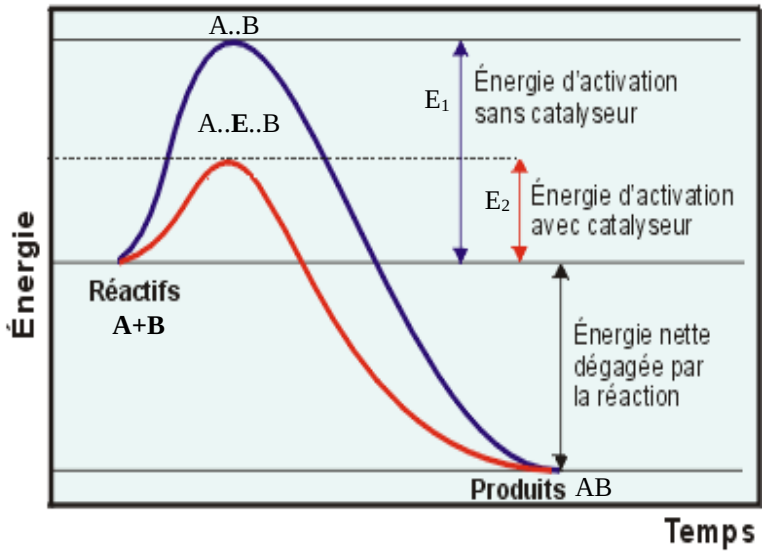


Figure I.1 : Diagramme de comparaison entre l'énergie d'activation d'une réaction métabolique avec et sans catalyseur (enzyme) [8].

Les substrats (A et B) en conditions normales, requièrent une quantité d'énergie considérable (E1) pour atteindre l'état de transition A…B à la suite du quel le produit de réaction (AB) peut se former. L'enzyme (E) crée un microenvironnement dans lequel A et B peuvent atteindre l'état de transition (A...E…B) plus facilement, réduisant ainsi la quantité d'énergie requise (E2). Comme il est plus aisé d'atteindre un niveau énergétique inférieur, la réaction peut avoir lieu plus fréquemment, ce qui se traduit par une vitesse de réaction accrue.

I.3. Structure de l'enzyme

Les enzymes sont des protéines, c'est-à-dire des polymères d'acides aminés formant de longues chaines repliées dans l'espace comportent [9] :

- Une structure primaire : séquence en acides aminés reliés entre eux par liaisons peptidiques. Cette structure correspond à un enchainement linéaire sans organisation particulière dans l'espace ;
- Une structure secondaire tridimensionnelle (structure spatiale) comportant plusieurs niveaux d'organisation qui permettent d'obtenir la protéine repliées ;
- Une structure tertiaire : définitivement repliée correspond à l'état natif, la protéine à une forme compacte (protéine globulaire) stabilisée par de nombreuses liaisons

(hydrogènes, ioniques, hydrophobes, pont disulfures…), cette forme permet l'activité enzymatique ;

- Une structure quaternaire : une organisation supplémentaire distinguée pour certains enzymes.

Toutes les enzymes comportent un site actif qui prend en charge le substrat : le site actif correspond à l'ensemble des acides aminés qui rentrent en contact avec le substrat à transformer. Il s'agit généralement d'une petite zone de l'enzyme qui subdivisée en deux parties [9]:

a. Un site de fixation / reconnaissance :

Cette partie reconnait le substrat et le maintien bien positionné grâce à des liaisons faibles qui s'établissement entre le substrat et les acides aminés. Le rôle du site de fixation est double :

- Il est complémentaire de substrat (chimiquement et géométriquement) et permet donc de stabiliser le substrat dans le site actif ;
- Il permet de mettre la partie de la molécule de substrat qui devra être transformée avec les acides aminés du site catalytique. Lorsque le substrat et fixé au sein de site actif on aura le complexe enzyme-substrat (complexe ES).

b. Un site catalytique :

Cette partie correspond à un ensemble d'acides aminés dont les chaines latérales exposées dans le site actif sont chimiquement très réactif, elles comportent des électrons qui vont attaquer des liaisons dans la molécule de substrat pour la fragiliser et faciliter sa transformation en produit.

I.4. Réactivité

La caractéristique importante des enzymes est leur grande sélectivité à catalyser des réactions chimiques précises. En effet, l'enzyme agit sur le substrat en formant avec lui un complexe intermédiaire ES]. Ceci provoque des déplacements électroniques dans le substrat permettant le déclanchement de la réaction. Par contre, tout agent chimique susceptible de fixer sur les acides aminés du site actif bloque cette réaction et inhibe l'enzyme. [10]:

Il existe deux catégories d'enzyme :

- Les enzymes purement protéique (constituées que d'acides aminés), sont appelées holoenzymes ou holoprotéines.

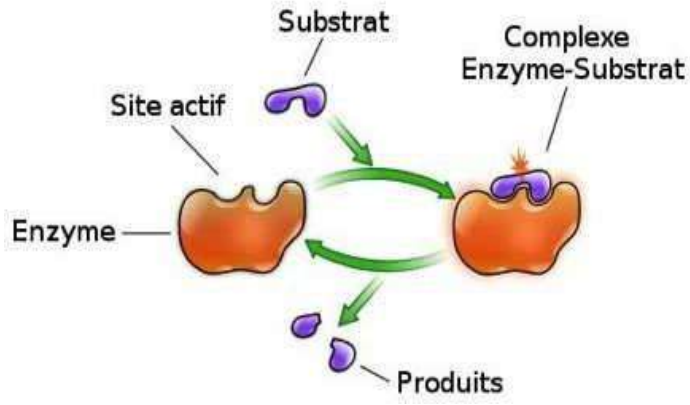


Figure I.2 : Formation de complexe enzyme-substrat (réaction enzymatique Dans le cas d'holoenzyme) [11]

- Les enzymes à deux parties : une partie protéique (l'apoenzyme) et une partie non protéique (le cofacteur : Mg^{2+}, Zn^{2}…), sont appelées hétéroenzymes ou hétéroprotéines.

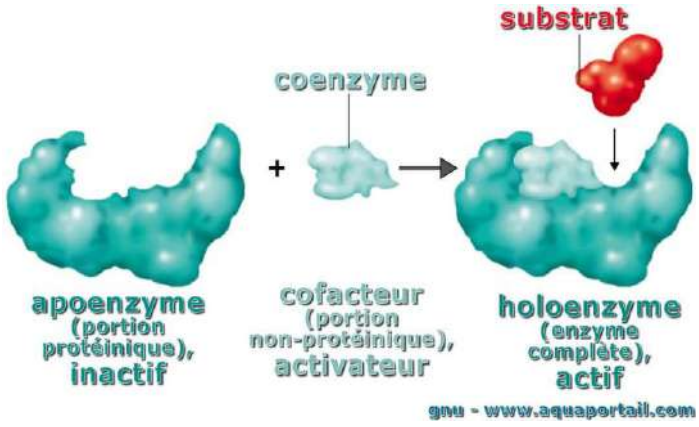


Figure I .3 : Formation de complexe enzyme-substrat (réaction enzymatique dans le cas d'hétéroenzyme) [12].

I.5. Nomenclature et classification des enzymes

Depuis 1961, l'union internationale de biochimie a codifié la nomenclature et la classification des enzymes sous une nomenclature dite officielle [13].

La version actuelle est la sixième, a été publiée par l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire en 1992 et contient 3196 enzymes différentes.

Les enzymes sont nommées en fonction du nom du substrat puis celui de la réaction catalysée avec le suffixe "ase". Cette dénomination n'apporte pas toutes les informations pour définir l'enzyme, donc il existe une classification internationale : la classification EC (enzyme commission), comporte 6 classes principales toutes numérotées :

I.5.1. Enzymes d'oxydoréduction (E.C.1)

Les réactions de transfert des électrons ou d'atome d'hydrogène, en biochimie, les oxydoréductases sont des enzymes catalysant les réactions d'oxydoréduction en transférant les ions H^+ et les électrons, généralement elles sont associées à des coenzymes d'oxydoréduction. Ces enzymes sons connues en tant que : déshydrogénases ou hydrogénases [14]:

I.5.2. Transférases (E.C.2)

Sont des enzymes qui catalysent le transfert des radicaux (groupements phosphates, amines, méthyles, etc.) d'une molécule (donneur) à une autre acceptrice. Il existe de nombreux types de transférases (méthyltransférases, glycosyltransférases, phosphatransférases, …) en fonction du type de groupement qu'elles transfèrent. Les transférases portent un nom qui leur est fourni par les noms du donneur, de l'accepteur et du groupe transféré par exemple : une ADN méthyltranférases est une transférase qui catalyse le transfert d'un groupement méthyle sur l'ADN [15].

I.5.3. Hydrolases (E.C. 3)

Les hydrolases sont des enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyses des molécules, elles utilisent une molécule d'eau pour leurs réactions. On rencontre les hydrolyses dans les lysosomes des cellules et ne nécessitent pas des coenzymes.

Il existe plusieurs types d'hydrolases en fonction du type de liaisons covalente qu'elles hydrolysent et portent généralement le nom du substrat par exemple [16]:

- *Les estérases* : coupent les liaisons ester (R-CO-O~R') ;
- *Les protéases* : coupent les liaisons peptidiques ;
- *Les phosphatases* : coupent les liaisons impliquant un phosphate.

I.5.4.Lyases ou synthéases (E.C.4)

Les lyases catalysent la cassure de liaisons covalentes, grâce à d'autres moyens que l'hydrolase ou l'oxydation. Elles forment ainsi souvent des doubles liaisons ou des molécules cycliques.

Il existe de nombreux type de lyases en fonction du type de liaisons qu'elles catalysent et du substrat qu'elles ciblent donc des rôles dans nombreux processus cellulaire, par exemple : l'une des plus connues est l'adénylate cyclase, l'enzyme qui forme l'AMP cyclique à partir d'ATP [17].

I.5.5. Isomérases (E.C.5)

Elles catalysent les réactions de réarrangement des groupements fonctionnels sur la même molécule. Il existe de nombreux types d'isomérases en fonction du type de réaction qu'elles catalysent (des racémases, des cis-trans isomérases, etc.) [18].

I.5.6. Ligases (E.C.6)

Ce sont des enzymes qui catalysent la formation des liaisons (carbone-carbone, carbone-azote, carbone-souffre…). Elles utilisent généralement l'énergie d'une molécule d'ATP pour catalyser la réaction, par exemple : Les ADN ligases qui assemblent deux morceaux d'ADN ensemble [19].

I.6. Origine des enzymes

Les tissus végétaux et les organes animaux étaient la source les plus importantes des enzymes au début de la biotechnologie des enzymes. En 1960 environ 70 des enzymes étaient extraites à partir des tissus des végétaux et les organes animaux. Vingt ans après, la situation s'était inversée et la plus part des enzymes industrielles ont été produites à partir de sources microbiennes (Bactéries, Levures et les Champignons) [20].

