**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**
**MINISTERE DE L'ENSEIGENEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**
**UNIVERSITE DR. YAHIA FARES DE MEDEA**



**Faculté des Sciences et de la Technologie**
Département du Génie des Procédés

# Projet de Fin d'étude

Présenté pour l'obtention du Diplôme
de Master en génie des procédés

**Option :Bioprocédés pharmaceutiques**

Thème

## Caractéristiques Physico-Chimiques et Tensiométriques d'une Protéase Alcaline.

**Proposé par :**
Mme BENKIAR AMINA

**Présenté par :**
MENADLI Naima
RAMDANI Hadjer

**Année Universitaire 2015-2016**

# Remerciement

*Avant tout, nous remercions Allah tout puissant de nous 'avoir donné la volonté, le courage et la patience pour terminer ce travail.*

*Notre profond respect et nos sincères remerciements à Mme Benkiar A, pour nous 'avoir fait confiance, pour avoir accepté de diriger la réalisation de ce mémoire et pour son soutien inconditionnel.*

*Tout d'abord, nous adressons nos respectueux remerciement à tous les membres du jury qui nous 'ont fait l'honneur de participer à l'évaluation de notre travail.*

*Nous remercions également tous les ingénieurs et enseignants dans les laboratoires de la halle technologies et Lycée de l'université de Yahia Farés pour leur aide, leur conseils.*

*Nos vifs remerciements s'adressent également à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation tout au long de nos études.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à l'encontre de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*MENADLI et RAMDANI*

# Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A l'âme de ma très chère mère.

A mon très cher Père, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.
Puisse Allah vous garder

A mon très cher mari Ahmed, quand je t'ai connu, j'ai trouvé l'homme de ma vie et la lumière de mon chemin, Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour.
A mes très chères sœurs Fatema Zohra, Souad, Amel, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.
A mes très chèrs Frères, Mohamed, Fethi, Hamza, Othmene En témoignage de l'attachement, de l'amour que je porte pour vous.
A mes très chères Neveux et Nièces, Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.
A ma meilleure amie Hadjer, en témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble,
Et enfin, à tous mes collègues de la promotion en génie des procédés.

MENADI Naima

# RESUME

Les protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et utilisé en biotechnologie industrielle. En effet, la part des protéases dans ce marché est essentiellement dominée par les protéases alcalines d'origine microbienne, particulièrement du genre *Bacillus*.

L'objectif de ce travail est la réactivation de la souche « *Bacillus circulans* », afin d'évaluer ces propriétés protéolytique. Pour cela, on a fait appel à la méthode de KHAMBAVI qui permet la détermination du taux des protéases sécrétés. En plus, on a évalué les propriétés physico-chimique et tensiométrique de la protéase produite a l'état brute et même de la solution enzymatique semi-purifiée.

Du point de vue application biotechnologique, cette nouvelle protéase ayant des caractéristiques tensiométrique particulières pourrait être utilisée avec succès dans des applications industrielles notamment dans la détergence vue son pouvoir d'élimination des taches à base de protéines (jaune d'œuf et chocolat).

**Mots-clés:** *Bacillus circulans*; Biodégradation ; Protéases; Kératinases.

# ABSTRACT

Proteases represent a group of enzymes who occupy an important place in the industrial biotechnology. Indeed, the proteases are essentially dominated in the commercial market by the alkaline proteases of microbial origin, particularly the genus Bacillus.

The objective of this work is the reactivation of the strain "*Bacillus circulans*" to evaluate these proteolytic properties. In this context, we used the method KHAMBAVI which allows determining the rate of proteases secreted. In addition, we evaluated the physicochemical properties and tensiometric protease produced a raw state and even semi-purified enzyme solution.

From the point of view of biotechnological applications, this new protease having characteristics tensiometric, especial could be used successfully in industrial applications, including detergents for its stain removal power based on proteins (egg yolk and chocolate).



***Keywords:*** *Bacillus circulans; Biodegradation ; Proteases; Keratinases.*


.

# ملخص

تمثل البروتياز مجموعة الإنزيمات الأكثر تجاريا و استخداما في مجال التكنولوجيا الحيوية الصناعية. و في الواقع، البروتياز القلوية من أصل الميكروبات وخاصة من جنس الباسيلوس تهيمن على اكبر حصة في السوق التجاري .

الهدف من هذا العمل هو تنشيط سلالة الباسيلوس لتقييم خصائص البروتين لهذا، لجأنا إلى استعمال طريقة كام بهافي التي تسمح بتحديد مستوى افراز البروتياز وبالإضافة إلى ذلك، قمنا بتحديد الخصائص الفيزيائية والكيميائية و التنسيومترية ولهذا البروتياز المنتج في حالته الخامة وايضا للمحلول الانزيمي الشبه نقي.

من منظور تطبيق التكنولوجيا الحيوية، هذا الأنزيم البروتيني لديه خصائص التنسيو متريك المحددة و يمكن أن تستخدم بنجاح في التطبيقات الصناعة بما في ذلك المنظفات لما لديه القدرة في إزالة البقع (صفارالبيض والشكولاطة)



الكلمات المفتا حية : الباسيلوس ,التحلل البيولوجي ,البروتياز,الكرا تينا ز.

# Table des Matières

Résumé

Liste d'abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale…….. 01

**I. Recherche bibliographique**

I.1. Introduction……... 03
I.2 Les enzymes……... 03
I.2.1 Définition des enzymes ……..……...… 03
I.2.2 Classifications des enzymes ……...……..... 04
a) Selon l'endroit de sécrétion……... 04
b) Selon leur mode d'action...…… 04
I.2.3 Structure……..……..…… 05
a) Site actif ou site catalytique…….…….. 06
b) Site de fixation ou de reconnaissance…… 06
I.2.4. Propriétés des enzymes…….…….**.....** 07
I.3 Les protéases…… 07
I.3.1. Les propriétés des protéases …….. 08
I.3.2. La classification des protéases……...…….. 09
I.3.2.1. Les exopeptidas……..…… 09
a) Aminopeptidase ……..……**....** 09
b) Carbopeptidases …… 10
I.3.2.2 Les endopeptidaes …….…….. **...** 10
a) Les protéases ……..… 10
b) Les protéases à cystéine ……...… **...**11

c) Les protéases acides aspartique ..... 12
d) Les métalloprotéases ……..…….. 12
I.3.3 Les applications biotechnologiques des protéases …… 12
I.3.3.1 Industrie agroalimentaire ……. 13
I.3.3.2. Industrie des détergents ……... 13
I.3.3.3. Industrie pharmaceutique …… 13
I.3.3.4. Autres applications ……. 14
I.4 Les kératinase…….. 14
I.4.1 Définition et mode d'action des kératinases…… ……. 14
I.4.2 Structure des kératines…….. 15
I.4.3 Classification des kératines……. ……..... 16
a) α-kératine……. 16
b) β-kératine……. 17
I.4.4 Sources des kératines…… 17
a) La kératine des plumes……. 18
b) Structure des plumes…… 18
c) Origine et production des plumes…… ……... 19
I.4.5 Traitement des déchets kératiniques …….. 19
a) Production de farine de plumes pour alimentation animale ……. 20
b) Traitement des films photographiques ……... 20
I.5 Conclusion……..……..... 21

## II. Matériels & Méthodes

II.1 Introduction …… 22
II.2 Matériels et méthodes …… 22
II.2.1 Matériels biologique ……..... 22
II.2.2 Matériels de laboratoires ……. …….. 22
a) Equipements …… 22
b) Verreries …… 22
c) produits et réactifs ……. 23
d) Milieux utilisés ……..... 23

II.3 Méthodes ……... 24
II.3.1 Réactivation de la souche ……... 24
II.3.2 Test d'activité protéolytique ……..... ..... 25
II.3.3 Test d'activité kératinolytique …… ……..... 25
II.3.4 Cinétique de croissance ……..... 25
II.3.5 Dosage de l'activité protéolytique ……..... .25
II.3.6. Caractérisation physicochimique ……... .27
a) pH-metrie …… 27
b) Conductimètrie ……... 28
c) Tensiometrie (mesure de la tension superficielle) …….. 28
II.3.7. Purification de la protéase …….. 29
II.3.7.1. Extraits protéolytiques à partir de la souche « Bacillus circulans »…… 29
II.3.7.1. Traitement thermique ……. 29
II.3.7.2. Précipitation au sulfate d'ammonium …… 30
II.4. Application biotechnologique des protéases en détergence ……..... 31
II.4.1 Détermination des propriétés détergentes de la protéase …… 31
II.5 Conclusion ……..... 31

**III. Résultats & Discussions**

III.1 Introduction …… 33
III.1.1. Réactivation de la souche Bacillus circulans …… 33
III.1.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique de la souche « B.c » …… 34
III.1.3. Mise en évidence de l'activité kératinolytique de la souche « B.c» …….. 34
III.1.4. Cinétique de croissance de la souche « Bacillus circulans» …… . 35
III.1.5. Caractérisation physico-chimique de la protéase sécrétée par la souche.. 36
III.1.6. Dosage de l'activité protéolytique ……. 38
III.2. Purification de la protéase produite par la souche Bacillus.c …….. 39
III.2.1. Traitement thermique ……. 39
III.2.2. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium ……... 39
III.2.3. Bilan de purification ……..... 40
III.2.4. Caractérisation physico-chimique de la protéase purifiée ……. … 40
III.3. Mise en évidence de la protéase dans la détergente …… 41

III.4. Conclusion …… 42
Conclusion générale …… 44
Références bibliographies

# Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| **ADE** | Algérienne Des Eaux |
| **ADN** | Acide désoxyribonucléique |
| **ARN** | Acide ribonucléique |
| **DO** | Densité optique |
| **EC** | Enzyme Commission |
| **FBM** | Milieu à base de farine de plumes |
| **GNFP.** | Gélose Nutritive de Farine de plumes |
| **IUBMB** | Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire |
| **KDa** | Kilo Dalton |
| **LB** | Luria-Bertani |
| **MM** | masse moléculaire |
| **Rpm** | rotation par minute |
| **TCA** | (Tri Chloroacetic Acid) acide trichloroacetique |
| **VIH** | Virus de l'Immunodéficience Humaine |

# Liste des figures


| Figure | Titre | Page |
|---|---|---|
| I.1 | Le modèle clé-serrure | 6 |
| I.2 | Structure de la protéase à sérine « la **chymotripsine** » | 11 |
| I.3 | Structure en ruban d'une protéase à cystéine « la **Papaïne** » | 11 |
| I.4 | Structure tridimensionnelle d'un métalloenzyme | 12 |
| I.5 | Structure 3D en rubon des kératinases complexes | 15 |
| I.6 | Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure primaire de l'**α-kératine** de la chevelure humaine | 16 |
| I .7 | Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure segondaire de la **β-kératine** et des ponts disulfures (S-S) de la chevelure humaine. | 17 |
| I.8 | Schéma de la structure d'une plume | 19 |
| II.1 | La souche *Bacillus circulans* | 24 |
| II.2 | Dosage de l'activité protéolytique | 27 |
| II.3 | pH-mètre | 28 |
| II.4 | Conductimètre | 28 |
| II.5 | **A.** Extrait enzymatique **B**. Montage de filtration | 29 |

| | | |
|---|---|---|
| II.6 | Traitement thermique à 80 °C | 30 |
| II.7 | Précipitation par sulfate d'ammonium | 30 |
| III.1 | Ensemencement sur un milieu LB solide | 31 |
| III.2 | Mise en évidence d'activité protéolytique produite par la souche Bacillus circulans sur GNL (test-semi-qualitatif). | 32 |
| III.3 | Mise en évidence d'activité kérationlytique produite par la souche *Bacillus circulans* sur FBM (test-semi qualitatif) | 33 |
| III.4 | Le profil de croissance de la souche *Bacillus circulans* en fonction du temps | 33 |
| III.5 | Profiles de l'activité protéolytique en fonction du temps | 36 |
| III.6 | Mise en évidence des propriétés détergente de la protéase produite par la souche *Bacillus circulans* | 40 |

# Liste des tableaux


| Tableau | Titre | Page |
|---|---|---|
| I.1 | Classification des enzymes selon leurs fonctions | 5 |
| I.2 | Concentration des acides aminés en gramme par Kg de plumes | 18 |
| III.1 | Résultats du pH lors de la croissance de la souche Bacillus circulans | 36 |
| III.2 | Résultats des différents paramètres physico-chimiques de la production des protéases par la souche Bacillus circulans | 37 |
| III.3 | Résultats de purification de la protéase | 40 |
| III.4 | Résultats de la caractérisation physico-chimique après la purification de La protéase | 18 |

# Introduction général

# INTRODUCTION GENERALE

Les enzymes sont des macromolécules de nature protéique caractérisées par leur activité catalytique qui gouverne des réactions biochimiques spécifiques au sein de l'organisme. Elles sont largement employées dans l'industrie des détergents, alimentaire, brassicole et pharmaceutique. Depuis longtemps, elles ont été employées dans la préparation d'aliments fermentés, particulièrement dans la culture orientale. Les enzymes liées à une matrice, ou encore retenues dans un réacteur sont utilisées de façon préférentielle car elles peuvent être réutilisées. L'utilisation la plus importante des enzymes immobilisées consiste en la synthèse ou la modification de différents produits [1].