I.6.1. Origine végétale

Généralement les végétaux contiennent des enzymes dans leurs organes verts (jeunes tiges, bourgeons, feuilles) et dans les fleurs. Ces plantes s'utilisent principalement fraîches. Mais la majorité des pays de monde ont des saisons assez variables, les changements de température ne permettant pas une production stable durant toute l'année. Les cardosines les cyprosines et cenprosines sont des protéases acides à activité coagulante sur le lait ; elles sont extraites des fleurs de chardons et très utilisées pour la production traditionnelle des fromages en Espagne [21].

I.6.2. Origine animale

Il est plus utile de produire des enzymes à partir des cellules animales, mais la culture de ces cellules est très complexes et elles ne se fait généralement qu'en petites quantités. Les cellules animales aussi sont très longues à faire croitre et les conditions de culture sont très couteuses. Parmi les enzymes d'origine animale qui peuvent être utilisée pour faire coaguler le lait : la pepsine bovine, chymosine, pepsine de l'estomac du poisson [22].

I.6.3 Origine microbienne

Les enzymes microbiennes sont produites par une grande variété de bactéries dont, les actinomycètes, de moisissures et de levures. Elles représentent 40**%** des enzymes du marché mondial [23]. Parmi les enzymes microbiennes : la α-amylase, cellulase, penicillineacylase, protéase, lactase, pullulanase, …etc.

Les enzymes microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toute les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles. Cependant, les enzymes d'origine microbienne présentent des avantages qui justifient leurs utilisations en industrie [24]:

- Elles remplacent les catalyseurs chimiques dans nombreux procédés de production de produits à valeurs ajoutée à cause de leur efficacité, leur précision, leur spécificité, et leurs aspects pratiques et économiques ;
- Une production indépendante des contraintes saisonnières et religieuse ;
- Production continue d'enzyme en réacteur ;
- Culture rapide avec un bon rendement pouvant être augmenté par l'amélioration génétique des souches, la maitrise et l'optimisation des conditions de fermentation par l'induction de la production d'enzyme, utilisation de milieux de culture de faible coût ;
- Méthodes de purification modernes telle que la chromatographie par affinité, par échange d'ions et la précipitation ;
- Développement de procédés pour l'immobilisation et la réutilisation des enzymes, la proportion du coût relié aux enzymes devient alors minime dans certains procédés.

I.7. Marché des enzymes

Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité conserve une forte croissance. Estimé et a été évalué à 4,2 milliards de dollars en 2014 et devrait atteindre les 6,2 milliards de dollars d'ici 2020.

Parmi les enzymes industrielles, les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes, soit environ 60% [25, 26]: (figure.4). Les ventes industrielles des protéases sont estimées à plus de 350 millions US$ annuellement [27]:

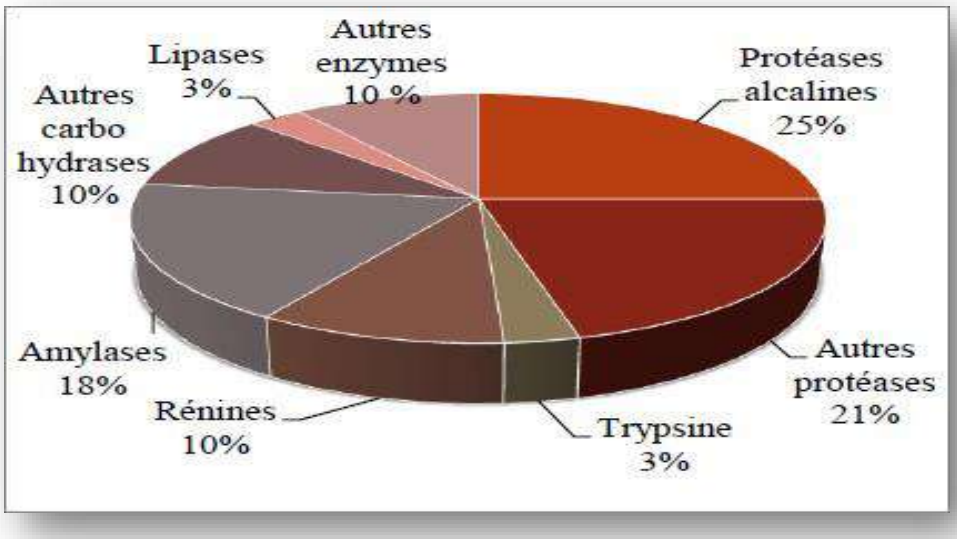


Figure I.4 : Distribution des ventes des enzymes [28]

I.8. Propriétés des enzymes

Les enzymes agissent comme catalyseurs de plusieurs réactions chimiques. Une caractéristique importante des enzymes est leur très grande sélectivité à catalyser des réactions chimiques précises. Elles comportent des sites actifs, endroit où la réaction enzymatique se produit. En effet, contrairement aux agents chimiques qu'elles tendent à remplacer, les enzymes sont [29]:

- ❖ Très spécifiques : c'est-à-dire elles peuvent catalyser qu'une réaction chimique bien précise ;
- ❖ Agit à très faible concentration et récupérable à la fin de la réaction ;
- ❖ Augmente considérablement la vitesse des réactions chimiques en diminuant l'énergie d'activation.

I.8.1. Réaction enzymatique

C'est une réaction chimique ou biochimique catalysée par une enzyme. Elle se déroule en deux étapes :

a. Formation du complexe enzyme-substrat (ES) ;

b. Catalyse : succession de réaction intermédiaire permettant la transformation du substrat en produit.

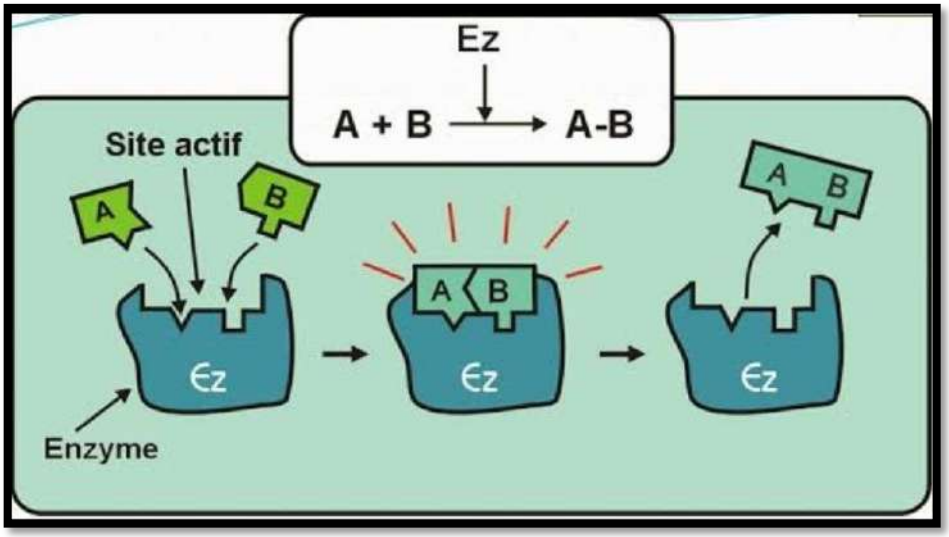


Figure I.5 : Réaction enzymatique [30].

La fixation du substrat est plus ou moins spécifique suivant l'enzyme, la reconnaissance s'effectue selon la conformation et la composition chimique du substrat.

I.8.2. Dénaturation des enzymes

La dénaturation est le changement de la forme tridimensionnelle de la protéine et comme l'enzyme est de nature protéique donc elle quitte l'état natif, elle se déroule ou déplie et perdre ses structure quaternaire, tertiaires et secondaires. Son activité est alors souvent atténuée voire annulée.

La dénaturation est due à la sensibilité des protéines en fonction de leur environnement physico-chimique.

I.8.3. Activité enzymatique

L'activité enzymatique correspond à la vitesse de la réaction qu'une enzyme est capable de catalyser. Elle est mesurée à partir de la quantité de produit constitué ou de réactif disparu par unité de temps. L'affinité de l'enzyme pour son substrat est donnée par la constante de Michaelis Menten. Elle exprimée en UI (unités internationales : 1 UI= 1mole de substrat consommée par minute). Cette activité peut être influencée par plusieurs facteurs dont [31] :

a. La température

La température optimale de catalyse est la température pour laquelle la vitesse de la réaction catalysée est maximale. Elle varie selon l'enzyme considérée, mais elle est caractéristique d'une enzyme donnée.

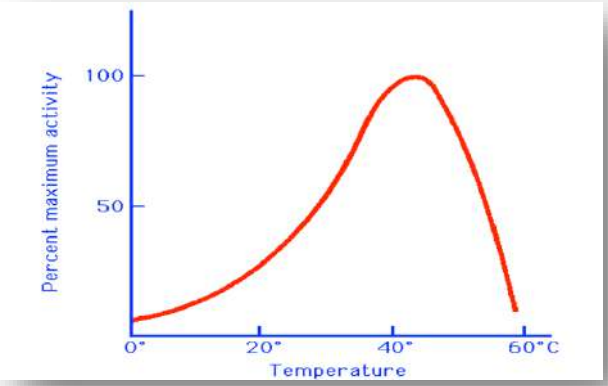


Figure I.6 : Effet de la température sur l'activité enzymatique [32]

A des températures élevées, la perte de fonction catalytique est irréversible : même si l'enzyme est replacée dans des conditions optimales de température, l'enzyme ne trouve pas son aptitude à catalyser la réaction.

b. pH

Les enzymes sont des protéines constituées d'acide aminées pouvant porter des fonctions chimiques sensibles aux variations de pH. Ces fonctions chimiques peuvent se protonner ou se déprotonner selon le pH de milieu dans lequel se trouve l'enzyme. Les enzymes auront par conséquent des pH optimaux différents, selon leur structure et la nature de leur site actif. La pepsine par exemple à un pH optimal de 1.5, approprie pour une enzyme gastrique ; la trypsine intestinale a plutôt un pH optimal de 7.7 [33].

La courbe représentant la vitesse de la réaction (ou activité) en fonction de pH de trypsine intestinale :

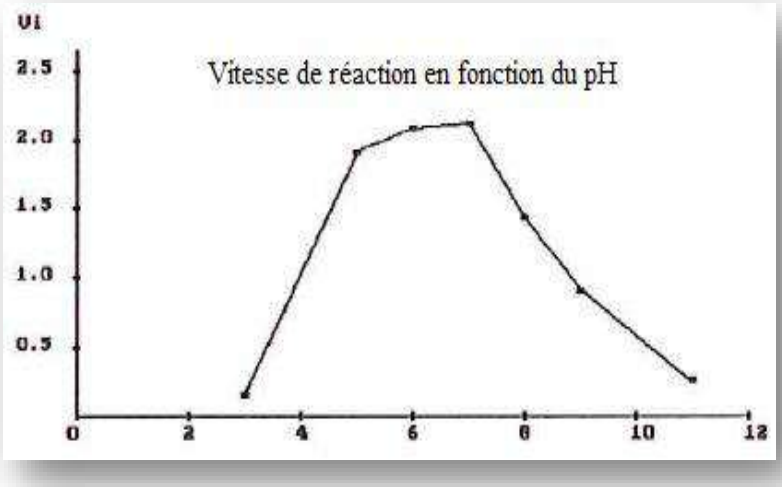


Figure I .7 : Variation de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du pH [34].

c. Concentration en enzyme

Les mesures de la concentration du produit en fonction du temps sont différentes pour chacune des concentrations de substrat essayées. Quand La concentration d'enzyme est grande la vitesse initiale est grande et vis versa [35].

d. Concentration en substrat

Les mesures de la concentration du produit en fonction du temps sont différentes pour chacune des concentrations de substrat essayées. Lorsque la concentration du substrat est grande (par exemple S3) la vitesse initiale est plus grande que la concentration en substrat dans S1 (voir figure I .8). On peut mesurer ces vitesses initiales en calculant la différence de concentration de produit au cours d'un temps donné, pour chaque concentration du substrat [36].

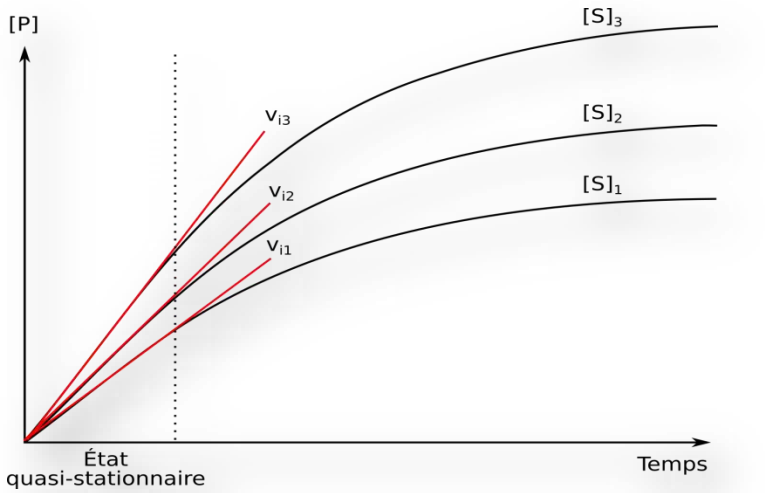


Figure I .8. Influence de la concentration du substrat sur la vitesse d'une réaction enzymatique [36].

I.9. Les protéases

Les protéases ou protéinases sont des enzymes protéolytiques font partie de la classe des hydrolases (EC3). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines par rupture d'une ou de plusieurs liaisons peptidiques qui lie deux acides aminés dans une chaine peptidique.

Les protéases sont divisées en deux groupes majeurs :

- Les protéases Extracellulaire : ce sont des protéases qui catalysent l'hydrolyse des protéines en petites peptides facilement par les cellules.
- Les protéases Intracellulaire : ces enzymes jouent un rôle essentiel dans régulation des processus cellulaires et métabolique [37].

Les protéases sont variées et ont des rôles biologiques bien différents. Leurs structures sont donc aussi très variées. Toutefois, elles possèdent toutes comme les enzymes en général, un site actif qui assure l'activité d'hydrolyse des liaisons peptidiques, et un site de reconnaissance du substrat pour n'agir que sur la protéine cible [38].

I.9.1 Classification des protéases

Il existe deux groupes de protéase : les endoprotéases qui hydrolysent une liaison peptidique interne et les exoprotéases qui éliminent un ou deux acides aminés en N-terminal ou C-terminal de la protéine.

I.9.1.1. Les exoprotéases

Les exoprotéases agit uniquement à proximité des extrémités de chaines polypeptidiques à l'extrémité C-terminal ou N-terminal. Ceux qui agissent à une extrémité libre N libèrent un seul acide aminé résiduel (Aminopeptidases), un peptide (dipeptdyle-peptidases) ou un tripeptide (tripepeptidyl-peptidases). Les exoprotéases agissent à un carbone terminal libre libèrent un seul acide aminé (carboxyle peptidases) ou un dipeptide (peptidyl-dipeptidases). Certains exoprotéases sont spécifiques à des dipeptidases ou enlever les résidus terminaux.

I.9.1.2. Les endoprotéases

Les endoprotéases sont les enzymes les plus utilisées en industrie, elles sont caractérisées par leur action hydrolytique à un site spécifique de la chaine polypeptidique loin des extrémités N-terminal et C-terminal. La présence d'un groupement amino ou carboxyl libre peut avoir un effet répresseur sur l'activité de ces protéases.

Les endopeptidases sont divisées en six classes selon leur mécanisme catalytique : les protéases à sérines, les protéases à cystéines, les protéases aspartiques et les métalloprotéases [39].

a. Les protéases à sérine

Les membres de ce groupe présentent un site actif déterminé par trois résidus, comprenant de la sérine, un aspartate et une histidine. Les endoprotéases à sérine contiennent de nombreuses protéases de mammifères comme la chymotrypsine, la trypsine, la thrombine, l'élastase pancréatique ou encore les granzymes des cellules cytotoxiques. Celles-ci appartiennent à la famille S1, l'une des deux plus importantes parmi les protéases à sérine. Le second est la famille S8, formée en majorité par les endoprotéases à sérine de

type subtilisine (subtilisine-like) ou subtilase, et que certains auteurs considèrent comme un clan constitué de 6 familles [40].

b. Protéases à cystéines

Sont largement représentées tant dans le monde animal que végétale ainsi que chez les microorganismes ou elles sont impliquées dans de nombreux processus protéolytiques intra ou extracellulaires. On distingue actuellement au minimum vingt six familles distinctes de protéases à cystéine [41]. Dont la plus grande et la plus connue est sans doute celle de la papaïne.

La triade catalytique est dans ce cas formée de trois résidus (cystéine, histidine et asparagine), le résidu cystéine constituant le groupement nucléophile.

c. Les protéases aspartiques ou acides

Les protéases d'acide aspartique, généralement connues sous le nom de protéases acides, sont les endoprotéases qui dépendent des résidus d'acide aspartique pour leur activité catalytique. Des protéases acides ont été groupées dans trois familles, à savoir, la pepsine, le retropepsine et les enzymes des paras rétrovirus. [42]. La plupart des protéases aspartiques montrent l'activité maximale à PH faible (pH 3 à 4) et ont les points isoélectriques dans la gamme du pH 3 à 4.5. Les protéases peuvent être aussi classées selon la gamme de pH dans laquelle leur activité est optimale, en protéases acides neutres et alcalines [43].

d. Les métalloprotéases

L'activité protéolytique de ces enzymes dépend d'un ion métallique, souvent le zinc. L'ion zinc en question est lié à deux résidus histidine, ainsi qu'à un résidu glutamate. On trouve notamment parmi les métalloprotéases à zinc le facteur LF (lethhal factor) de *Bacillus anthracis*, qui clive des enzymes de la famille des MRPK kinases (Mitogen activated protein kinases), impliquées dans la transduction de nombreux signaux générés par la simulation de récepteurs extracellulaires [44].

e. Protéase à thréonine

Elles ont été récemment identifiées dans le protéasome de thermoplasmaacidophilum ou celui de methanoarchaeon methanos arcinathermophila. La thréonine du site actif occupe l'extrémité N-terminale de l'enzyme mature [46].

f. Protéases à site actif non identifié

Les résidus formant le site actif de certaines protéases restent encore non identifies [45].

I.9.2. Origines des protéases

Les protéases sont extraites aussi bien des plantes que des animaux ou des microorganismes [46].

I.9.2.1 Protéases d'origine végétale

Les enzymes d'origine végétale et spécialement les protéases sont par ordre décroissante en technologie, la papaïne, la bromélaine, la kiratinases et la ficine représentent quelques une des protéases bien connues d'origine végétale [47].

a. La papaïne

En provenance du latex de fruit Carica papaya qui se développe dans les régions subtropicales de l'ouest et le centre d'Afrique, ainsi en inde. La papaïne est une protéase à cystéine présente une activité optimale à une température de 65°C, elle est stable jusqu'à 90°C en présence de son substrat.

Elle est largement utilisée dans l'industrie pour la préparation des hydrolysats de protéines très solubles et aromatisés et l'attendrissement de la viande [48].

b. La bromélaine

La bromélaine ou broméline est une protéase à cystéine extraite à partir de l'ananas (ananas comosus). Elle est moins thermostable que la papaïne et s'inactive à partir de 70°C. Cette enzyme est beaucoup utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour attendrir la viande et en médecine pour accélérer la cicatrisation post-opératoire ou la phlébite et la sinusite [49].

c. Les kiratinases

Sont produites par cartains groupes botaniques des 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.

d. La ficine

Elle appartient à la classe des protéases à cystéine, elle est extraite du latex des fruits d'une plante tropicale (la figue) [50].

I.9.2.2. Protéases d'origine animale

La plus part des protéases d'origine animales sont pancréatiques. En effet, elles ont la propriété de dégrader les protéines alimentaires. Elles sont toutes synthétisées sous forme d'un précurseur qui peut s'activer de façon auto catalytique dans les conditions bien déterminés [51].

a. La pepsine

C'est une protéase acide présente dans l'estomac de presque tous les vertébrés active à un pH situé entre 1et 2. La pepsine hydrolyse les liaisons peptidiques qui se trouvent entre deux acides aminés, elle est thermosensible en solution à des températures supérieures à 55°C. Elle est aussi utilisée en brasserie et dans la préparation du fromage ou des boissons gazeuses [52].

b. La chymotrypsine

Est une protéase à sérine rencontrée dans le pancréas, elle coupe les liaisons peptidiques aux quelles participe le carboxyle des acides aminés aromatiques (phe, try, tyr). Elle fait partie de la famille des protéases à sérine, ayant toutes un site actif très similaire. Elle est synthétisée sous forme inactif par le pancréas, comme toxique, tandis qu'elle est présente sous forme actif dans l'intestin grêle.

c. La trypsine

La trypsine est une protéase à sérine, elle est la principale enzyme digestive intestinale responsable de 'hydrolyse des protéines alimentaires. Son PH optimum d'action est de 8. L'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du goût

très amer qu'elle entraîne mais elle est utilisée pour la préparation des hydrolysats de caséine (tryptone) ajoutés dans les milieux bactériologiques.

d. La chymosine

La chymosine est une endopeptidase du suc gastrique des nouveau-nés, permettant la digestion spécifique de la caséine. Elle catalyse la coupure de la caséine en un site spécifique entre une phénylalanine et une méthionine [52].

e. La rénnine

La rénnine est une protéase à aspartate produite sous forme de précurseur inactif (prorénnine) dans l'estomac de nourrissons de mammifères. C'est un constituant majeur de la présure utilisé en industrie laitière comme agent principale de caillage de lait [52].

I.9.2.3. Protéases produites par microorganismes

Les protéases microbiennes sont préférées à celle des autres sources car elles possèdent presque toute les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles. Elles sont produites par une grande variété de bactéries dont, les actinomycètes, les moisissures et les levures [53].