Parmi les milliers d'enzymes identifiées et souvent commues dans les moindres détails, les biochimistes sont intéressés à l'une des plus répondes qui soient, la protéase.

Actuellement, les protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et le plus utilisé en biotechnologie industrielle grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la substitution des agents chimiques toxiques. En effet, ce groupe des hydrolases couvre 65% du marché total des enzymes. Toutefois, la part de ces protéases dans le marché mondial est essentiellement dominée par les protéases alcalines microbiennes, particulièrement du genre *Bacillus* et *Streptomyces*, avec 40% de ce marché [2]. Ces enzymes sont d'une grande importance économique, en considérant les applications industrielles multiples dans lesquelles elles sont impliquées.

Par ailleurs, plusieurs travaux de recherche sur les protéases ont été entrepris et sont de plus en plus orientés vers une recherche appliquée soit pour stabiliser les protéases dans des conditions précises, soit pour améliorer leurs performances et chercher de nouvelles propriétés par la modification génétique.

L'exploitation de ces enzymes a permis l'élaboration de produits de haute valeur qui ont également révolutionné la biotechnologie avec leur exploitation dans différentes applications en cultivant un micro-organisme formant l'enzyme souhaitée dans le cadre de son propre métabolisme, en lui offrant des conditions de développement optimales afin qu'il en produise de grandes quantités. C'est ainsi, que nous nous sommes intéressés

à étudier cette nouvelle protéase d'origine microbienne particulièrement d'une souche bactérienne protéolytique qui a été identifiée en tant que « *Bacillus circulans* ».

L'objectif du présent travail est la réalisation d'une caractérisation physico-chimique et tensiométrique des propriétés de protéases produite par une souche de « *Bacillus circulans* »

Pour cela l'étude est menée en deux étapes :

- Une partie consacrée à la recherche bibliographique sur les enzymes d'une manière générale et particulièrement sur les protéases ;
- Une Deuxième partie réservée à l'étude expérimentale s'articule sur les points suivants:
  - La réactivation de la souche sujette d'étude et la production de protéase;
  - La caractérisation physico-chimique et tensiométrique de la protéase produite ;
  - La purification de cette dernière et la caractérisé une seconde fois.

# Chapitre I

## Recherche bibliographique

# I.1. Introduction

Les enzymes sont une clé pour la compréhension de la vie, car agissant en séquences organisées, elles catalysent certaines étapes réactionnelles des voies métaboliques qui permettent aux molécules nutritives d'être dégradées ; à l'énergie d'être conservée et transformée ; aux macromolécules biologiques d'être synthétisées à partir de précurseurs simples. Ce sont des outils clés de la biotechnologie et des bio-industries qui catalysent dans le génie microbiologique les réactions mises en jeu et assurent leur régulation.

# I.2. Les enzymes

## I.2.1. Définitions des enzymes

Les enzymes sont des protéines de hautes masses moléculaires (10000 à 100000 daltons) et sont constituées de longues chaines d'acides aminés unis par des liens peptidiques. Ce sont des macromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaires. Elles sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants ou elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires. Autres fonctions importantes, les enzymes sont responsables de la dégradation des molécules complexes en molécules plus facilement assimilables [3]. La base de leur mode d'action est la reconnaissance plus ou moins spécifique entre d'une part, un domaine de l'enzyme, d'autre part la (les) molécule(s) dont elle catalyse la transformation et qui est (sont) appelée(s) substrat(s). De façon générale, la majorité des réactions enzymatiques peuvent être représentées de la façon suivante:

**Enzyme + Substrat ↔ Complexe Enzyme-Substrat ↔ Produit + Enzyme**

Ce sont des acteurs directs mais omniprésents dans la vie cellulaire. Sans ces protéines douées d'un pouvoir catalytique, aucune des réactions indispensables au métabolisme des cellules ne serait possible [4].

De très nombreuses réactions chimiques se déroulent dans la cellule. Certaines sont des réactions de dégradations de la matière organique (catabolisme) tandis que d'autres sont des réactions de synthèse (anabolisme). Toutes ces réactions nécessitent l'intervention d'enzymes. En effet, les enzymes permettent la réalisation de ces réactions dans des conditions physico-chimiques compatibles avec la vie.

Une enzyme, comme toute protéine est synthétisée par les cellules vivantes à partir des informations codées dans l'ADN ou dans l'ARN. IL existe deux grandes catégories d'enzymes:

- Les enzymes purement protéiques (qui ne sont constituées que d'acides aminés);
- Les enzymes hétéroprotéiques constituées de deux parties, une partie protéique (« l'apoenzyme ») et une partie non protéique (« le cofacteur »), appelées « holoenzymes » [5]. Dans ce cas, sans la coenzyme, la catalyse de la réaction ne peut avoir lieu.

### I.2.2. Classification des enzymes

La classification des enzymes peut être établie de plusieurs façons :

a) **Selon l'endroit de sécrétion**

Certaines enzymes sont excrétées à l'extérieur de la cellule même si toutes les enzymes sont d'abord produites à l'intérieur. Il y a donc, deux types d'enzymes, soit les enzymes intracellulaires (endoenzymes) et les enzymes extracellulaires (exoenzymes).

- ✓ **Les exoenzymes :** sont sécrétées par la cellule et agissent à l'extérieur de celles-ci sur les diverses substances organiques telles que les protéines, les hydrates de carbone ou les lipides, formant des dérives généralement solubles et susceptible d'être absorbés à travers la membrane cellulaire [6].
- ✓ **Les endoenzymes :** ont la spécifitée de synthétisés les divers composants cellulaires et décomposent les nutriments afin de pouvoir aux besoins énergétique de la cellule.

**b) Selon leur mode d'action**

A cause de leurs nombreuses propriétés intéressantes, les enzymes sont de plus en plus utilisées dans plusieurs procédés industriels : les réactions d'hydrolyse, d'oxydation,…etc.

**Tableau I.1** Classification des enzymes selon leurs fonctions [7].

| Enzymes | Fonction |
|---|---|
| Oxydoréductase | Transfert d'électrons entre deux couples oxydoréducteurs, l'un des deux étant souvent un coenzyme à nicotinamide.<br>Ex : lactate déshydrogénase. |
| Transférase | Ou kinases catalysent le transfert d'un groupement chimique d'une molécule à une autre. Ex : phosphofructokinase. |
| Hydrolases | Catalyse la coupure des liaisons par hydrolyse ; c'est le cas des lipases, peptidases, protéases. Ex : acétylcholine estérase. |
| Lyases | Catalyse le clivage par élimination de liaisons C-C, C-O ou C-N. une double liaison est formée dans ces réactions.<br>Ex : citrate lyase. |
| Isomérases | Catalyse le changement de conformation d'une molécule.<br>Ex : phosphoglycerat mutase. |
| Ligases | Catalyse la condensation de deux molécules par couplage avec la rupture d'une liaison à haut potentiel énergétique.<br>Ex : Aminoacyl-ARNt –synthétase. |

### I.2.3. Structure

Plusieurs milliards d'enzymes ont été identifiées et un grand nombre entre elles ont été cristallisées. Ce sont toutes des protéines. Les unités structurales de base sont donc des aminoacides. Ces derniers sont unis par des liaisons peptidiques pour former des chaines polypeptidiques.

$$NH_3^+ - CHR_1 - \boldsymbol{CO} - \boldsymbol{NH} - CHR_2 - \boldsymbol{CO} - \cdots - \boldsymbol{NH} - CHR_n - COO^-$$

Les groupements R possèdent souvent des fonctions $NH_2$ ou *COOH* permettant leur immobilisation par liaisons covalentes sur des supports insolubles.

La spécificité de l'enzyme est souvent attribuée à sa structure tridimensionnelle très élaborée permettant la formation du site actif responsable de la catalyse enzymatique [8]. Toute déformation de cette structure retentit sur les propriétés catalytiques de l'enzyme.

- Une augmentation de la température rompt les liaisons hydrogènes et hydrophobes, dénature la structure et rend l'enzyme inactive ;
- Une variation du pH entraine l'introduction de charge supplémentaire sur les acides aminés (diacides ou dibasiques), déforme la structure spatiale de l'enzyme.

Une des caractéristiques de la catalyse enzymatique est la localisation dans un domaine bien déterminé de l'ensemble de la réaction c'est-à-dire de la formation du complexe enzyme-substrat et des transformations ultérieures qui aboutissent à la formation du produit. Il est donc important de connaitre le domaine de réaction, les groupements catalytiques et les forces qui interviennent dans les différentes étapes [9] [16].

### a. Site actif ou site catalytique

C'est une zone privilégiée de l'enzyme (représentant environ 5 % de la surface totale de l'enzyme) au niveau de laquelle le substrat est transformé. Il possède une structure complémentaire de celle du substrat. Deux à dix aminoacides seulement, regroupés dans une zone hydrophobe interne de la molécule, participent à l'activité catalytique. Les plus rencontrés sont : histidine, serine, cystéine, lysine; ce sont des acides aminés polaires dotés de doublets électroniques libres, possèdent ainsi une activité nucléophile.

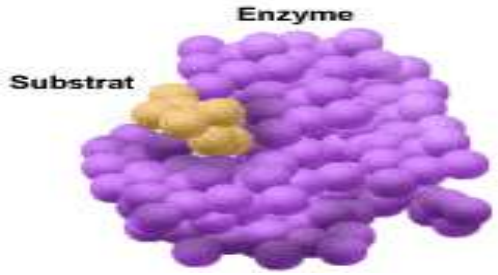



**Figure I.1 :** Le modèle clé-serrure [10].

Le site actif à souvent une crevasse ou une fissure à la surface de l'enzyme (figure I.1), formant un environnement essentiellement apolaire qui favorise la liaison du substrat. Le substrat est lié au site actif par de multiples interactions faibles (interactions électrostatiques, liaisons hydrogène, liaisons de Van der Walls, interactions hydrophobes).

### b. Site de fixation ou de reconnaissance

L'enzyme peut agir sur n'importe quel assemblage atomique ressemblant à son substrat. La spécificité de l'enzyme est assurée par un groupe d'acides aminés formant une zone proche du site actif appelé (site de fixation) ou (site de reconnaissance). Ce site aide l'enzyme à identifier son substrat [10].

### I.2.4. Propriétés des enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui différent des catalyseurs chimiques sur quatre points :

- Les vitesses des réactions catalysées par ces biocatalyseurs sont multipliées par un facteur compris entre $10^6$ et $10^{12}$ par rapport aux réactions catalysées chimiquement ;
- Les conditions des réactions enzymatiques sont plus douces car les enzymes travaillent à des températures inférieures à 100 °C, à pression atmosphérique et à un pH proche de la neutralité ;
- Elles présentent une spécificité de réactions par rapport à leurs substrats beaucoup plus importantes et ne génèrent que très rarement des produits secondaires ;
- L'activité enzymatique varie selon les concentrations des substances autres que les substrats. Les réactions enzymatiques peuvent donc être régulées [4].

Les enzymes catalysent les réactions chimiques en abaissant leur énergie d'activation, quand deux molécules se rencontrent pour réagir, elles forment un complexe à l'état de transition. L'énergie d'activation est requise pour que les molécules puissent former le complexe. Ce complexe pourra par la suite se décomposer pour donner les produits. Cependant, la réaction n'aura pas lieu si une quantité d'énergie suffisante n'est pas fournie. Les enzymes abaissent les énergies d'activations. Une moins grande quantité d'énergie est alors nécessaire pour l'accomplissement de la réaction, ce qui permet d'accélérer cette réaction [9]. Une caractéristique importante des enzymes est leur très grande sélectivité à catalyser des réactions chimiques précises. En effet, contrairement aux agents chimiques qu'elles tendent à remplacer, les enzymes sont très spécifiques.

## I.3. Les protéases

Les enzymes sont divisées en plusieurs classes selon leur mode d'action spécifique. Chacune de ces classes principales est décrite dans le tableau I.1. Au niveau industriel, la classe d'enzyme la plus exploitée est celle des hydrolases. Parmi ces dernières, les protéases représentent le groupe le plus connu, le plus commercialisé dans le marché mondial des enzymes et le plus utilisé en biotechnologie industrielle. En effet, les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines en scindant la liaison peptidique avec différents degrés de spécificités. Ces enzymes sont ubiquitaires elles peuvent être d'origine végétale (papaïne et bromeline), animal (chymosine, pepsine, trypsine et chymotrypsine) ou microbienne.