Les microorganismes se distinguent par la diversité biochimique, le temps de génération court, la rapidité de la culture et la facilité de les manipuler génétiquement [54]. Elles sont préférées à l'enzyme d'origine animale et végétale puisqu'elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirables pour leurs applications biotechnologiques. On distingue ainsi :

a. Protéases d'origine bactérienne

La plupart des protéases commercialisées, neutres et alcalines, sont produites par le genre *Bacillus*. Deux protéases sont très connues et sont bien caractérisées. Il s'agit de subtilisine carlsberg produite par *B. lichenformis* et utilisée dans la détergence et la subtilisine commerciale BNP produite par *B. amyloliquefaciens, B. subtilis et B. stearothermophilus* [54]. Les protéases neutres sont actives à des pH se situant aux alentours de 6 à 8, elles sont facilement thermotolérantes. Les protéases alcalines sont

hautement actives à des pH alcalins, particulièrement à pH 10 et une température de 60 °C, ce qui favorise leur incorporation dans les produits de détergence.

b. Protéases fongiques

Les champignons produisent un spectre d'hyrolases plus large que les bactéries. Par exemple : *A. oryzae* produit des protéases acides, neutres et alcalines. Les protéases fongiques acides présentent un pH optimum d'activité compris entre 4 et 4.5 et elles sont stables à des pH allant de 2.5 à 6. Ces enzymes sont particulièrement utilisées dans l'industrie fromagère.

Les protéases fongiques neutres sont des métalloprotéases actives à un pH voisin de 7. Elles sont utilisées pour renforcer l'action des protéases végétales, animales et bactériennes et réduire le goût amer des hydrolysats protéiques alimentaire. Les protéases fongiques alcalines sont aussi utilisées dans la modification des protéines alimentaires. Cependant, ces protéases ont un rendement réactionnel et une thermotolérance plus faible que les protéases bactériennes.

I.9.3. Les protéases alcalines

Les microorganismes suivent une voie de distribution basée sur la dépendance au pH pour atteindre une croissance maximal. La majorité d'entre eux sont connus pour se développer aux voisinages de valeurs de pH proches de la neutralité. Lorsque le pH n'est pas proche de la neutralité, la croissance de beaucoup de microorganismes se trouve affectée.

Les bactéries alcalophiles isolés pour divers applications industrielles, il a été montré que des souches de genre *Bacillus* étaient prédominantes et considérées comme une source de production de protéases alcalines.

Plusieurs champignons ont aussi été caractérisés pour la production de protéases alcalines dont principalement le groupe des *Aspergilus* [55].

I.9.4. Applications des protéases

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Cette section trace donc un portait des principaux secteurs industriels employant des protéases.

I.9.4.1 industrie alimentaire

a. Préparation du fromage

L'industrie fromagère emploie une quantité importante de protéases [56]. Les plus utilisées sont surtout des protéases acides. 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 tuer les veaux aussi jeunes, elle tend à être remplacée par des protéases microbiennes.

b. Boulangerie

La farine de blé est grandement utilisée en boulangerie. Cette farine contient du gluten, une protéine insoluble qui est responsable des propriétés de a pate. Les protéases de *Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten, à un degré plus ou moins important, selon les caractéristiques désirées de la pate. Le traitement de la pate facilite sa manipulation et permet la production d'une grande variété de produits. Egalement, des protéases d'origine bactérienne sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pate [56].

c. 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 le jus et boissons fruitées et dans la formulation d'aliments diététiques [56].

I.9.4.2 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 aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau des systèmes digestifs.

Egalement, des collagénases provenant de *clostridium sp*. ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement de brulures et de plaies. Une élastotérase provenant de *B.subtilis* peut être utilisés pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes [57]. Enfin, une asparaginase provenant de *E. coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients de certains formes de leucémie [58].

I.9.4.3. 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. 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 *Bacillus 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 de *A. oryzae, B. amyloliquefasciens* ou *B. licheniformis*. De plus, l'amélioration des procédés et la découverte et la mise au point de nouvelles protéases plus performantes permettent l'emploie grandissant des enzymes dans cette industrie [58].

I.9.4.4. Détergences

A l'heure actuelle, l'industrie des détergents est la plus grande utilisatrice de protéases. Le marché des détergents est aujourd'hui un marché très large qui englobe les détergents pour usage domestique (détergents à lessive, détergents à vaisselle), les produits de nettoyage pour usage industriel et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant le plus important marché au niveau des détergents est de loin celui des détergents à lessive. Les protéases jouent un rôle important dans l'efficacité des détergents. Dans les procédés de lavage, la chaleur, les conditions alcalines et la présence de surfactants et d'agents séquestrant vont suffire pour dissoudre ou disperser la plupart des saletés incrustées dans les tissus. Cependant, les saletés de nature protéique ne seront pas toujours enlevées par ces traitements. De plus, les protéines toujours accrochées aux tissus seront capables de retenir, par coagulation, d'autres composés [59].

Les protéases jouent un rôle important dans l'efficacité des détergents. Dans les procédés de lavage, la chaleur, les conditions alcalines et la présence de surfactants et

d'agents séquestrant vont suffire pour suffire pour dissoudre ou disperser la plupart des saletés incrustées dans les tissus. Cependant, les saletés de nature protéique ne seront pas toujours enlevées par ces traitements. De plus, les protéines toujours accrochées aux tissus seront capable de retenir, par coagulation, d'autres composés.par exemple, des taches composées de sécrétions corporelles et qui ne sont pas visibles à l'œil nu donneront après quelques lavages des vêtements ayant une apparence terne à cause de la capacité des protéines à coaguler d'autres particules. L'utilisation d'enzymes protéolytiques permet de résoudre ce problème. Les protéases hydrolysent les protéines dissoutes et coagulées et les composés solubles qui en résultent seront facilement rincés hors tissu [60].

Aujourd'hui, les préparations d'enzymes pour les détergents sont sous formes liquides ou granulaire. Les granules sont généralement formés de façon suivant : un noyau contient les enzymes et est entouré d'une enveloppe faite souvent de cire pour réduire le risque que de la poussière soit relâchée si les granules sont soumises à l'abrasion. Le noyau contient souvent des ligands et des fibres de cellulose pour rendre les granules plus résistantes et plus flexibles. Les préparations d'enzymes liquides sont conçues pour être incorporées facilement aux détergents liquides. Elles consistent pour la plupart du temps en une solution claire d'enzyme dans un solvant fait d'eau et de propylène glycol.

Les détergents peuvent contenir des lipases, des amylases et des cellulases [61]. Les protéases sont les enzymes les plus utilisées dans les détergents, la grande majorité sont des protéases à sérines alcalines et thermophiles. En effet, les protéases doivent souvent agir à des pH et à des températures élevées, particulièrement dans le cas des détergents à lessive.

I.9.4.5. Traitement des eaux

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 [61].

I.10. Conclusion

A cause de leurs nombreuses propriétés intéressantes, les enzymes sont de plus en plus utilisées dans le monde industriel. Dans plusieurs procédés industriels, les réactions d'hydrolyse et d'oxydation sont normalement accomplies par des produits chimiques peu spécifiques qui occasionnent des pertes de rendement important et génèrent des sous-produits souvent difficiles et couteux à éliminer. Spécifiques dans leur activité et exigeant moins d'énergie de réaction, les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorer les relations couts efficacité des procédés. Egalement, les enzymes présentent de nombreux avantages au niveau environnemental : biodégradabilité, action spécifique, faible toxicité et formation de sous-produits compatible avec l'environnement [62].

Chapitre II :

Matériels et méthodes

II.1. Introduction

Dans le cadre de valorisation des rejets de l'industrie laitières et la recherche de nouvelles protéases alcalines, nous avons réalisés cette étude a fin d'isoler de nouvelles souches bactériennes productrices de protéase à partir de lactosérum qui engendre un problème majeur de rejet (eau résiduaire vu sa quantité considérable qui représente 80% de lait). Pour cela, notre travaille s'articule autour de 3 parties :

- L'isolement et l'identification de la souche bactérienne sujette de notre étude ;
- L'extraction des protéases produites par cette souche et leur purification ;
- La mise en évidence du pouvoir protéolytique de l'enzyme sécrété par cette souche dans une application industrielle précisément dans la coagulation de lait pour la fabrication des fromages.

II.2. Matériels et méthodes

II.2.1. Matériels biologiques

Comme ce travail a pour objectif la valorisation des rejets de laiteries, il nécessite un matériel biologique dont des bactéries qui ont été isolées à partir de lactosérum obtenue par action de la présure.

Le prélèvement est effectué au niveau d'une usine de fabrication de fromages (X).

II.2.2. Verreries et matériels

a) **Verrerie de laboratoire :** Erlenmeyers, Tubes à essai, Seringues, Entonnoirs Pipettes pasteurs, Verre à montre, Boites pétri, … etc.
b) **Petits matériels :** Balance, Bec bunsen, Portoirs, Agitateurs, pH mètre, … etc.
c) **Grands matériel :** Shaker, Bain marie, Autoclave, Etuve, Spectrophotomètre, Centrifugeuse, Plaques d'agitations, Microscope optique…etc.

II.2.3. Produit chimiques et réactifs

Les produits utilisés pour la préparation des solutions et milieux de cultures :

- Chlorure de sodium (NaCl) ;
- Chlorure de calcium ($CaCl_2$) ;
- Monohydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4) ;
- Potassium dihydrogénophosphate (KH_2PO_4) ;
- Sodium molybdate ($MONa_2O_4$) ;
- Chlorure de zinc ($ZnCl_2$) ;
- Chlorure de calcium di hydraté ($CaCl_2$ 2H2O) ;
- Sulfate ferreux heptahydraté ($FeSo_4$ $7H_2O$) ;
- Acide borique(H_3Bo_3).

II.2.4. Milieux de culture

a. Gélose nutritive à base de lait (GNL)

Milieu solide utilise pour mettre en évidence le pouvoir protéolytique de la souche bactérienne en hydrolysant la caséine présente dans le milieu. Il est composé de :

- Eau distillée : 750 ml ;
- Peptone : 5g ;
- L'agar : 20g ;
- Lait écrémé : 250 ml.

Le pH de ce milieu est ajusté à (7,2 ~ 7,4) par une solution de NaOH (10 N) suivi d'une stérilisation à 120 C° pendant 20 mn. Après on lui rajoute du lait écrémé pasteurisé à 114 °C pendant 15 mn.

b. Milieu Lauriat Bertani (LB)

Ce milieu est utilisé pour la pré-culture des souches bactériennes [63]. Sa composition est la suivante :

- Eau distillée : 1000 ml ;
- Extrait de levure : 5 g ;
- Peptone : 10g ;
- L'agar : 10g ;
- Na Cl : 5g.

Le pH de milieu est ajusté à 10 par NaOH (10N) puis subit une stérilisation pendant 20 mn à 120°C.

c. Bouillon nutritif

C'est un milieu liquide utilise pour l'estimation de l'activité protéolytique alcaline de souche bactérienne. Il est contient :

- Eau distillée : 1000ml ;
- Gélatine : 10g ;
- Extrait de levure : 5g ;
- Potassium dihydrogénphosphate : 1g ;
- Monohydrogénophosphate de potassium : 1g ;
- Chlorure de sodium : 5g ;
- 0,1 % d'oligoélément

d. Préparation de la solution d'oligoélément :

- $ZnCl_2$: 0,4g ;
- $FeSo_4\ 7H_2o$: 2g ;
- H_3Bo_3 : 0,065g ;
- $Mo\ Na_2O_4$: 0,135.
- Eau distillée : 1L.

Le pH de milieu est ajusté à 10 par le NaOH (10 N) puis subit une stérilisation à 120 C° pendant 20 mn.

II.2.5. Méthodes utilisées

II.2.5.1. Caractérisation environnementale de lactosérum

Une étude préliminaire a été réalisé pour caractérisé l'effluent rejetés par l'industrie laitière, pour cela on a fait appel aux méthodes suivantes :

- **pH- métrie**

  Le pH (potentiel Hydrogène) mesure la concentration en ions + H d'une solution. Il traduit ainsi la balance entre acide et base sur une échelle de 0 à 14. Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre

- **Degré d'acidité**

L'acidité représente le nombre de décigrammes d'acide lactique dans le lait

Mode opératoire :

- ✓ Remplir la burette avec la solution d'hydroxyde de sodium de concentration 1 mol/l , ajuster au niveau zéro ;
- ✓ Prélever 10 ml de lactosérum a l'aide d'une pipette jaugée de 10 ml et le verser dans le bécher de dosage, on ajoute quelque gouttes de phénolphtaléine. on introduit le barreau pour assurer une meilleure agitation ;
- ✓ Verser ml par ml le solution d'hydroxyde de sodium jusqu'à atteindre le virage (changement de couleur) de la solution ;
- ✓ On note la valeur de volume de solution NaOH versé V_B

Donc :

Le volume de NaOH versé est V_B= 5ml

V_A est le volume d'acide lactique en litre, N_A est la concentration molaire en acide lactique ($C_3H_6O_3$) :

$$V_A.N_A=V_B.N_B$$

$$N_A= \frac{VB.NB}{VA}$$

Avec la masse molaire de $C_3H_6O_3$ est : 90 g/mol donc $N_A= N_A\times 90$= g/L (°D)

- **Matière en suspension MES**

Les matières en suspension (MES) sont des matières fines minérales ou organiques insolubles visibles à l'œil nu qui contribuent à la turbidité de l'eau. Elles regroupent l'ensemble des substances non dissoutes contenues en suspension dans les solutions. Ces particules en suspension non dissoutes sont obtenues par filtration et séchage

Mode opératoire :

- ✓ on prépare d'abord un filtre circulaire et on prend son poids avant la filtration m_{f1} ;

- ✓ on place ce filtre à un système de filtration sous vide et on faire passer 100 ml de lactosérum jusqu'à tout le liquide soit passé ;
- ✓ Après la filtration nous avons pesé le filtre m_{f2} ;
- ✓ On place le filtre dans un étuve à 105°C pendant 30 mn ;
- ✓ Après le séchage pendant 30 mn on place directement le filtre dans le disque perforé un dessiccateur qui est rempli préalablement avec une quantité suffisante de gel de silice ;
- ✓ Les mêmes démarches ont été suivies chaque 30 min jusqu'à la masse de filtre soit fixée.

$$\text{MES g/l} = \frac{m \text{ filtre fixée (g)} \times volume\ filtré(l)}{1(l)}$$

II.2.5.2. Isolement des souches bactériennes protéolytiques

Cette étude est portée sur les bactéries isolées de lactosérum qui est engendré de la coagulation de lait lors de la fabrication du fromage ou de la caséine. L'isolement été réaliser en utilisant la méthode de dilutions décimales (10^{-1} jusqu'à 10^{-7}).

En suite, l'activité protéolytique des bactéries à été mise en évidence par leurs ensemencements sur une gélose nutritive au lait (GNL). Les boites ensemencées ont été incubées dans l'étuve à différentes températures (30 et 37 C°) pendant 72 h [63].

II.2.5.3. Test d'identification rapide de la souche protéolytique

Il s'agit d'un test microbiologique d'identification sur gélose nutritive au lait. Ce test qualitatif repose sur le fait que les protéases secrétées par la souche protéolytique va diffuser dans la gélose environnante et va ainsi hydrolyser les caséines du lait. L'action protéolytique de ces enzymes se traduit par un halo transparent au tour de la colonie. Le diamètre de l'halo est proportionnel à la quantité d'enzymes libérée par la bactérie. Cette méthode permet une présélection des souches les plus performantes [64].

II.2.5.4. Conservation des souches bactériennes

La conservation de ces souches nécessite un milieu approprie. Dans ce cas le milieu LB est le milieu favorable. Des tubes contenant le milieu LB solide incliné été inoculés par les bactéries et conservée à une température de 4 C° après une incubation de 24 h à une température adéquate à la souche.

II.2.5.5. Cinétique de croissance

La cinétique de croissance de la souche retenue a été réalisée dans 3 Erlenmayers de 250 ml avec un volume utile de 50 ml du milieu contenant de bouillon nutritif à pH 10. La température d'incubation correspondant à la température adéquate de la souche (30 °C) et l'agitation est de 250 rpm. Des prélèvements réguliers ont été effectués à des temps précis a fin de mesuré la densité optique à 660 nm.

II.2.5.6. Identification de la souche bactérienne

Depuis une dizaine d'année, l'identification des microorganismes dans les laboratoires de microbiologie reposait principalement sur les caractères phénotypiques : aspect des colonies, coloration de Gram, caractéristiques de croissance et caractères biochimiques (teste de l'oxydase, teste de catalase, la galerie miniaturisées type Api). Les techniques conventionnelles nécessitent beaucoup de personnel et de réactifs et conduisent donc à un coût d'analyse important. Les techniques de biologie moléculaire ne peuvent, de par leur coût, être utilisées en première intention pour identifier les bactéries. En raison de ces bonnes performances.

L'identification de la souche a été réalisée par la méthode de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF qui est donc peu à peu remplacé les techniques conventionnelles dans les laboratoires de microbiologie [65].

a. Historique

La caractérisation de microorganisme par spectrométrie de masse a été décrite dés 1975. Au cours des années 1980, le développement de l'ionisation douce par MALDI-TOF a permis l'analyse de diverses molécules [66]. Par la suite, la technologie de type MALDI-TOF a été appliquée à l'identification rapide des bactéries. Une première base de données,

permettant l'identification de bactéries par analyses des protéines de surfaces, a été référencée en 2004. La fiabilité de l'identification au niveau de l'espèce a été ensuite améliorée par l'ionisation des protéines ribosomales, molécules plus stables que les protéines de surfaces [67]. Le MALDI-TOF Biotyper de bruker Daltonic est installé en mai 2015 au niveau du laboratoire de microbiologie du CRAPC à Bou-Ismail, Tipaza. Il nous permet l'identification et différenciation de micro-organisme à partir de colonies isolées grâce à une analyse par spectrométrie de masse couplée à une source d'ionisation laser assistée par une matrice MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption ionization) et un analyseur à temps de vol TOF (TIime Of Flight).

b. Principe de la spectrométrie de type MALDI-TOF

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant d'identifier différents types de molécules ionisées par mesure de leur rapport masse/charge (m/z). La technologie de type MALDI-TOF requiert au préalable une étape de cristallisation, sur support inerte, de l'échantillon dans une matrice. Le complexe ainsi formé est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice. L'irradiation du mélange cristallin conduit à la désorption d'ions caractéristiques de l'échantillon (MALDI). Les molécules ionisées sont alors accélérées dans un champ électrique et dirigées vers un analyseur séparent les ions selon leur temps de vol (TOF). Ainsi, en fonction de leur rapport m/z, les ions atteignent plus ou moins rapidement le détecteur où ils sont alors transformés en un signal électrique qui sera amplifié puis analysé [68].

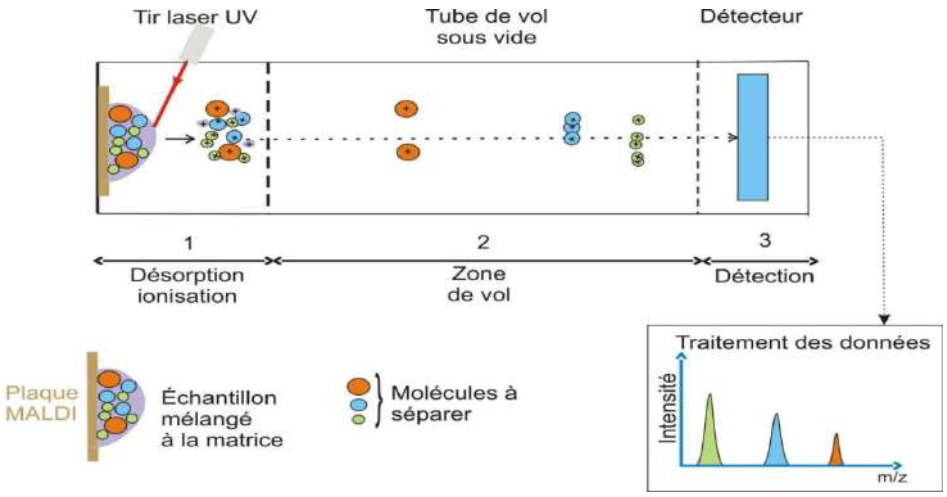


Figure II.1 : Principe de spectrométrie de type MALDI-TOF [69].

c. Application de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans l'Identification des microorganismes

En microbiologie, la technique de type MALDI-TOF MS permet l'identification des microorganismes au niveau de l'espèce par analyse de leurs protéines totales. L'identification peut être réalisée à partir de microorganismes entiers. Pour les bactéries, cette technique est basée sur la génération de spectres de masse à partir de colonies entières [70]. Leur spectre de masse est très majoritairement constitué de protéines ribosomales et membranaires. Un logiciel associé au spectromètre compare le spectre obtenu à des spectres référencés dans une base de données. Indépendamment de la méthode de préparation des échantillons, l'identification des espèces bactériennes est possible en quelques minutes. Récemment, certains auteurs ont montré que la technique de type MALDITOF MS permettait également l'identification de sous-espèces bactériennes [71].

La souche isolée a été envoyé au centre de recherche d'analyse physicochimique (CRAPC) de Bousmail ; Tipaza afin de les identifier moyennant la méthode de spectroscopie de masse de type MALDI-TOF.

II.3. Conclusion

L'intérêt de notre travail était de sélectionner la souche bactérienne productrice de protéases alcalines la plus performante et a fort potentiel de production de protéases que nous allons utiliser dans la coagulation de lait pour la fabrication des fromages. Les rejets laitiers sont très riche en protéines surtout les caséines peuvent être traités biologiquement par la souche performante isolée afin de réduire leurs charges polluantes très riches en protéines.