Cependant, la majorité des protéases commercialisées sont d'origine microbienne, car ces enzymes sont plus stables vis-à-vis la température, le pH et de certains détergents par rapport aux protéases d'origine animale ou végétale. Beaucoup de ces protéases microbiennes sont produites à l'échelle industrielle grâce à leurs propriétés physicochimiques et sont recherchées par le marché mondial des enzymes.

### I.3.1. Les propriétés des protéases

- Les protéases constituent un groupe très large et complexe d'enzymes qui diffèrent dans leurs propriétés tels que :
    - Le site actif,
    - Le mécanisme catalytique,
    - L'optimum du pH et de la température,
    - Le profil de la stabilité et la spécificité du substrat.
- La spécificité d'action des enzymes protéolytiques est régie par la nature de l'acide aminé et d'autres groupes fonctionnels (aromatiques, aliphatiques ou la présence de sulfure) autour de la liaison à hydrolyser.
- Ces enzymes sont très importantes du fait qu'elles ne contrôlent pas seulement les réactions protéolytiques, mais aussi elles régulent les diverses cascades enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire tels que la décomposition des lipides et des glucides.
- Les protéases sont capables de modifier les propriétés biologiques des chaînes polypeptidiques suite à la coupure des liaisons peptidiques (activation, inactivation ou une protéolyse non spécifique pendant la dégradation). La raison pour laquelle, les protéases peuvent être dangereuses pour les cellules en altérant leur environnement. De ce fait, la cellule a développé une large gamme des mécanismes pour contrôler l'activité protéolytique. Cette régulation peut être effectuée à n'importe qu'elle étape de l'expression des gènes (la transcription depuis l'opéron, la traduction, les modifications post-traductionnels, l'interaction avec les inhibiteurs et d'autres protéines).

## I.3.2. La classification des protéases

D'après « la commission de classification des enzymes », les protéases appartiennent au groupe des hydrolases (le groupe 3) et au sous-groupe 4 (qui hydrolysent les liaisons peptidiques).

Les protéases peuvent être classées en se basant sur :

- Le type de la réaction catalytique ;
- La nature chimique du site catalytique ;
- La structure protéique. Selon leur mode d'action.

Les protéases sont divisées en deux groupes majeurs : les protéases intracellulaires et extracellulaires.

*Les protéases extracellulaires* qui catalysent l'hydrolyse des protéines en petits peptides facilement assimilables par les cellules.

*Les protéases intracellulaires* qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des processus cellulaires et métaboliques comme la sporulation, la différentiation, la maturation d'hormones et d'enzymes.

Les protéases se différencient également selon leur mode d'action : les endopeptidases et les exopeptidases. Les deux types sont divisés en plusieurs classes et sous classes.

### I.3.2.1. Les exopeptidases

Les exopeptidase sont des protéases qui hydrolysent les liens peptidiques des chaines protéiques à partir soit de l'extrémité N-terminale (aminopeptidase), soit de l'extrémité C-terminale (carboxipeptidase) [12]. Ces enzymes sont très peu utilisées en industrie.

***a) <u>Aminopeptidase</u>***

Sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité N-terminale des protéines. Elles libèrent ainsi un seul acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide. Beaucoup d'aminopeptidase sont spécifiques aux protéines ayant un résidu méthionine en position N-terminale, qui est alors libéré sous l'action de ses protéases [13].

***b) Carboxipeptidases***

Sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité C-terminale des protéines. Elle libère ainsi un acide aminé ou un dipeptide. Les carboxipeptidases sont devisées en trois sous-classes, soit les serines carboxipeptidases, les métallo-carboxipeptidases et les cystéines carboxipeptidases, selon la nature des acides aminés présents au site actif de l'enzyme et selon leur mécanisme catalytique [13].

### I.3.2.2. Les endopeptidases

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

Plusieurs mécanismes d'action ont été décrits pour les protéases, ce qui permet de les regrouper en grandes familles mécanistiques, en fonction de la nature des acides aminés du site actif impliqué dans la catalyse. On distingue ainsi :

**a) Les protéases à sérine**

Les protéases à serine sont très répandues dans la nature et possèdent une triade catalytique caractéristique comprenant une sérine (d'où leur nom), une histidine et une aspartate. Le groupement hydroxyle de la sérine joue le rôle de nucléophile et attaque le carbonyle de la liaison peptidique. Parmi les protéases à sérine, on peut citer :

- La trypsine du pancréas (EC 3.2.21.4), spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles l'acide aminé engagé par son carboxyle est une lysine ou une arginine.
- La chymotrypsine (EC 3.4.21.1) du pancréas s'attaque à des liaisons peptidiques où le carboxyle engagé est un acide aminé hydrophobe ou aromatique.
- La thrombine qui clive le fibrinogène en fibrine lors de la coagulation sanguine.

Ces peptidases ont une faible masse moléculaire (MM) entre 18 et 35 kDa [14] et ont un optimum du pH de 7,0 à 12,0 [15]. Elles sont d'un grand intérêt de point de vue activité et stabilité à des pH basiques.

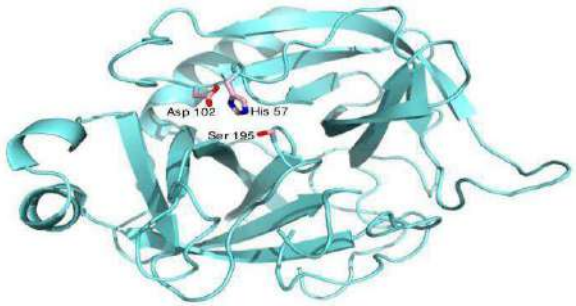



**Figure I.2:** Structure de la protéase à sérine « la **chymotripsine »**

**b) Les protéases à cystéine**

Les protéases à cystéine ou à thiol sont présentes aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Elles possèdent une cystéine dans leur site actif. Dans ces protéases, le rôle du nucléophile est joué par le soufre de la cystéine, sous forme de thiolate déprotoné. Leur pH optimum d'activité se situe au voisinage du point de neutralité. Cependant, un petit nombre d'entre elles, telles que les protéases lysosomales, présentent un maximum d'activité aux pH acides [13].

Parmi les protéases à thiol, on peut citer:

- La papaïne (EC 3.4.22.2) protéine végétale. Spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles l'acide aminé engagé par son carboxyle est un acide aminé basique, aromatique ou apolaire.

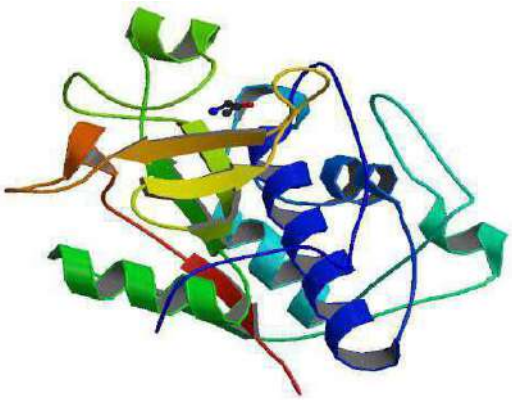


**Figure I.3:** Structure en ruban d'une protéase à cystéine « la **Papaïne** »

- Les caspases protéases qui interviennent dans le processus d'apoptose ou mort cellulaire programmée.

### c) Les protéases acides aspartique

Les protéases à acide aspartique communément connues auparavant sous le nom de protéases acides jusqu'à la découverte des protéases glutamiques, sont des endopeptidases qui dépendent de l'acide aspartique pour leur activité catalytique. Elles sont produites par les cellules animales, les moisissures et les levures, mais rarement par les bactéries. Les protéases à aspartate ne sont actives qu'à pH acide et leur masse moléculaire varie de 30 à 45 kDa, par exemple :

- La pepsine : spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles est engagé un acide aminé aromatique (fonction amine).
- La protéase du VIH-1.

### d) Les métalloprotéases

Les protéases à métal sont largement distribuées parmi les bactéries, champignons et organismes supérieurs. Elles possèdent un cation métallique, généralement un atome de zinc, fixé fortement à la protéine par les chaînes latérales de plusieurs acides aminés. Le cation métallique intervient directement pour activer une molécule d'eau qui clive la chaîne peptidique. Par example: la thermolysine, les protéases de la matrice extracellulaire.

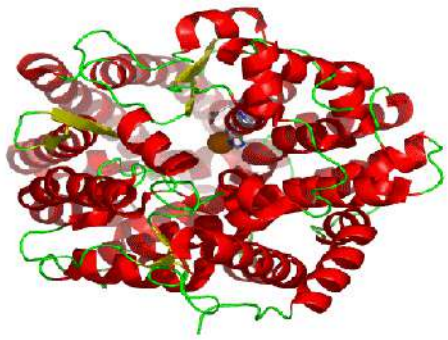


**Figure I.4 :** Structure tridimensionnelle d'une métallo enzyme.

## I.3.3. Les applications biotechnologiques des protéases

Les protéases sont parmi les trois plus grands groupes des enzymes industrielles (hydrolases), comptent pour environ 60-65% des ventes totales dans le monde entier des enzymes en raison de leurs applications dans plusieurs secteurs industriels.

### I.3.3.1 Industrie agroalimentaire

Les protéases microbiennes sont traditionnellement exploitées dans différents secteurs d'industrie alimentaire. En fait, la fonction principale des protéases est l'hydrolyse protéique qui a été exploitée pour la préparation des hydrolysats protéiques de haute valeur nutritionnelle. Ces hydrolysats protéiques peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la pression sanguine, ils sont introduits aussi dans la formulation des produits alimentaires pour nourrissons, dans des produits thérapeutiques spécifiques des régimes alimentaires et dans la fortification des jus de fruit et des boissons non alcoolisées [17].

### I.3.3.2. Industrie des détergents

Les premières enzymes fournies à cette industrie étaient les protéases, qui occupent aujourd'hui encore une position dominante. Les protéases représentent environ 60 % des ventes mondiales d'enzymes pour les détergents ménagers et environ 50 % des enzymes pour les détergents pour lave-vaisselle automatique. Ces enzymes possèdent des propriétés nettoyantes croissantes et une grande stabilité face aux oxydants. Elles facilitent l'élimination des taches comme l'herbe, le sang, l'œuf et la sueur. Dans les détergents pour les vaisselles, elles aident à supprimer les films d'aliments protéiques comme l'œuf et le jus de viande [18].

### I.3.3.3. Industrie pharmaceutique

Les enzymes protéolytiques sont également utilisées pour développer des produits d'importance médicale :

- ✓ Les protéases d'*Aspergillus* s'appliquent pour soulager les troubles digestives gastro-intestinaux tels que la dyspepsie ;
- ✓ La brinase, une protéase acide plasmine hydrolyse la fibrine et le fibrinogène. Elle est appliquée sur des patients en hémodialyse chronique avec des canules artério-coagulés ;
- ✓ La collagénase, qui hydrolyse le collagène natif, a été utilisée pour le débridement des ulcères cutanés et les brûlures, trouve également une application dans le traitement des cellules pathologiques des disques intervertébraux ;
- ✓ La protéase alcaline de *Bacillus sp.* CK 11-4 à une activité fibrinolytique appliquée comme un agent thrombolytique ;

- ✓ La protéase neutre "dispase" (amino-peptidase) est une enzyme produite par *Bacillus polymyxa*, exerce une activité protéolytique douce, ce qui la fait très utile pour l'isolement de cellules primaires et secondaires (sub-culture), car elle maintient l'intégrité des membranes cellulaires [19] [20].

#### I.3.3.4. Autres applications

Certaines protéases sont utilisées aussi en :

- Synthèse de peptides ;
- Traitement des rejets industriels ;
- Traitement de la soie ;
- Panification : Amélioration de l'élasticité de la pâte (les protéases fongiques) ;
- Industries laitière et fromagerie : Coagulation des protéines du lait et son aromatisation;
- Brasserie : Prévention du trouble au froid de la bière par action de la papaïne ;
- Préparation des hydrolysats de protéines à usage microbiologique telles que peptone, tryptone.

## I.4. Les kératinases

### I.4.1. Définition et mode d'action des kératinases

Les kératinases nommées aussi enzymes kératinolytiques représentent l'un des plus importants groupes d'enzymes protéolytiques qui ont un grand intérêt industriel et des applications dans différents secteurs, ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser les kératines efficacement que d'autres protéases. Elles ont été classées comme des protéinases de mécanisme inconnu tel que recommandé par l'IUBMB (1978) avec le numéro [EC 3.4.21/24/99.11] [21].