Chapitre III :

Résultats et discussion

III.1. Introduction

La fabrication d'un fromage commence toujours par la coagulation du lait à l'aide d'une préparation enzymatique coagulante. Historiquement, la plus utilisée était la présure, essentiellement extraite de la caillette du veau. L'essor de l'industrie fromagère à travers le monde a conduit à l'apparition de divers substituts, ce que nécessité le développent de méthodes d'analyse pour une meilleure caractérisation de leur composition enzymatique.

Le travail présenté dans ce mémoire à pour objectif d'avoir une souche bactérienne à forte potentiel de production de protéase, l'identification de cette souche, l'extraction et la purification de ses enzymes, et leurs introductions dans différente application industrielle.

Il est souvent reconnu que la production des protéases extracellulaires chez les microorganismes est largement influencée d'une part, par les conditions physiques à savoir la température, le pH et le temps d'incubation et d'autre part, par la composition chimique des milieux de culture, essentiellement la source de carbone, la source d'azote et les ions métalliques [72]. En effet, un milieu de culture doit contenir quantitativement et qualitativement les matières premières exigées pour la croissance et pour l'induction de l'enzyme. Il doit également contenir des substances inductrices d'enzymes susceptibles d'intervenir dans le métabolisme des substrats utilisés.

Dans cette partie de travail, nous nous sommes intéressés, à l'isolement et la purification des souches bactériennes protéolytiques à partir d'une sélection qualitatives de la protéolyse sur milieu gélosé à base de lait comme source de protéine. Ensuite, utilisé des méthodes performantes dans l'identification de la souche isolée.

III.2. Caractérisation environnementale de lactosérum

Dans le but de caractériser les effluents rejetés par l'industrie laitière et évaluer leurs charges polluantes, une caractérisation physico-chimique (pH, degré d'acidité, conductivité) et environnementale (MES, DCO, DBO_5) a été élaborée sur notre échantillon. Les résultats de nos analyses réalisés sont regroupe dans le tableau ci-dessous :

Tableau III.1 : Caractéristiques de lactosérum

Caractéristique	pH	Acidité	MES
Valeur	4,8	45°D	4,5g/L

Les résultats illustrés dans le tableau III.1 montre que la mesure du pH de notre échantillon (lactosérum) non traité à 25 °C est de 4,8 qui lui confèrent un caractère acide. Ceci nous permet de classé le lactosérum parmi les effluents acides polluant pour l'environnement.

En plus, le degré d'acidité représente la masse de l'acide lactique contenu dans un litre de solution. Dans notre cas, il est de 45 g/L. Cette acidité peut être explique par l'utilisation de la présure dans la coagulation (lactosérum doux) du lait pour la fabrication et la présence de microorganismes qui fermentent le lactose du lait et lui rend acide et favorisent sa coagulation aussi. Cela, engendre un effluent acide qui cause des problèmes lors de son rejet qui se traduit par la corrosion des conduites et même la pollution de l'environnement.

Pour les matières en suspension, on a obtenue une valeur de 4,5 g/L ce qui prouve que le liquide rejeter par les industriels contient des MES (protéines, glucides et des minéraux) qui lui rend un milieu favorable pour le développement et la croissance des microorganismes, donc un liquide a charge polluante qui doit être traitée et réduite avant son évacuation dans la nature.

III.3. Isolement des souches bactériennes protéolytiques

En vue de trouver de nouvelles souches bactériennes sécrétrices de protéases alcalines, nous avons isolé une souche à partir de lactosérum restant après la coagulation de lait dans l'industrie fromagère. En utilisant la méthode des dilutions décimales et ensemencement sur milieu adéquat à ce genre d'activités qui est la gélose nutritive au lait GNL : milieu utilisé pour déceler les activités protéolytiques extracellulaires) et incubation

différents températures (30 et 37 °C) pendant des durés de 24, 48 et 72 h a fin de donnée la possibilité de développement a touts les microorganismes

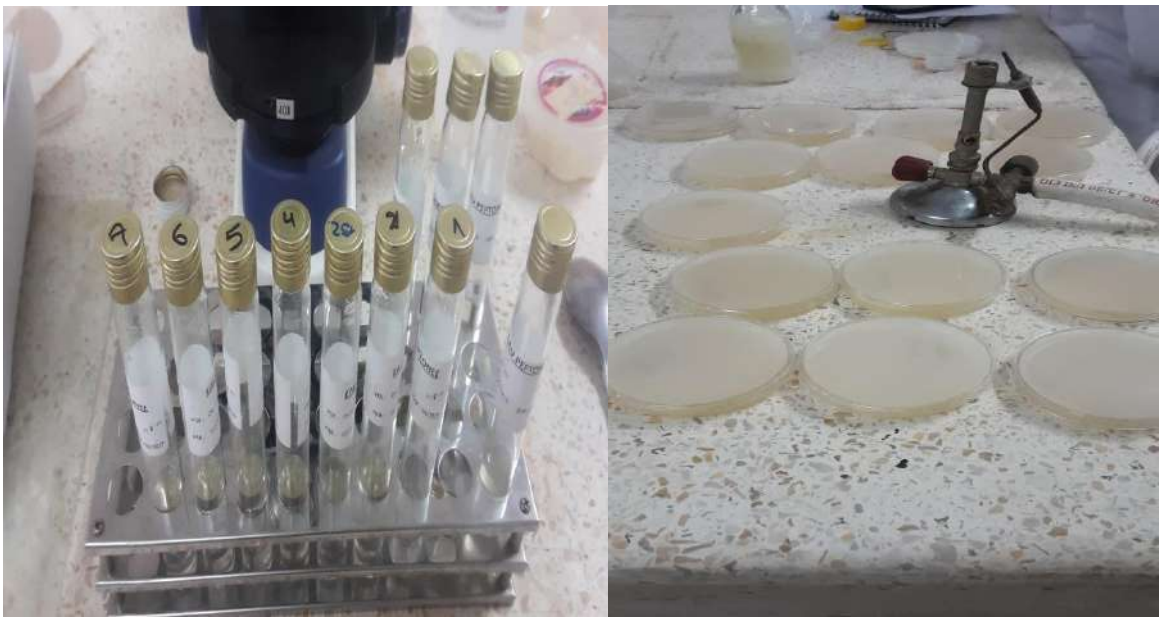


Figure III.1 : Dilutions et ensemencement sur GNL.

Après incubation nous avons sélectionnés la boite présentant le plus de colonies sur le GNL (c'est le tube qui contient la dilution de 10^{-3}), est prise pour le poursuite de notre travail.

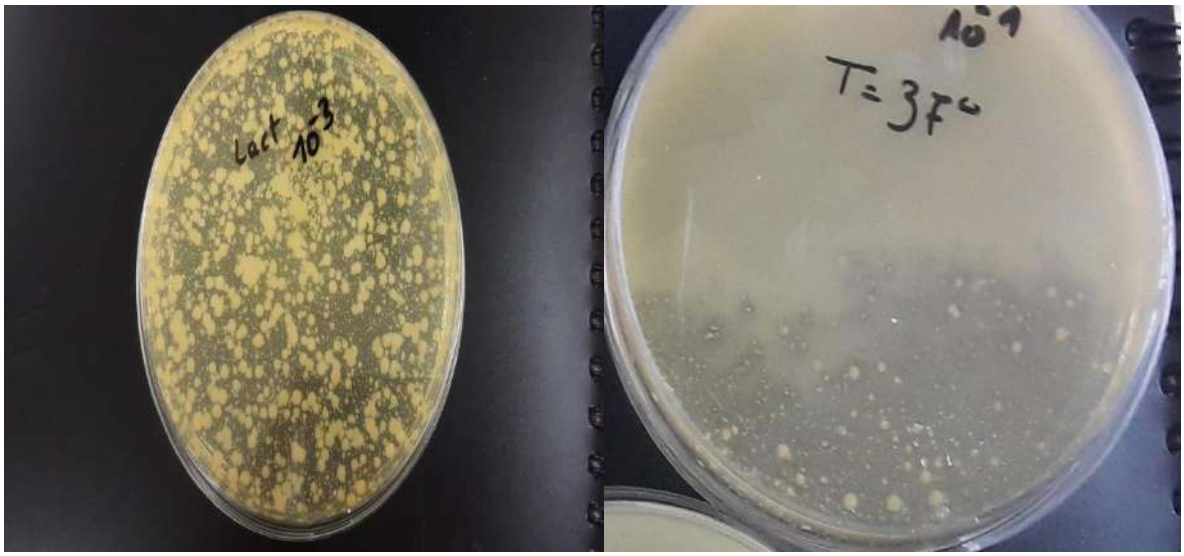


Figure III.2 : Résultat de la croissance des souches protéolytiques sur un GNL successivement à 30 et 37 °C.

Des repiquages successifs sur GNL ont été réalisées a fin de purifier les souches obtenues et incubé aux mêmes conditions citées précédemment.



Figure III.3. Incubation des souches protéolytiques isolées à des températures de 30 et 37°C.

III.4. Test qualitative de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été mise en évidence après purification des souches par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie. Ce test qualitatif est visualisé par la diffusion des protéases secrétées dans la gélose environnante tout en hydrolysant les protéines du lait (notamment les caséines) (figure III.4).



Figure III.4 : Aspect d'halo sur le milieu GNL après l'incubation à 30 °C et à 37 °C

En se basant sur le rapport du diamètre de l'halo (mm) sur le diamètre de la colonie (mm), nous avons montré que parmi les deux souches testées, les souches incubées à 30 °C présentent des rapports importants que d'autre. Les résultats des diamètres du halo et de la colonie en fonction de la duré d'incubation et des rapports sont regroupés dans le tableau ci dessous :

Tableau III.2. Résultats du test qualitatif

	24h			48h			72h		
La souche	dh	dc	dh/dc	dh	dc	dh/dc	dh	dc	dh/dc
La souche incubée à 30°C	37	25	1,48	44	27	1,62	50	30	1,66
La souche incubée à 37°C	34	28	1,21	42	33	1,27	49	35,5	1,38

L'analyse du tableau III.2 montre que le diamètre du halo augmente avec celui de la colonie en fonction du temps. Le diamètre du halo est proportionnel soit à la quantité de protéases libérées par les cellules, soit à la diffusion des enzymes secrétés dans la GNL. La souche incubée à 30 °C présentant les valeurs des rapports les plus importants, s'avère la plus intéressante et la plus active.

III.5. Cinétique de croissance

A fin de déterminer la vitesse de croissance et le temps nécessaire pour l'adaptation de la souche dans le milieu qui correspond a une production maximale de protéases alcalines, des mesures de la densité optiques ont été mesurés a 600 nm dans des intervalles de temps bien déterminer (0, 2, 4, 6, 8 et 24 h). Les résultats des ces mesures sont représenté graphiquement (voir figure III.7).