Des recherches récentes ont indiqué que les kératinases sont comme les protéases à sérine en raison de leurs 97% d'homologie avec les protéases alcalines (Figure I.5), et leur inhibition se fait par les mêmes inhibiteurs des protéases à sérine, et elles peuvent être aussi des métallo-protéases. Ce sont des enzymes qui dégradent facilement la kératine des plumes, de laine et des cheveux ainsi que d'autres protéines fibreuses (l'élastine et le collagène) et d'autre non fibreuses (la caséine, la gélatine et l'albumine) avec un haut degré de spécificité [22].

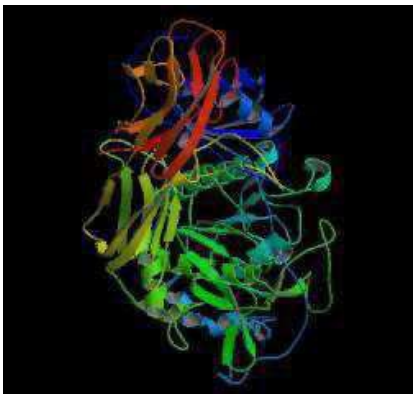


**Figure I.5 :** Structure 3D en rubon des kératinases complexes

Ces enzymes kératinolytique attaquent principalement les ponts disulfures du substrat non soluble par clivage de ces derniers ce qui permet l'attaque des protéases extracellulaires et donne en définitive une accumulation de sulfocystéine, l'excès de soufre est oxydé en sulfite et en sulfate ou en thiosulfate qui se concentre dans le milieu réactionnel. Des études utilisant des substrats synthétiques ont montré que ces enzymes ont tendance à hydrolyser les liaisons peptidique au niveau de lamine des acides aminés aromatiques et hydrophobes [23].

### I.4.2. Structure des kératines

Du point de vue structural, la kératine est hélicoïdale et fibreuse, elle s'enroule autour d'autres molécules de kératines pour former des filaments intermédiaires. En outre, sa structure filamenteuse est stabilisée par le haut degré de réticulation des ponts disulfures, et des interactions hydrophobes. D'un tissu à l'autre, les séquences primaires des kératines varient en particulier du nombre de résidus cystéines et en conséquence du nombre de pontages possible, ainsi, leur augmentation conduit à la formation de tissus durs et coriaces tels que les ongles, les sabots des animaux et les carapaces des tortues [24].

Les kératines sont classées en tant que protéines hétérogènes en raison de leur structure en acides aminés et leur composition hétérogène. Elles sont caractérisées par une teneur élevée en glycine, proline, sérine et d'autres acides aminés, et une faible teneur en lysine, histidine et méthionine, ainsi que l'absence de tryptophane. En raison de leurs structures extrêmement rigides.

Les kératines résistent à l'attaque physico-chimiques des facteurs environnementaux, elles sont insolubles dans l'eau, les acides faibles, les milieux alcalins et les solvants organiques. En outre, ces protéines fibreuses sont non dégradables par les enzymes

protéolytiques, tels que la trypsine, la pepsine et la papaïne [25]. De plus, elles sont très extensibles et élastiques, cela en raison de l'entrelacement des hélices et de la souplesse des liaisons faibles entre les micros fibrilles [24]**.**

### I.4.3.Classification des kératines

Les kératines sont des protéines dont les chaines se présentent en hélice-α (α-kératine) ou en feuillet-β (β-kératine), qui se replient en forme tridimensionnelle.

#### a. α-kératine

L'α-kératine, ou cytokératine, est une large famille multi-génique qui présente un rôle structural important dans les épithéliums des mammifères. Elle a une structure hélicoïdale simple, de longs segments de 311-314 acides aminés en hélice α entourées d'extrémités N- et C-terminales non hélicoïdales forment un pas à droite (Figure I.6). La résistance de cette protéine est amplifiée par l'enroulement de multiples brins hélicoïdaux en une super-hélice appelée protofibrille. L'enroulement hélicoïdal des super-enroulements possède un pas à gauche dans un sens opposé à celui de l'enroulement des hélices polypeptidiques individuelles. Cette conformation permet le tassement le plus serré possible des multiples chaînes polypeptidiques [26].

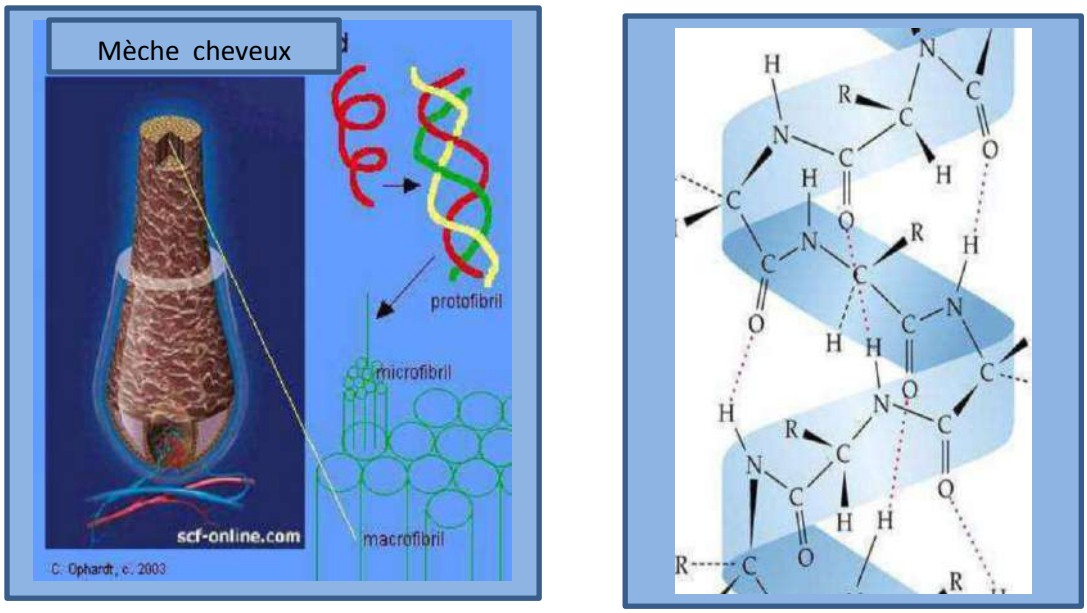



**Figure I.6**: Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure primaire de l'**α-kératine** de la chevelure humaine [24].

La résistance de ces fibres est augmentée par la richesse en résidus hydrophobes (Phénylalanine, leucine, Valine, Méthionine et Alanine) et par des liaisons covalentes entre les chaînes polypeptidiques. La résistance de la kératine α à la plus part des protéases est due essentiellement à la présence d'un taux élevé d'acides aminés à base de soufre, principalement la cystéine, qui forment des ponts disulfures entre les molécules, conférant sa rigidité à l'ensemble (exemple: la chevelure humaine est constituée de 14% cystéine) [23].

### b. β -kératine

La β-kératine, est un énantiomère de l'α-kératine présente chez les reptiles et les oiseaux, c'est le constituant majeur de la fibroïne de la soie et la toile d'araignée, elle est plus flexible et plus molle que la kératine α du faite de sa richesse en résidus de Glycine et d'Alanine. L'organisation structurale de cette forme de kératine est dans une conformation β et le squelette de la chaîne polypeptidique s'étend-en zigzag (Figure I.7). Dans la fibroïne, par exemple, les chaînes polypeptidiques en zigzag sont disposées côte à côte pour former une structure qui ressemble à une série de plis (appelée feuillet ß plissé). Des liaisons hydrogènes peuvent être soit intra- ou inter-chaînes entre les liaisons peptidiques de chaînes polypeptidiques adjacentes [25].

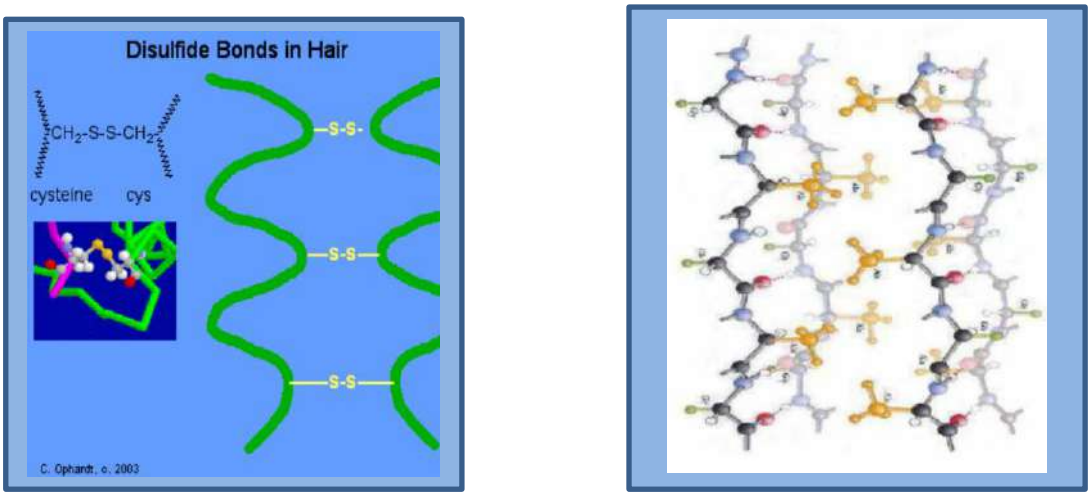



**Figure I.7** : Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure segondaire de la **β-kératine** et des ponts disulfures (S-S) de la chevelure humaine [28].

### I.4.4. Sources des kératines

La kératine est une protéine insoluble, synthétisée et utilisée par de nombreux êtres vivants comme élément de structure, elle se trouve chez tous les vertébrés supérieurs comme le principal constituant de la couche cornée (couche la plus superficielle de l'épiderme

constituée de cellules morte) de certains animaux, notamment les mammifères ce qui leurs garantit une peau imperméable; elle représente jusqu'à 85% des protéines cellulaires tel que les cheveux, les cornes, les ongles, et les plumes [29].

### a. La kératine des plumes

Les plumes d'oiseaux terrestres sont composées d'une partie protéique (kératine) qui présente presque 90% des plumes et d'une partie non protéique qui inclut des pigments, des minéraux, des polysaccharides, des nucléotides, de l'acide urique, du glucose et du ribose. Ces déchets kératiniques présentent une source très riche en protéine et en particulier en acides aminés essentiels (Tableau I.2) [30].

**Tableau I.2 :** Concentration des acides aminés en gramme par Kg de plumes [31].

| Acide aminé | Concentration dans les plumes (g/Kg) |
|---|---|
| Glycine | 162 |
| Valine | 20 |
| Leucine | 83 |
| Isoleucine | 43 |
| Arginine | 17 |
| Lysine | 18 |
| Cystéine | 76 |
| Thréonine | 85 |
| Phényl-alanine | 43 |
| Asparagine | 67 |
| Histidine | 3 |
| Sérine | 72 |
| Glutamine | 97 |
| Proline | 188 |
| Alanine | 84 |

### b. Structure des plumes

La plume est composée d'un axe central nommé le rachis, creux à sa base et plein dans sa partie principale. Le rachis porte des barbes, insérées en deux séries de part et d'autre de l'axe dans un seul plan et enchevêtrées par des barbules perpendiculaires, qui ne peuvent pas être observées à l'œil nu. Ces barbules sont accrochées les unes aux autres grâce à des crochets.

Les barbules se tiennent ensemble comme une fermeture éclair grâce à ces crochets (Figure I.8) [32].

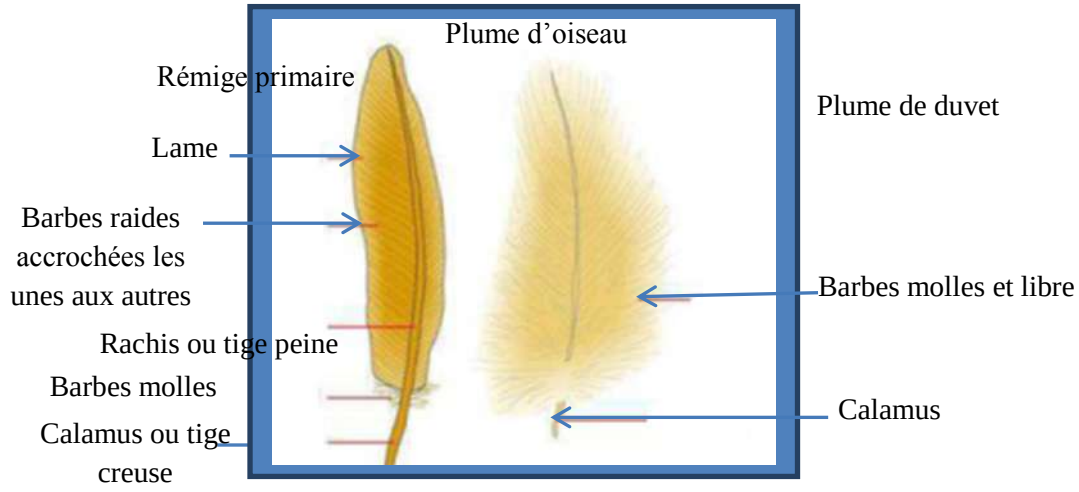



**Figure I.8:** Schéma de la structure d'une plume

### c. Origine et production des plumes :

Concernant les sources de plumes on distingue principalement :

- Plumes et duvets neufs : proviennent de l'élevage et de l'abattage des volailles (poulets, dindes, pintades), des palmipèdes (canards et oies) ou des oiseaux terrestres. Elles sont collectées auprès des abattoirs industriels ou artisanaux.
- Plumes de récupération : proviennent de la collecte des textiles usagés ayant contenu des plumes (oreillers, coussins, couettes, anoraks…) effectuée par les entreprises de récupération de textile.

## I.4.5. Traitement des déchets kératiniques

L'utilisation de protéases alcalines (kératinase) est introduite dans le traitement des déchets de différentes industries alimentaires et des activités ménagères. En effet, elles solubilisent les déchets protéiques et aident ainsi à baisser la demande biologique en oxygène. Des travaux de recherche réalisés [33] ont rapporté l'utilisation d'une kératinase de *B. subtilis* pour le traitement des déchets de volailles et en 1985 ont décrit la composition d'un produit contenant des enzymes protéolytiques de *B. subtilis, B. amyloliquefaciens* et *Streptomyces sp*

[34] avec un agent réducteur qui active la dégradation des cheveux et aide dans le nettoyage des conduites bouchées.

**a. Production de farine de plumes pour alimentation animale**

De grandes quantités de déchets de plumes sont produites chaque jour par les industries de la volaille**,** l'accumulation de ces derniers mène non pas seulement à la pollution de l'environnement mais aussi au gaspillage de ses protéines. En raison de leur nature insoluble, les plumes sont résistants à la dégradation par les protéases microbiennes communes, à savoir : la trypsine, la pepsine et la papaïne. Jusqu'à ces dernières années, les plumes ont été cuitées à haute température et à pression très élevée pour se transformer en farine de plumes utilisée comme additif alimentaire pour les animaux.

Le traitement hydrothermal, en plus d'être coûteux, a abouti à la destruction de certains acides aminés essentiels, à savoir : la méthionine, la lysine et le tryptophane, ce qui donne un produit de faible digestibilité. En raison des inconvénients multiples du traitement des plumes à haute température, l'utilisation de keratinases microbiennes a augmenté de façon significative, car elles servent d'alternatives intéressantes pour l'hydrolyse des déchets de plumes et la production de farine de plumes très riche sur le plan nutritionnel (riche en cystéine, la valine, thréonine) est relativement peu coûteuse.

L'application de keratinases pour l'amélioration de l'alimentation animale a été examinée en détail en 1998. Ces études ont montré que l'addition de la farine de plumes produite par hydrolyse enzymatique pour le fourrage des animaux, conduit à l'amélioration de la digestibilité et de la croissance.

**b. Traitement des films photographiques**

Les films photographiques sont formés de polyester, comme matière de base, enveloppés par une couche de gélatine et une couche d'argent (1,5 à 2 % par unité de masse). La gélatine, protéine fibreuse formée par des fibrilles de collagène raccourcies par chauffage intense, n'est pas dégradable par la pluspart des protéases. Cependant, cette activité a été observée pour les protéases kératinolytiques. En effet, ces dernières jouent un rôle critique dans la récupération de l'argent qui recouvre les films photographiques. Conventionnellement, cet argent est récupéré par le traitement thermique des films, ce qui est à l'origine de la pollution. Plusieurs protéases ont été utilisées dans ce type d'application, telle que la kératinase alcaline de *B.*

*subtilis* qui permet la décomposition de la couche de gélatine et la récupération de l'argent à la suite d'une incubation à 50-60°C pendant 30 min [35][36].

## I.5. Conclusion

L'utilisation des enzymes dans divers domaines industriels présente donc un fort intérêt et explique les efforts faits ces dernières années par la communauté scientifique dans ce sens. Cependant, 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.

# Chapitre II

## Matériels & Méthodes

# II.1. Introduction

Dans le domaine de la biotechnologie industrielle, les microorganismes restent la source la plus importante pour la production de protéases à caractère agro-alimentaire et industriel. Chez les bactéries, le genre *Bacillus* est le genre le plus étudié dans la production et la commercialisation des protéases. Ces protéases d'origine microbiennes sont souvent optimisées, purifiées et caractérisées pour être utilisées dans différents domaines industriels notamment la détergence. Il est souvent reconnu que la production de ces protéases est largement influencée par les conditions physiques à savoir la température, le pH et le temps d'incubation. Pour cela notre travail est divisé en trois étapes :

- La première étape a été consacrée sur la réactivation de notre souche bactérienne du genre *Bacillus circulans* qui est caractérisée par une importante protéolytique, la production de protéase et caractérisation physico-chimique de cette dernière ;
- Dans la deuxième étape, nous avons évalué le caractère protéolytique de cette protéase en fonction des étapes de purification ;
- La dernière partie a été réservée à la mise en évidence de ces propriétés tensioactives dans le domaine de détergence.

Tous les tests ont été réalisés au niveau des laboratoires du hall technologique de l'université Yahia Farés de Médéa.

# II.2 Matériels

## II.2.1 Matériels biologique

La souche bactérienne (*Bacillus circulans*) unie d'une activité protéolytique sujette de cette étude a été isolée et purifiée au laboratoire du centre de formation professionnel de Sidi Abdelkader de Blida.

## II.2.2 Matériels de laboratoires

a) **Equipements : (**Réfrigérateur, Bain-marie, Agitateur, Centrifugeuse, pH-mètre, Thermomètre, Spectrophotomètre UV –Vis, Balance, Etuve, Autoclave, Conductimètre, Tensiomètre, Moulinette, Shaker…).

**b) Verreries : (**Tubes à essai, Fioles jaugées, Pipettes, Pipettes Pasteur, Erlen-meyers, Eprouvettes, Cristallisoir, Béchers, Spatule, Capsule,…)

**c) Produits et réactifs** : (tous les produits utilisés pendant ce travail sont fournie par L'ADE).

**d) Milieux utilisés**

Tous les milieux préparés lors de ce travail sont stérilisés par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.

❖ **Milieu de Gélose Nutritive au Lait** (GNL)

C'est un milieu solide utilisé pour mettre en évidence le pouvoir protéolytique des souches bactériennes en hydrolysant la caséine du lait introduite dans le milieu. Il se compose de: 5 g peptone; 3 g extrait de levure et 15 g d'agar dans 750 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7 avec du NaOH. Après stérilisation, 250 ml du lait écrémé sont ajoutés ensuite, il est coulé dans des boites de Pétri [37].

❖ **Milieu solide à Base de Farine de plumes** (FBM)

Il contient (en g/l) de : farine de plumes, 5 ; peptone de soja, 2 ; extrait de levure, 3 et 20 g d'agar-agar dans 1000 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH à une valeur désirée. Après stérilisation et refroidissement, le milieu est homogénéisé puis coulé dans des boites de Pétri. Le milieu GNFP est utilisé pour l'isolement et le criblage des clones producteurs des kératinases [38].

❖ **Milieu liquide à base de caséine**

Les protéases alcalines sont produites sur milieu liquide dont la composition est la suivante: 15 g Caséine ; 5 g Peptone; 5 g $CaCl_2$; 1 g $K_2HPO_4$ ; 1 g $KH_2PO_4$ ; 1 g $MgSO_4$, $7H_2O$ ; 3 g NaCl dans un litre d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 10 avec du NaOH (0.1 N) [39].

❖ **Milieu Luria-Bertani (LB) liquide**

Ce milieu contient : 10 g de peptone; 5 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre d'eau distillée (pH =7.4) [40].

❖ **Milieu Lb solide**

C'est le milieu Lb liquide contenant 15g d'agar en plus, il est utilisé pour la conservation des souches bactériennes.

❖ **Préparation de substrat bon marché : Farine de plumes**

Le processus de préparation de la farine de plumes passe par les étapes suivantes : nettoyage des plumes par élimination des saletés et lavages successifs à l'eau de robinet puis avec de l'eau distillée, séchage des plumes et enfin broyage des plumes séchées au moyen d'une moulinette de type Moulinex. Ce processus conduit à l'obtention de plumes finement broyées, homogènes et insolubles appelée farine de plumes.

## II.3. Méthodes

### II.3.1 Réactivation de la souche

Nous avons effectué la réactivation de la souche, répartie dans des cryo-tubes contenant du bouillon nutritif additionné de glycérol stérile et qui a été conservée à T= -20 °C par étalement sur milieu LB solide coulé dans des boites pétri, ensuite les boites ont été incubées à 37 °C pendant 24 h.



**Figure II.1** : La souche *Bacillus circulans*

### II.3.2. Test d'activité protéolytique

Afin de détecter l'activité protéolytique, la souche *Bacillus circulans* a été repiquée sur milieu solide gélose nutritive au lait (GNL) à pH=7 de manière stérile par touches afin

d'obtenir des colonies bien séparées, et incubées dans une étuve à 37 °C pendant des durées de (24, 48 et 72 h).

Après incubation, ce test qualitatif est basé sur la diffusion de protéases secrétées par cette souche dans le milieu de culture et la dégradation de la caséine du lait au tour de la colonie. Ce fait s'explique par l'observation directe d'un halo translucide autour de la colonie avec un diamètre proportionnel à la quantité des protéases libérées par les cellules.

### II.3.3. Test d'activité kératinolytique

Afin de détecter l'activité kératinolytique, la souche *Bacillus circulans* est repiquée par piqure centrale sur milieu solide à base de farine de plume (FBM) à pH=7.2 et incubés à 37 °C pendant 24 h. La recherche d'activité kératinolytique est basée sur l'apparition des halos translucides au tour de la colonie, le diamètre des halos est proportionnel à la quantité de kératinases extracellulaires secrétés par cette souche.

L'apparition des zones de protéolyse (anneau clair) autour de la colonie est le résultat de la réaction d'hydrolyse de la kératine qui donne des acides aminés solubles utilisables.

### II.3.4. Cinétique de croissance

La cinétique de croissance de la souche retenue a été réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml avec un volume utile de 50 ml du milieu contenant du bouillon inoculer avec une colonie important introduit dans les solution ayant une densité optique de 3 unité à 600 nm puis les cultures ont été incubées à T= 37 °C et pH=10 sous une agitation 250 rpm.. Des prélèvements réguliers sont effectués et les activités protéolytiques et la croissance bactérienne ($DO_{600}$) sont évaluées en fonction du temps afin de déterminer le temps de la production maximale de protéase.

### II.3.5. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique, particulièrement l'activité caséinolytique, est mesurée dans le surnageant de culture brut obtenu après centrifugation et elle est estimée selon le protocole de Kembhavi [41] .

❖ **Méthode de Kembhavi**

Afin de rechercher l'activité protéolytique, la souche *Bacillus circulans* est cultivée sur milieu liquide à base de caséine. Le pH de milieu est ajusté à 10 avant stérilisation et l'incubation se fait dans des erlenmeyers stériles de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture. Après ensemencement, l'incubation se fait dans un shaker à 37 °C sous agitation (250 rpm) pendant 4 jours. (Prélèvement chaque 24 h) [41]. L'activité protéolytique a été mesurée dans le surnageant de culture obtenu par centrifugation à 4000 rpm ;

L'activité protéolytique est estimée selon le protocole suivant :

- Mélanger 0,5 ml d'une solution de caséine (1% p/v) dans un tampon désiré en présence de 2 mM $CaCl_2$ avec 0.5 ml de la solution enzymatique préalablement diluée ;
- Incuber, la réaction enzymatique, à une température appropriée pendant 15 min ;
- Arrêter la réaction par addition de 0,5 ml de TCA à 20% (p/v) (le TCA précipite la caséine non hydrolysée) ;
- Incuber à température ambiante pendant 15 min ;
- Centrifuger le milieu réactionnel à 4000 pendant 15 min ;
- Mesurer l'absorbance à 280 nm.

Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzymes qui libèrent 1µg de tyrosine/ml/min dans ces conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage (0à 100µg/ml) de tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions.
Nous avons déduit que 1µg/ml de tyrosine correspond à une DO280 de 0.0055. L'activité est calculée selon la formule suivante [41]:

$$Activité\ protéolytique\ (U/ml) = \frac{DO*D*d}{t*0.0055} \qquad \text{II.1}$$

Avec :

D : Facteur de l'enzyme.

d: Dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel.

T : Temps de la réaction en min.