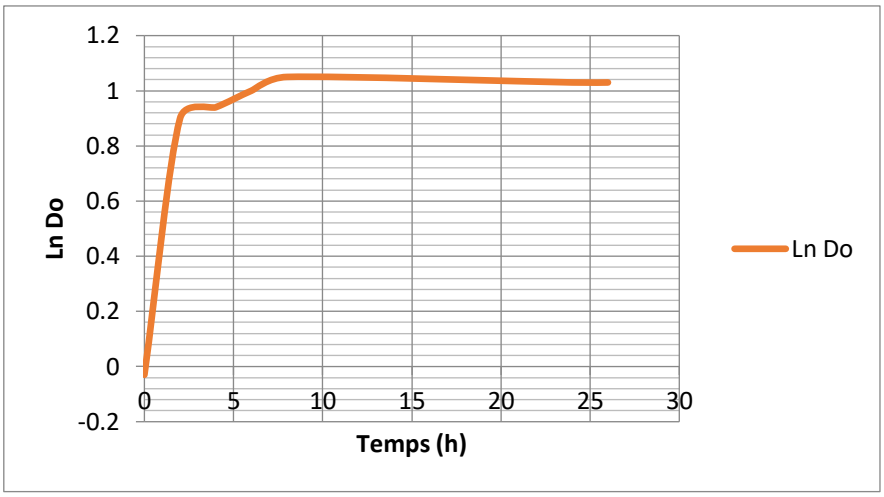


Figure III.5. Profils de croissance de la souche en culture sur milieu liquide à pH=10

Lors de l'inoculation d'un milieu de culture frais par la souche, cette dernière ne se multiplie pas immédiatement. Cette période représente la phase de latence. Durant cette étape les cellules sont actives et précédent à la synthèse de nouveaux constituants cellulaires de façon à s'adapter au nouveau milieu sans toutefois se multiplier. La durée de cette période est influencée par la quantité et l'âge de l'inoculum ainsi que la composition du nouveau milieu par rapport à celle du milieu d'origine.

Suite à cette période d'adaptation, les microorganismes commencent à se multiplier. Ils entrent alors en phase de croissance exponentielle. A ce moment, la vitesse de croissance atteint sa valeur maximale après 9 heurs. Pendant cette phase, la population est homogène et chaque cellule possède pratiquement les mêmes propriétés chimiques et physiologiques.

La phase stationnaire commence au moment ou les nutriments du milieu s'épuisent. La population devient alors stable. De plus, les déchets métaboliques produits par les cellules commencent à s'accumuler dans le milieu.

Le déclin des cellules viable s'observe durant la phase de mortalité, ou l'accumulation des déchets métaboliques inhibiteurs et l'épuisement des nutriments essentiels entrainent la mort cellulaire [73].

III.6. Identification de la souche isolée

D'après l'analyse des résultats obtenus par la méthode d'identification moléculaire de MALDI-TOF et leurs représentations sur le tableau III.3, on peut conclure que la souche isole a partir du lactosérum est probablement du genre ***Aeromonas bestiarm*** avec une valeur de score de 1.765 (voir annexe N°3). Vu la pandémie (COVID 19) qui a bloqué tous les travaux, des études supplémentaires sont nécessaires à fin de pouvoir déterminer le genre de cette souche en l'occurrence, des réactions en chaine de polymérisations (PCR) de son matériel génétique et leur séquençage.

Tableau III.3. Résultats de test d'identification par MALDI-TOF

code de l'échantillon	Organisme (meilleur score)	Valeur de score	Organisme (deuxième meilleur match)	Valeur de score
IL (+) (B)	Aeromonas bestiarm	1.765	Aeromonas sp[2]	1.733

III.7. Conclusion

Le contexte de notre travail proposé est de trouvé de nouvelles souches bactérienne productrice de protéases alcalines. Ces derniers ont été isolés à partir des rejets de l'industrie laitière et du lactosérum spécialement.

Les méthodes utilisées dans notre travail sont débutées par l'isolement des souches qui a été réalisé sur un milieu approprie (GNL) qui permet une sélection qualitative. Cette étape est souvent suivie d'une étape d'épuration a fin de rendre l'étape d'identification plus facile.

La souche a été identifiée en utilisant la méthode de MALDI-TOF/MS qui permet l'identification des microorganismes au niveau de l'espèce par analyse de leurs protéines totales. Ceci dans un intervalle de temps très réduit.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les enzymes sont des biocatalyseurs qui rendent possible des réactions chimiques qui seraient en leur absence impossibles. Elles agissent à faible concentration dans des conditions de pH, température compatibles avec la vie cellulaire.

Les protéases microbiennes, en particulier celles produites par les bactéries dominent le marché mondial des enzymes. Ces biocatalyseurs sont d'une grande importance économique, en considérant les applications industrielles multiples dans lesquelles elles sont impliquées. L'obtention de nouvelles protéases pourrait soit conduire à de nouvelles applications biotechnologiques, soit à une amélioration des performances des enzymes existantes.

Dans ce cadre nous avons initié un nouveau projet visant la recherche et l'identification de nouvelles souches productrices de protéase alcalines plus efficaces et capables d'agir dans les conditions extrêmes et ayant un intérêt industriel plus vaste.

Dans l'objectif de valorisation de lactosérum dont la découverte de nouvelles souches bactériennes productrices de protéases alcalines, l'extraction de ces enzymes protéolytiques, leurs introduction dans des procédés industriels telque la coagulation du lait en vue de production de fromages comme des enzymes substituant du présure animale

Notre travail porte sur les points suivants :

- L'isolement de la souche bactérienne sur un milieu GNL afin de prouvé son pouvoir protéolytique
- L'identification de la souche protéolytique par la méthode de MALDI-TOF/MS :

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS a été intégrée cette dernière décennie dans les laboratoires de routine de microbiologie clinique pour l'identification des microorganismes. Cet outil innovant, facile à utiliser, rapide, précis et rentable a révolutionné l'identification bactérienne. Idéalement, une méthode de typage applicable en routine nécessite une préparation minimale de l'échantillon, permet une analyse directe des données, et doit être rapide, automatisée et peu coûteuse.

Les résultats obtenus par cette méthode d'analyse ont permis d'identifier la souche en tant que ***aeromonas bestiarm***.

En guise de perspective, nous envisageons de poursuivre ce travail dans le but d'extraire cette protéase, la purifier et l'introduire dans une application industrielle.

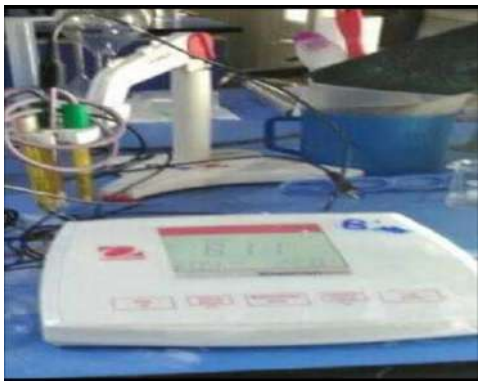
Annexe

Annexe N°I

Matériels utilisées :

- ✓ **PH mètre :**

Le pH-mètre est un appareil, souvent électronique permettant la mesure de pH d'une solution.



- ✓ **Autoclave :**

Cette appareille sert à stériliser le matériels microbiologiques.



- ✓ **Etuve :**

C'est un appareil de chauffage fonctionne le plus souvent à la pression atmosphérique permettant d'effectuer divers traitements thermiques régulée.



- ✓ **Bain marie :**

Les chimistes utilisent souvent le bain marie pour éviter toute destruction de molécule par contact avec la paroi excessivement chaude du récipient.



- ✓ **Bec benzène :**

C'est un appareil de laboratoire destiné à produire une flamme ouverte avec du gaz combustible afin de chauffer des préparations, stériliser du matériel ou brûler des substances.



Annexe N°II

✓ Signification des valeurs de score :

	La description	Symboles	couleurs
2.300 ... 3.000	Identification d'espèces hautement probable	(+++)	Vert
2.000 ... 2.299	Identification sûre du genre, identification probable des espèces	(++	Vert
1.700 ... 1.999	Identification probable du genre	(+)	Jaune
0.000 ... 1.699	Identification non fiable	(–)	rouge

✓ Signification des catégories de cohérences (A-C) :

Catégorie	La description
A	Cohérence des espèces : la meilleure correspondance a été classée « verte » (voir ci-dessus). Autres matchs ‘‘ verts ‘’ sont de la même espèce que le premier. Les autres correspondances ‘‘ jaunes ‘’ sont au moins du même genre que le premier
B	Genre de cohérence : la meilleure correspondance a été classée comme ‘‘ verts ‘’ ou ‘‘ jaune ‘’ (voir ci-dessus). Plus ‘‘ verts ‘’ ou les correspondances « jaune » ont au moins le même genre que la première. Les conditions des espèces la cohérence n'est pas remplie
C	Pas de cohérence : ni espèce ni cohérence de genre (veuillez vérifier les synonymes de noms ou mélange microbien)

Références bibliographiques

Références bibliographiques

[1]. Cuvelier, G.F.(1999). « Production des enzymes in : Biotechnologie », Goor. Scriban R, 5éme ed, pp : 345-363.

[2]. Gana S, Touzi A. (2001). « Valorisation de lactosérum pour la production des levures lactique avec les procédés de fermentation discontinue et continue », Rev. Energ .Ren. Production et valorisation-biomasse : 51-58.

[3]. Mahaia MA, Cheryan M. (1986). "Lactic acide from acid whey permeat in membrane recycles bioreacteur". Enzyme Microb. Technol.8 : 289-292.

[4]. Machakra A, Auberger B, Remeuf F,Lenoir J. (1999). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques par penicillium camemberti. Sci. Aliments. 19 :663-675.

[5]. Cui ZF, Bellara SR, Homewood P. ''Airliftcrossflow membrane filtration-a feasibility studywith dextran ultrafitration''. J Membr Sci 1997; 128 :83-91.

[6]. Granner D. K, Murray R.K, Rodwell V.W. (2008). "Biochimie de HARPER » 3éme édition. De Boeck. Bruxelle : 49-51, 483.

[7].Meunier N., (1999). « Evaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise ». INRS-Eau, université de Québec, Canada.168pages.

[8]. http://ici.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/sf90 1/index90 l.htm (consulté le 16/08/2020).

[9]. George.S.,Raju., Krishnan, M.R.V.,Subramanian, T.V., Jayaraman, K (1995). "production of protease by bybacillusamyloliquefaciens in solid state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins, process biochem'', vol. 30, pp.457-462.

[10]. Elhadi ali N, (2008) . « Protéases alcalines de Bacillus licheniformis NH1 : production, purification, caractérisation et applications biotechnologique »s. Thèse de Doctorat l'Ecole nationale d'Ingénieur de Sfax, Tunisie.

[11]. Reed G. (1975) : "Enzymes in food processing" 2nd edition, Academic press, Orlando. Ryu K., Kim J. and Dordick J.S. (1994) ''catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. Enzyme microb. Technol'', 16 : 266-275.

[12]. Lehninger, Nelson et Cox (1994). « Principes de Biochimie » , deuxième édition, p: 199.

[13]. Bergmayer, H.U (1979). « Principe de l'analyse enzymatique ». Lavoisier. Paris : technique et documentation, 17. P. 75-80, 240-262.