Milieu liquide( le bouillon nutritif )



Incubation dans un shaker à 37 °C



Centrifugation de milieu réactionnel à 4000 *g




Mesurer l'absorbance à 280 nm

**Figure II.2 :** Dosage de l'activité protéolytique

### II.3.6. Caractérisation physicochimique

#### a. pH-métrie

Le pH (potentiel Hydrogène) mesure la concentration en ions $H^+$ d'une solution. IL traduit ainsi la balance entre un acide et une base sur une échelle de 0 à 14. Le pH a été mesuré sur le terrain à l'aide d'un pH-mètre de type WATERPROOF (pH Tester 10).



**Figure II.3 :** pH-mètrie.

### b. Conductimétrie

La conductivité électrique mesure la capacité d'une solution à conduire le courant entre deux électrodes.

La plupart des matières dissoutes se trouvent sous forme d'ions chargés électriquement. La mesure de la conductivité permet donc, d'apprécier la quantité de sels dissous. Elle a été mesurée avec un conductimètre WTW Cond 197i de la compagnie Allemande.



**Figure II.4 :** Conductimétrie.

### c. Tensiomètre (mesure de la tension superficielle)

Il existe dans la littérature plusieurs méthodes d'étude des propriétés de surface (interface liquide/air ou liquide/liquide). Généralement, les tensions sont mesurées soit par la méthode de Wilhelmy, soit par la méthode de l'anneau de Du Nouy. Dans notre cas, les mesures sont réalisées par un tensiomètre bidirectionnel de type Du Nouy 70545 à anneau en platine. La méthode de mesure est basée sur le principe d'arrachement de l'anneau.

### II.3.7. Purification de la protéase

#### II.3.7.1. Extraits protéolytiques à partir de la souche « *Bacillus circulans* »

Les cellules bactériennes issues des cultures de 48 h de la souche *Bacillus circulans* sont éliminées par centrifugation à 4000 rpm pendant 30 min et à 4 °C (figure II.3.A°. Le surnageant récupéré, contenant l'activité protéolytique, il est clarifié par filtration à travers une membrane de 0,45 µm et gardé en vue de la purification selon la procédure convenable (figure II.3.B).

**A** **B**




**Figure II.5 : A.** Extrait enzymatique **B**. Montage de filtration

#### II.3.7.1. Traitement thermique

Le surnagent obtenu subit un traitement thermique à 80°C pendant 30min, puis centrifugé pendant 30 min à 4000 rpm. Le surnageant contenant l'activité est récupéré pour la suite de la purification. Cette opération a pour but de précipiter une fraction importante de protéines du surnageant par dénaturation thermique, ce qui a pour but d'augmenter l'activité spécifique de l'enzyme recherché.



**Figure II.6 :** Traitement thermique à 80°C

### II.3.7.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

Les protéines sont des molécules très sensibles à leur environnement et peuvent facilement perdre temporairement ou définitivement leurs propriétés biologiques. La précipitation différentielle (fractionnée) est l'une des méthodes les plus rapides qui permet de récupérer les protéines sous forme concentrée tout en gardant leurs activités biologiques. La précipitation est utilisée pour purifier partiellement et concentrer les protéines solubles dans le surnageant. Le sulfate d'ammonium entre en compétition avec les protéines pour réagir avec les molécules d'eau. Ceci entraîne une déssolvatation suivie d'une précipitation. La précipitation fractionnée des protéines a été réalisée par l'addition de sulfate d'ammonium solide en faible quantité au surnageant de culture, sous agitation douce à 4°C jusqu'à 40 % de saturation (242 g/l) ; après 2 h d'agitation les protéines précipités sont récupérées par centrifugation à 4000 rpm pendant 30 min, le surnageant recueilli est additionné de sulfate d'ammonium solide jusqu'à 70 % de saturation (136 g/l).

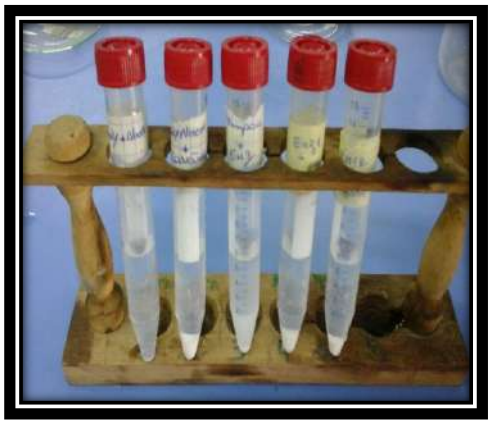


**Figure II.7 :** Précipitation fractionnée par sulfate d'ammonium**.**

## II.4. Application biotechnologique des protéases en détergence

Les protéases sont déjà utilisées depuis de longue date dans la formulation des détergents. Ce sont les enzymes les plus couramment utilisées dans l'industrie des détergents. Elles éliminent les taches dues aux protéines telles que celles contenues dans les œufs, le lait, l'herbe et le sang. Des souillures organiques ont tendance à adhérer fortement aux fibres textiles, car les protéines agissent comme des colles, rendant difficile l'élimination des autres composants de la salissure, tels que pigments et poussières externes ambiantes (saletés de la rue). Or, les protéases fragmentent par hydrolyse, les protéines sont combinées aux tensio-actifs, ces enzymes ont pour effet de dissoudre les taches, même les plus tenaces [42].

### II.4.1 Détermination des propriétés détergentes de la protéase

Des pièces de tissu en coton (8 × 8 cm) portant des taches sèches à base de protéines (jaune d'œuf et chocolat), qui ont été traitées par la protéase et un détergent commercial, durant 1 h à 40 °C dans un Erlenmeyer sous agitation (250 rpm) et sous différentes conditions :

**1.** 100 ml d'eau distillée ;

**2.** 100 ml d'eau distillée + solution de détergent commercial (iSiS) à 7 mg/ml ;

**3.** 100 ml d'eau distillée + protéase ;

Les pièces de tissus sont par la suite rincées à l'eau distillée, séchées puis contrôlées à l'œil nu.

## II.5. Conclusion

En conclusion, nous avons vu qu'afin de recueillir le plus objectivement possible les données nécessaires à la bonne réalisation de ce travail et dans le souci de bien cerner tous aspect du problème de recherche, il nous est utile de recourir aux méthodes et techniques de recherche.

Tout d'abord, les méthodes utilisées dans notre travail sont débutées par la réactivation de la souche dans un milieu LB solide qui permet de voir le développement bactérien sur la surface de gélose, ensuit nous avons fait un test qualitatif sur un milieu GNL solide, nous permet de mettre en évidence l'activité protéolytique de notre bactérie.

Par la suite, une extraction et purification de l'enzyme protéolytique passant par un traitement thermique de la solution enzymatique, puis une précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium, ainsi suivie d'une caractérisation physico-chimique de la protéase semi-purifiée**.**

La dernière étape a été la mise en évidence de notre enzyme protéolytique dans le domaine de w détergence.

# Chapitre III

## Résultats & Discussions

# III.1. Introduction

Le défi consiste actuellement à découvrir des enzymes, qui répondent convenablement aux contraintes techniques et économiques des procédés de biocatalyse industrielle moderne, à s'avoir des enzymes plus stables dans des conditions extrêmes (pH alcalins, températures élevées, pression, présence d'agents dénaturants, de détergents, solvants organiques, etc.), et qui soient les plus actives, stables et sélectives possible. La diversité microbiologique est en fait la majeure ressource pour les processus de production biotechnologiques. Ceci est dû à la diversité physico-chimique des habitats des microorganismes. Donc, la recherche de microorganismes producteurs d'enzymes, pouvant présenter des caractéristiques innovantes et nouvelles, et de plus en plus importante.

Au cours de ce travail, nous avons poursuivi le programme de caractérisation physico-chimique et tensiométrique des protéases microbiennes issue de *Bacillus circulans* d'intérêt biotechnologique.

En plus, nous avons purifiée notre protéase afin d'évaluer l'effet de purification sur ces propriétés.

### III.1.1. Réactivation de la souche *Bacillus circulans*

La réactivation de la souche par ensemencement quadratique à partir de la culture stockée dans des cryo-tubes sur milieu LB solide coulé dans des boite pétri et incubé à 37 °C pendant 24h, nous a permis la reproduction de la souche et ceci se traduit par la croissance et développement de la souche sur la surface du milieu.



**Figure III.1 :** Ensemencement sur un milieu LB solide

### III.1.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique de la souche « *Bacillus circulans* »

Il s'agit d'un test microbiologique d'identification sur gélose nutritive au lait, la souche *Bacillus circulans* se développe facilement sur milieu GNL solide et présente un halo transparent entourant la colonie, l'apparition de ce halo se traduit par le fait que les protéases secrétées par les souches protéolytiques vont diffuser dans la gélose environnante et elles vont ainsi hydrolyser les caséines du lait. Le diamètre d'halo est proportionnel soit à la quantité de protéases libérées par les cellules, soit à la diffusion des enzymes secrétées dans le milieu pendant le temps d'incubation. Ce test reste semi-quantitatif.



**Figure III.2 :** Mise en évidence d'activité protéolytique produite par la souche *Bacillus circulans* sur GNL (test-semi qualitatif).

D'après la figure (III.2), on peut constater que l'activité protéolytique a été mise en évidence après purification des souches afin d'éviter tous type de contamination par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie. Ce test qualitatif indique la diffusion des protéases secrétées dans la gélose environnante tout en hydrolysant les protéines du lait (les caséines).

### III.1.3. Mise en évidence de l'activité kératinolytique de la souche « *Bacillus circulans* »

En vue de tester l'activité des protéases kératinolytiques, notre souche a été repiquée sur milieu FBM solide (test semi-quantitatif). Les résultats obtenus montrent que cette souche peut dégrader la farine de plumes et croître sur ce milieu après une incubation de 48 h à 37 °C (Figure III.3).

Ceci est confirmé par l'apparition d'une zone claire autour de colonie qui indique la diffusion des enzymes secrétés dans le milieu pendant le temps d'incubation. En plus, le diamètre de la zone claire est proportionnel à la quantité des kératinases secrétés par notre souche.



**Figure III.3** : Mise en évidence d'activité kérationlytique produite par la souche *Bacillus circulans* sur FBM (test-semi qualitatif).

### III.1.4. Cinétique de croissance de la souche « *Bacillus circulans* »

Des mesures de la densité optiques ont été réalisées à 600 nm dans des intervalles de temps bien déterminés (2, 4, 6, 8 et 24 h). Les résultats obtenus sont représentés graphiquement par la figure III.4.

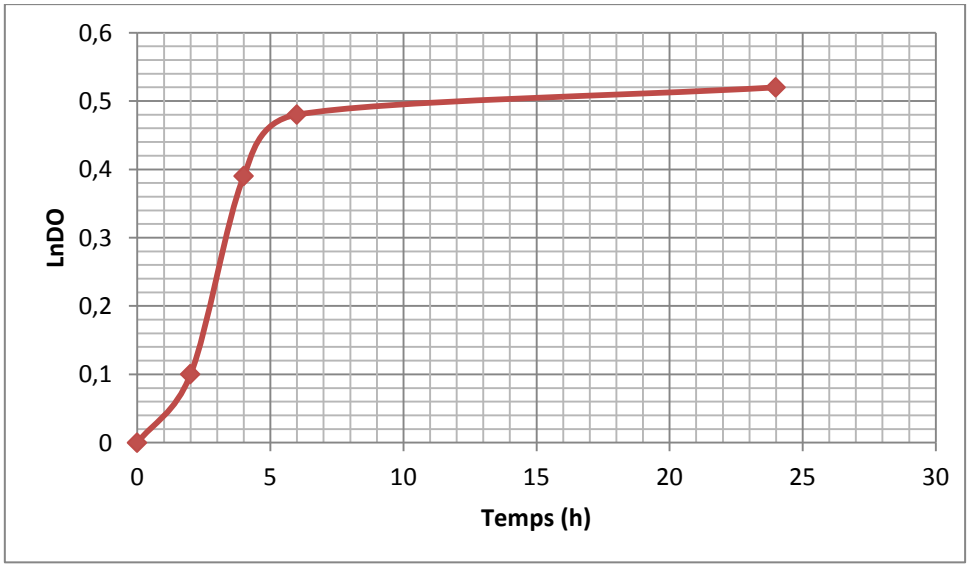



**Figure III.4** : Le profil de croissance de la souche *Bacillus circulans* en fonction du temps

D'après le profil de croissance, on remarque les différentes phases de croissance d'un microorganisme :

- Une phase de latence qui correspond à une période d'adaptation de la souche au milieu nutritif proposé et essentiellement à la synthèse des enzymes nécessaires pour métaboliser les nutriments. La durée de cette phase varie principalement avec : la taille de l'inoculum ayant servi à l'ensemencement, l'âge des cellules et leur état physiologique, et la nature du milieu. Dans notre cas, on constate que cette phase est très courte ;
- 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 qui correspond à 6 h. Pendant cette phase, la population est homogène et chaque cellule possède pratiquement les mêmes propriétés chimiques et physiologiques ;
- La phase stationnaire commence au moment où 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.