[14]. Assamoi, A.A ; Destain, J et Thonart, P(2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo-B-1,4-xylanases de moisissures : le cas de penicillium canescens. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 13(2).p . 281-294.

[15]. Lalmanach, G. (2008): Proteolytic enzymes: from structures to transport pathways.

Biochimie 90, 191-3.

[16]. Carr, F.J., Chill, D., et Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria : A Literature Survey. Critical Rev. Microbiol, 28 : (4) 281-370.

[17]. Ramesh S, Rajesh M, Mathivanan N (2009). " characterization of a thermostable alkalineproteaseproduced by marine streptomycesfungicides MML 1614. Bioprocessbiosyst" Eng ; 32: 791-800.

[18]. Biochem"2003 BegKB ,Sahai V, Gupta R. " Stastical media optimization and alkalineprotease production from B. mojavensis in a bioreactor. Process; 39:203-9.

[19].Kunamneni A, Poluri E, Davuluri SP. "Purification and partial characterization of thermostable serine alkalineproteasefroma new lyisolated B. subtilis "PE-11. AAPS PharmScitech 23 b; 4(4): article 56.

[20]. Illanes A. (2008). "Enzyme biocatalysis principales and applications". Springer. New York. Revew P : 57. 74. 76.

[21]. Roserio L.B, barbos M, Ames J.M, Willbey R.A (2003). "Cheesemaking with vegetable coagulants- the use of cynara for the production of ovine milk cheeses". Int. J. Dairy Tech. 56 : 76-85.

[22]. Ole, K., T.V. Borchert and C.C. Fuglsang. (2002). « Industrial enzymes applications ». Current opinion in Biotechnology. l3:345-351.

[23]. Dives K., Jost R., Mahadevan J. & Monti J. (1984). ‘’Utilisation de la méthodologie expérimentale pour production des acides organiques par les bactéries lactiques ‘’. Milk Dairy. 35 : 292-297.

[24]. Bssem J, Ellouz-Chaabouni S, Mamdouh Ben A, Ezzedine Ben M, Begacem N, Abdelhafidh D, Samir B (2009). “Excellent laundry detergent compatibility and high dehairingability of the B.pumilus CBS alkaline proteinases(SAPB)”. Biotechnol Eng ;14 :503-12.

[25]. Garcia-Gomez, M.J ; Huerta,S ; Loera-Corral, O et Prado- Barragan, L.A (2009).“Advantages of a proteolytic extrat by Aspergillus Oryzae from fish flour over a commercal proteolytic preparation food chemistry”, 112.P.604608.

[26]. Rai, S.K et Mukherjee, A.K(2010).“ Statistical optimization of production, purification and industrial application of a lundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (alzwiprase) from bacillus subtilis DM-04”. Biochemistry Engineering journal,48.P.173-180.

[27]. Kumar,D., Savitri., Thakur, N., Verma,R., Bhalla,T.C (2008). “Microbial protease and application as laundry detergent additive”. Research journal of microbiology, 3(12).P.661-672.

[28]. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V.: “Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases microbiology and molecular biology” Review, 1998, 62.P.597-635.47.

[29]. Tyagi, R.D., SIkati Foko, Barnabe, S., Vidyarthi, A., Valero, J.R.(2002).’’Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by Bacillus thuringiensis using wastewater as a raw material, water sci Technol’’, Vol. 46, pp.247-254.

[30]. Ben Rebah, F., Tyagi,R. D., Prévost,D., Surampali,R.Y (2002). ‘’Wastewater Sludge as a New Medium For Rhizobial Growth’’, Water Qual. Res. J. Canada, Vol. 37, PP.353-370.

[31]. Li Z,Youravong W, H-Kittikun A(2006). ‘’Separation of proteases from yellow fin tuna spleen by ultra filtration. Bioresour Technol’’; 97:23-64-70.

[32]. Morya VK, and Yadav D (2010). ‘‘Production and partial characterization of neutral protease by an indigenously isolated strain of aspergillus tubingeensis’’ NIICC-08155. The Internet J. Microbiol., Vol. 8, No.1.

[33]. Audigie Cl ; Zonszain F, (1991) :” Protease synthesis and entomotoxicity potency in

Bacillus thuringiensis var. Kuurstaki using as a raw material”. Articale soumis pour publication à : Enzyme and Microbial Technology.

[34]. Haki GD, Rakshit SK (2003). ’’ Developments in industrially important thermostable enzymes” a review. Bioresour Technol; 89 : 17-34.

[35]. Delaunay J, (1988): “ An enzyme-alkaline hydrolysis of feather keratin for obtaining a protein concentrate for fodder”. Biotechnol Lett 12, 71-72.

[36]. Naidu KSB, and Devi KL.(2005): ‘‘Optimization of thermostable enzymes: a review’’. Bioresour Technol 2003 ; 89 : 17-34

[37]. Kumar, A.G., Nagesh, N., Prabhakar, T.G., Sekaran, G. (2008): “Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by Synergistes sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries”. Bioresource Technology, p:2364-2372.

[38]. Rao M.B., Tanksale A.M., Chatge M.S. et Deshpande V.V., (1998): “molecular and biotechnologie aspects of microbial proteses”. Microbiology and molecular Biology Reviews 62 (3): 597-625.

[39].Ajila CM, Prasada RaoUJS (1997). « Purification and characterization of black gram (Vigna mungo) husk peroxidase ». J Mol Catal B : Enzum 2009 ; 60 : 36-44.

[40]. Siezen, R.J et Leunissen, J.A. Subtilases (1997) : “The superfamily of subtilisin-like serine proteases”. Protein Science, 6.p. 501-523.

[41]. Barret, A.J (1987). The cystatins : a new class of peptidase inhibitors. Trends in biochemical Sciences, Revew , 12. p. 193-196.

[42]. Barett, A.J (1995). Enzymes protéolytiques : aspartique et metallopeptidases. Methodes in Enzymology, revew, 248. p. 183.

[43]. Sielecki, A.R ; Fujinaga, M ; Lu, R.J et James, M.N.G (1991). Structure de raffinage de pepsinogen porcin à la résolution 1.8A. Journal of Molecular Biology, 219.p. 671-692.

[44]. Agrawal, A et Pulendran, B. Anthrax lethal toxin (2004) . a weapon of multisystem destruction. Cellular and Molecular Life Science; 61. p. 2859-2865. 4

[45]. Kunitz, M., Crystalline Soybean Trypsin inhibitor. J Gen Physiol, Vol. 30, 1947, PP. 291-2438.

[46]. Seemüller E., Lupas A., Stock D., Löwe J., Huber R. et Baumeister W. (1995):

Proteasome from Thermoplasma acidophilum: a threonine protease.

Science, 268: 579-582.

[47]. Pelmont, J.(1995). Enzymes : catalyseurs du monde vivant. Grenoble : Presse Universitaire de Grenoble.p. 7, 621, 652-654. 44

[48]. Chitpinityol, S., Goode, D. and Crabbe, M. J. (1998): Studies on the binding of alphacrystallin to recombinant prochymosins and chymosin. Mol Vis 4, 1.

[49]. Schimidl M.K., Taylor S.L. et Nordlee J.A. (1994): Use of hydrolysate-based products in special medical diets. Food Technol., 48 (10): 77-85.

[50]. Scriban, R (1993). : Technique et Documentation en Biotechnologie. 4e édition. Paris, p. 39, 42, 351-356.

[51]. Godfrey T. et West S. (1996): Introduction to industrial enzymology. In : Godfrey T. West S (eds) Inustrial enzymology, 2nd edn. Macmillan Press, London, pp 1-8.

[52]. Christy C, Vermant S, (2002) .‘‘ The state-of-the-art of filtration in recovery processes for biopharmaceutical’’. Desalination; 147 : 1-4.

[53]. Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G et Pandey, A, (2005b). Comparative evaluation of neutral protease production by Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry, 40.p. 2689-2694.

[54]. Godfrey T. et West S. (1996): Introduction to industrial enzymology. In : Godfrey T. West S (eds) Inustrial enzymology, 2nd edn. Macmillan Press, London, pp 1-8.

[55]. Agrawal D., Patidar P., Banerjee T. Et Patil S. (2005): Production of alkaline protease by Penicillium sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. Process biochem., 39 : 977-981.

[56]. Biotimes : Revue Bio-industrielle Trimestrielle de Novo Nordisk (1997 a) Les enzymes améliorent les peaux à quatre niveaux. Juin, 8-9.

[57]. Kudrya V.A. et Simonenko I.A., (1994). Alkaline serine protease and lectin isolation from the culture fluid of Bacillus subtilis. Applied Microbiology and Biotechnology 41: 505-509.

[58]. Gupta, R., Beg, Q.K et Lorenz, P (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Applied Microbiology Biotechnology, 59. p. 15-32.

[59]. Demain, A.L. (2000). Small bugs, big business : The economic power of the microbe. Biotechnology Advances. 18:499-514.

[60]. Fogarthy W.M. et Kelly C.T.,(1990). Mierobial enzymes and bioteehnology, 2e Édition. Elsevier Science Publishing, New-York, États-Unis, 472 pages.

[61]. Eriksen N., 1996. Detergents. Dans: Industrial enzymology, 2e Édition, Godfrey T. et S.I WEST, Stockton Press, New-York, États-Unis, pp. 187-200.

[62]. Barnabé, S., J.-L. Sasseville, R.D. Tyagi and J.R. Valéro. (2003). Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières? Vecteur Environnement. 36-2:50-62.

[63]. Marchal et Bourdon, (1982): Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactèries. Ed,Doin, Paris.

[64]. Bassem Jaouadi (2008-2009): Une nouvelle protéase alcaline glycosylée de Bacillus pumilus CBS: Etudes biochimique, moléculaire, structurale et applications industrielles en détergence et tannerie p 69,70,91,101, 103.

[65]. Gravet A, Camdessoucens-Miehe G, Gessier M, Peluso AR, Vogelsperger-Fuchs B, Lohmann C, et al(2011). The use in routine of mass spectrometry in a hospital microbiology laboratory. Pathol Biol;59:19-25.

[66]. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T(1988);. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of flight mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry.2:151-153. 28.

[67]. Suh MJ, Limbach PA (2004). Investigation of methods suitable for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes. Eur J Mass Spectrom;10:89-99.

[68]. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, et al(1996). Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrixassisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom;10:1227-1232.

[69].http//biotechnologie.ac-montpellier.fr/IMG/jpg/doc_eleve_identification_bacterienne_

Malditof.jpg.

[70]. Fenselau C, Demirev PA (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. Mass Spectrom Rev;20:157-171.

[71]. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, et al(2008). Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionizationtime of flight mass spectrometry. Appl Environ Microbiol;74:5402-5407.

[72]. Oberoi et al, (2001): The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor Process Biochemistry 36: 729-741

[73]. Prescottl et al, Harley J.P et Kleind.a (1995): Microbiologie, Microbiologie , 2 ème edition. Deboeck-wesmael, Brusxelles, Belgique, 1014 pages [82] Kumar C.g et Takagih, (1999): Microbiol alkaline protease : From a bioindustrial viewpoint Biotechnology Advances 17: 561-594.