Des mesures de pH ont été effectuées afin de connaitre l'effet de production des protéases sur milieu de croissance. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau III.1, ils montrent clairement que la souche *Bacillus circulans* pousse très bien sur le milieu de culture utilisé. On remarque aussi que le pH est variable et tend vers la neutralité.

**Tableau III.1** Résultats du pH lors de la croissance de la souche *Bacillus circulans*

| **t(h)** | **2** | **4** | **6** | **24** |
|---|---|---|---|---|
| **pH** | 9.28 | 8.89 | 8.70 | 7.20 |

### III.1.5. Caractérisation physico-chimique et tensiometrique de la protéase sécrétée par la souche *Bacillus circulans*

Nous nous sommes proposé pour la suite de ce travail, de caractériser les préparations protéolytiques de la souche *Bacillus circulans*. Ainsi, nous avons été amenés à déterminer le temps optimal de production des protéases et même évaluer les variations du pH, de la conductivité électrique et de la tension superficielle. Pour cela, une culture de la souche *Bacillus circulans* dans le milieu liquide à base de caséine a été réalisée pendant 96 h à 37°C sous une agitation de 250 rpm. Des échantillons prélevés tous les 24 h subissent des analyses physicochimiques afin de déterminer la variation de leurs propriétés en fonction de la production des protéases. Le Tableau III.2 présente l'évolution des différents paramètres physico-chimiques de la production des protéases par la souche *Bacillus circulans* en fonction du temps.

**Tableau III.2** : Résultats des différents paramètres physico-chimiques de la production des protéases par la souche *Bacillus circulans*.

| **t(h)** | **0** | **24** | **48** | **72** | **96** |
|---|---|---|---|---|---|
| **pH** | **9.98** | **7.20** | **6.96** | **6.7** | **6.08** |
| **Conductivité (mS/cm)** | **13.66** | **12.36** | **10.34** | **7.43** | **6.30** |
| **Tension superficielle (dyne/cm)** | 37.8 | 37.4 | 37.2 | 36.1 | 36.0 |

L'examen du Tableau III.2 montre clairement qu'il y a une diminution de pH des solutions enzymatiques, cette diminution de pH peut être expliquée par l'augmentation de la teneur des acides (acides aminés) dans le milieu issu de l'hydrolyse de la caséine par les protéases sécrétées par la souche *Bacillus circulans*.

Par contre, on note une diminution de la conductivité électrique des solutions enzymatiques en fonction du temps. Cela peut être traduit par la diminution du caractère ionique des solutions enzymatiques par la neutralisation des charges des acides aminés libérés. Ou bien leurs utilisations comme nutriment pour le développement et la croissance de la souche.

En plus, les mesures de la tension superficielle qui est un paramètre physico-chimique important permettant la caractérisation d'un tensioactif dans le but de déterminé les propriétés

superficielles de notre solution enzymatique. Dans ce cas, les mesures de la tension superficielle ont été effectuées sous une ambiance de 20°C.

Les variations de la tension de surface en fonction du temps sont aussi illustrées sur le tableau III.2. L'analyse de ces résultats montre globalement que la solution enzymatique a une activité de surface, puisque leurs tensions superficielles sont inférieures à celle de l'eau distillé ($\gamma$<73.3 dyne/cm à 20°C), et que leurs tensions de surface diminue en fonction du temps pour se stabiliser à une valeur relativement constante, c'est une caractéristique des tensioactifs ioniques en solution aqueuse.

### III.1.6. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique de la souche *Bacillus circulans* a été mesurée suivant la méthode de kembhavi dans le surnagent de culture ou la solution enzymatique est récupérée dans les conditions de pH=10 et température adéquate 37 °C. Les valeurs obtenues à partir du dosage de l'activité protéolytique sont représenté dans la figure III.5.

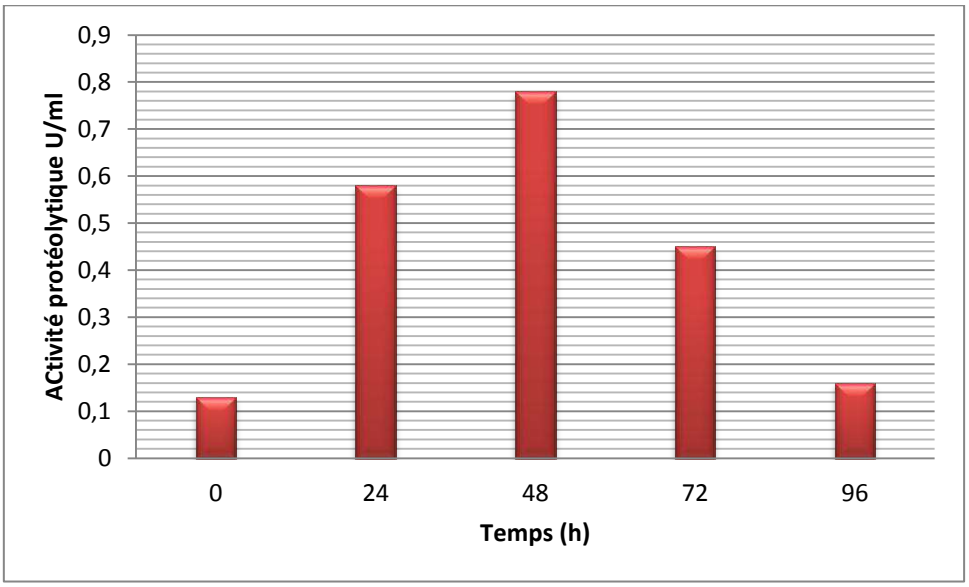



**Figure III.5 :** Profiles de l'activité protéolytique en fonction du temps.

L'analyse de la figure III.5 montre clairement que la souche sécrète des protéases alcalines. En effet, une meilleure production est observée après 48 h sur milieu. Ce qui nous amène à le considéré comme temps optimal de production des protéases.

Au-delà des 48 h, la production des protéases commence à diminuer. Cette diminution est probablement due à une dégradation par les enzymes endogènes libérés suite à la lyse cellulaire ou à une auto-protéolyse. On peut aussi expliquer cette diminution par plusieurs phénomènes tel que:

- L'épuisement du milieu en nutriment ;

- Inhibition par excès de production de protéase ;
- Le vieillissement des souches.

Alors, les résultats de ce dosage montrent que le temps qui correspond à une activité protéolytique maximale est de **48h** qui peut être considéré comme le temps optimal pour poursuivre la purification de cette protéase.

## III.2. Purification de la protéase produite par la souche *Bacillus circulans*

A la lumière des résultats de la caractérisation physico-chimique et protéolytique de la préparation enzymatique de la souche *Bacillus circulans*, s'avère être productrice de protéase alcaline produit une ou plusieurs protéases actives dans un pH=10 à un temps optimal de 48h.

Ce résultat nous pousse à mieux connaitre ces propriétés. Pour cela, une autre caractérisation physico-chimique et protéolytique est réalisée en fonction des étapes de purification.

Le surnageant de culture de la souche *Bacillus circulans* après 48 h de croissance sur le milieu constitue l'extrait enzymatique brut. Le protocole expérimental de purification de cette protéase comporte deux étapes : un traitement thermique (30 min à 80 °C) et une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (40-70%).

### III.2.1. Traitement thermique

Le surnageant obtenu après la centrifugation de la culture subi un traitement thermique à 80 °C pendant 30 min, puis centrifugé une deuxième fois pendant 30 min à 4000 rpm. Le surnageant récupéré contient l'activité protéolytique. Cette opération a pour but de précipiter une part importante de protéines du surnageant par dénaturation thermique, ce qui a pour but d'augmenter l'activité.

### III.2.2. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

Les protéines contenues dans le surnageant récupéré sont précipitées au sulfate d'ammonium entre 40 % et 70 %. Les protéines précipitées à 40% ne contiennent pas l'activité protéolytique alors que le culot obtenu à 70% contenant la majorité de l'activité, il est récupéré dans le minimum du tampon.

### III.2.3. Bilan de purification

Le bilan de purification de la protéase produite par la souche *Bacillus circulans* est représenté dans le tableau III.3.

**Tableau III.3** : Résultats de purification de la protéase.

| | **Extrait brut** | **Traitement thermique 30 min à 80 °C** | **Ajout de sulfate d'ammonium à 40%** | **Ajout de sulfate d'ammonium à 70%** |
|---|---|---|---|---|
| **Activité protéolytique (U/ml)** | 0.78 | 1.61 | 1.74 | 2.56 |
| **Rendement de purification** | 1 | 2.06 | 2.23 | 3.28 |

D'après ces résultats, la protéase produite par la souche *Bacillus circulans*, a été purifiée à homogénéité à partir du milieu de culture en deux étapes, avec un facteur de purification de 3.28 fois (Tableau III.3).

### III.2.4. Caractérisation physico-chimique et tensiométrique de la protéase semi-purifiée.

Afin de caractériser la protéase sécrétée par la souche *Bacillus circulans*, nous nous sommes proposé d'étudier l'influence des étapes de purification sur les propriétés physico-chimique et tensiométrique. Les résultats sont consignés dans le tableau III.4.

D'après les résultats obtenus, on note une diminution remarquable de la conductivité au cours de la purification, qui passe de **10.28** pour l'extrait brut à **8.33** pour l'extrait purifié par le sulfate d'ammonium à 70%. La même remarque concerne le pH qui passe de **7.11** jusqu' à **5.77**. Ces diminutions peuvent être exprimées par l'élimination de certaines protéines en libérant des acides aminés.

**Tableau III.4** : Résultats de la caractérisation physico-chimique après la purification de la protéase.

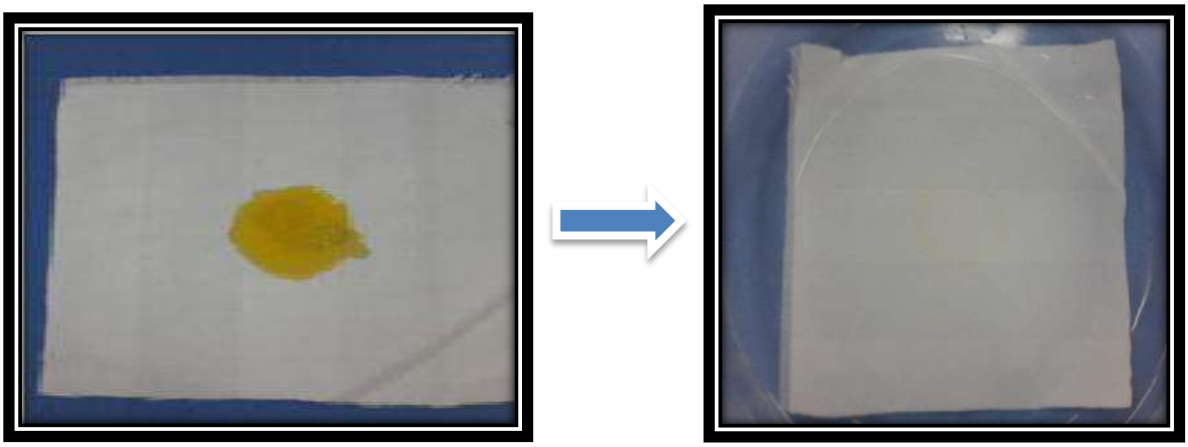
| | **Extrait brut** | **Traitement thermique 30 min à 80 °C** | **Ajout de sulfate d'ammonium à 40%** | **Ajout de sulfate d'ammonium à 70%** |
|---|---|---|---|---|
| **pH** | 7.11 | 6.83 | 5.90 | 5.77 |
| **Conductivité électrique (mS/cm)** | 10.28 | 10.04 | 8.65 | 8.33 |
| **Tension superficielle (dyne/cm)** | 37.8 | 41.5 | 39.9 | 39 |

En plus pour la tension superficielle, on remarque une phase d'augmentation lors du traitement thermique de la solution enzymatique suivie d'une phase de diminution après les étapes de précipitation fractionné au sulfate d'ammonium. Ce phénomène peut être expliqué par la nature de la partie de protéine éliminé lors des étapes de purification. En plus, on peut constater que notre solution est menée d'une activité de surface qui peut être introduite dans la formulation des détergents.

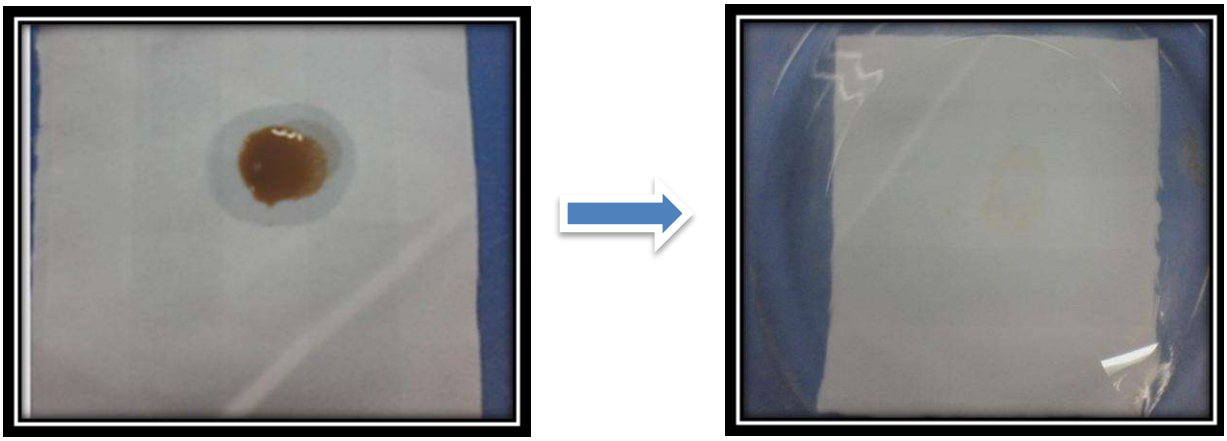
## III.3. Mise en évidence de la protéase dans la détergence

Nous avons procédé à des tests visuels d'évaluation des performances détergente de la protéase produite par la souche *Bacillus circulans* dans la disparition des taches du jaune d'œuf et du chocolat sur le tissu. Le lavage est mené à 40 °C pendant 30 minutes (figure III.6).

D'après la figure III.6, on remarque que l'ajout de la protéase produite par la souche *Bacillus circulans* à l'eau améliore les performances du détergent dans le sens d'une meilleure décoloration des taches du chocolat et jaune d'œuf. Des travaux similaires ont montré la capacité des protéases alcalines dans l'élimination des taches à base de protéine (ex : sang), en tenant l'exemple de la protéase alcaline thermostable produite par la souche *Bacillus alveayuensis* CAS 5 qui a éliminée totalement le sang suite à sa combinaison avec un détergent à concentration de 5 mg/mL pendant 20 min [43].



Une Tache de jaune d'œuf après l'ajout de protéase



Une Tache de chocolat après l'ajout de protéase

**Figure III.6 :** Mise en évidence des propriétés détergente de la protéase produite par la souche *Bacillus circulans*

## III.4. Conclusion

Les résultats obtenus dans cette étude sont présentés en 3 parties.

- La partie 1 présente les résultats de «la réactivation de notre souche bactérienne du genre *Bacillus circulans* sur un milieu LB solide».
- La partie 2 présente les résultats sur «l'extraction et la purification d'enzyme protéolytique et sa Caractérisation physico-chimique **»**.
- La partie 3 présente les résultats de « l'application biotechnologique de l'enzyme protéolytique dans la détergente ».

Ces résultats préliminaires nous ouvrent des portes que ces protéases d'origine microbiennes sont souvent optimisées, purifiées et caractérisées pour être utilisées dans différents domaines industriels notamment la détergence.

# Conclusion générale

## CONCLUSION GENERALE

Les protéases microbiennes, en particulier celles produites par le genre *Bacillus* 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. Les protéases détergentes et celles impliquées dans la dépollution forment le groupe d'enzyme le plus recherché grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la substitution des agents chimiques toxiques, l'obtention de nouvelles protéases pourrait soit conduire à de nouvelles applications biotechnologiques, soit à une amélioration des performances des enzymes existantes. L'application éventuelle de ces protéases intéressantes au niveau industrielle passe par la mise au point d'un procédé de production économique et reproductible. Ceci sera possible par la construction de souches hyper-productrices de ces enzymes et par l'optimisation des conditions de production.

A cet effet, l'objectif principal de ce travail était à l'origine, la caractérisation physico-chimique et tensiométrique d'une protéase alcaline produite par une souche de *Bacillus circulans*.

Pour cela, une première partie a été consacrée à l'analyse théorique et bibliographique sur les enzymes, en nous focalisant plus particulièrement sur les protéases, ses structures, ses mécanismes d'action et ses applications.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à la réactivation et l'évaluation du caractère protéolytique de cette protéase alcaline produite par la souche sujette de notre travail. Ensuite, nous avons passé à la caractérisation physico-chimique de cette protéase.

Une troisième partie a porté sur la purification et la caractérisation physico-chimique et tensiomertique de la solution enzymatique semi-purifiée produite par la souche *Bacillus circulans,* et la mise en évidence de ses propriétés détergente

A la lumière des résultats obtenus, on note :

- Un meilleur niveau de production après 48h de croissance à 37°C ;

- La protéase produite par la souche *Bacillus circulans* a été purifiée à partir du milieu de culture avec un facteur de purification de 3.28 fois.

En tenant compte de toutes ces données, nous constatons que la protéase sécrété par cette souche semblent être intéressantes et pourraient être utilisées avec succès dans différentes des applications industrielles comme la détergente.

Néanmoins, il existe encore des possibilités d'amélioration, non seulement au niveau de la recherche d'autres souches plus performantes, mais également au niveau de l'enzyme elle-même et ses caractéristiques intrinsèques. Dans ce contexte, divers problèmes doivent être résolus pour que l'on puisse tirer parti de ces possibilités et atteindre efficacement l'objectif visé.

En perspectives on se propose à évaluer la capacité et les performances de l'enzyme dans la détergence et la dépollution.

# Références Bibliographiques

**1.** Rahman, R.N.Z.R.A, Geok, L.P., Basri, M., Saleeh, A.B., *An organic solvent-tolerant protease from Pseudomonas aeruginosa strain K, nutritional factors affecting protease production*. Enz Microb Technol, Vol. 36, 2005, p. 749-757.

**2.** Leisola M, Jokela J, Pastinen O, Turunen O., *Industrial use of enzymes. In: Encyclopedia of Life Support Systems*. EOLSS Publishers Co. Oxford UK, 2001.

**3.** Gupta, R., et al., *An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases.* Appl Microbiol Biotechnol, 2002a. **60**(4): p. 381-95.

**4.** Fujinami, S. and M. Fujisawa, *Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes--past, present and future.* Environ Technol, 2010. **31**(8-9): p. 845-56.

**5.** Ogawa, J. and S. Shimizu, *Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan.* Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(4): p. 367-75.

**6.** Maurer, K.-H., *Detergent proteases.* Current Opinion Biotechnol, 2004. **15**(4): p. 330-334.

**7.** Niyonzima, F.N. and S. More, *Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis.* Prep Biochem Biotechnol, 2015. **45**(3): p. 233-58.

**8.** Lalmanach, G., *Proteolytic enzymes: from structures to transport pathways.* Biochimie, 2008. **90**(2): p. 191-3.

**9.** Han, J., et al., *An anticoagulant serine protease from the wasp venom of Vespa magnifica.* Toxicon, 2008. **51**(5): p. 914-922.

**10.** Shpacovitch, V., et al., *Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity.* J Leukoc Biol, 2008.

**11.** Meunier, **N**., *Evaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales*. Mémoire de maitrise, INRS-Eau, Université du Québec, Canada, (1999), p.168.

**12.** Prescott. L, Harley, A.M et Klein, D.A**.,** «*Microbiology* ». $2^{e}$ Edition. Deboeck-Wesmael, Bruxelles, Belgique, (1995), p: 10-14.

**13.** Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. et Deshpande, V.V., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*", Microbiol, Mol, Biol, Reviews, 62, (1998), p. 597-635.

**14.** Krazimir, K., Istvan, L., Kirill, T. and Raymund, M., *Regulation of fibrinolytic activity of neutrophil leukocyte elastase, plasmin and miniplasmin by plasma protease inhibitor*s. *J. Biol, Chem*, 24, (1994), p. 17030-17034.

**15.** Dahlback, B**.**, *Blood coagulationé. Lancet.*, 355, (2000), p. 1627-32

**16.** B. Augère , *les enzymes biocatalyseur protéique.* (2001).

**17.** Neklyudov A.D., Ivankin A.N., Berdutina A.V, *Properties and uses of protein hydrolyates* (review). App Biochem Microbiol, 2000, 36: p. 452-459.

**18.** Hajji M., Rebai A., Gharsallah N., Nasri, *Optimization of alkalin protease production by Aspergillus clavatus ES1 in Mirabilis Jalapa tuber powder using statistical experimental design*. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 79: p. 915-923.

**19.** Gupta R., Beg Q. K. and Lorenz P**,** *Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59: p.15-32.

**20.** Sumantha A., Deepa1 P., Sandhya C., Szakacs G., Soccol C. R. and Pandey A, *Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2006, 49 (5): p. 843-851.

**21.** George S., Raju V., Krishnan M.R.V., Subramanian T.V., Kunthala J, *Production of protease by Bacillus amyloliquefaciens in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides nd skins*. Procees Biochemistry, 1995, 30: p. 475-462.

**22.** Bernal C., Cairo J., Coello N, *Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from Kocuria rosea.* Enz Microb Technol, 2006, 38: p. 49-54.

**23.** Anbu P., Gapinath S.C., Hilda A., Lakshmipriya T., Annadurai G, *Optimizations of extracellular keratinase production by poultry farm isolate Scopulariopsis brevicaulis*. Bioresour Technol, 2007, 98: p. 1298-1303.

**24.** Scott J.A., Unterreinen W.A, *Determination of kératin degradation by fungi using keratin azure*. Med Mycol, 2004, 42: p. 239-246.

**25.** Schor R., Krimm S, *Studies on the structure of feather keratin II. A, helix model for the structure of feather keratin*. Biophys J, 1961, 1(6): p. 489-515.

**26.** Essien J.P., Umoh A.A., Akpan E.J., Eduok S.I., Umoiyoho A. Growth, *keratinolytic proteinase activity and thermotolerance of dermatophytes associated with alopecia in Uyo, Nigeria. Acta* Acta Microbiol Immunol Hung. 2009, 56: p. 61-69.

**27.** Filipello Marchisio V., Fusconi A., Querio F.L. *Scopulariopsis brevicaulis: a keratinophilic or a keratinolytic fungus*. Mycoses. 2000, 43: p. 281-292.

**28.** Albert L. *Lehninger Principes de biochimie*. Kamonn P. Traduction en français :chapitre 7 : les protéines fibreues. France, 1985, p. 147-163.

**29.** Hermann H.B., Dominique G.H. *Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia*. J. Anat. 2009, 214: p. 516-559.

**30.** Gross R. *Water soluble compounds (non-keratins) associated with the plumage of the pigeon (Columbia livia*). J Exp Med Sci. 1956, 34: p. 65-70.

**31.** Cheng-gang C., Bing-gan L., Xiao-dong Z. *Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of Bacillus substilis*. J Zheji Univ Sci B. 2008, p. 60-67.

**32.** Fakhfakh-Zouari N. Kératinases de Bacillus licheniformis RPk et Bacillus pumilus A1: *production, purification, caractérisation et applications biotechnologiques.* Thèse de Doctorat. Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Tunisie, 2010.

**33.** Dalev P.G., *Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate.* Bioresour Technol. 1994, (48), p. 265-267.

**34.** Jacobson J.W., Glick J.L., Madello K.L., *Composition for cleaning drains clogged with deposits hairs*. US Patent. 1985, 4: p.540-506.

**35.** Fujiwara N., Tsumiya T., Katada T., Hosobuchi T., Yamamoto K., *Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme*. Process Biochem. 1989, 24: p. 155-156.

**36.** Fujiwara N., Yamamoto K., Masui A., *Utilization of a thermostable alkaline protease from an alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray film*. J. Ferment Bioeng. 1991, 72: p. 306-308.

**37.** Debananda S., Pintubala K., Suchitra S., Salam N., *Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkali thermotolerant indigenous actinomycetes*. World Appl Scie J. 2009, 7: p. 907-916.

**38.** Williams C. M., Richter C. S., Kenzie J., Shih M., *Isolation Identification and characterization of a feather-degrading bacterium*. Appl Environ Microbiol. 1991, 56: p. 1509-1513.

**39.** Jaouadi B., Abdelmalek B., Fodil D., Ferradji F., Rekik H., Zaraî N., Bejar S., *Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from Streptomyces sp. strain AB1 with high stability in organic solvents*. Bioresour Technol, 2010, 101: p. 8361-836.

**40.** MillierJ.H, *Experiments in molecular genetics. Cold spring Harbor Laboratory*. Cold spring Harbor, N.Y. 1972, p. 431-435.

**41.** Kembhavi, A A, Kullkarni, A & Pant, A, *Salttolerant and thermostable alkalien protease from Bacillus subtilis*. NCIM No. 64, Appl. Biochem.Biotechnol, 1993, 38, p. 83-92.

**42.** Les enzymes dans la technologie des détergents (page consultée le 02 Juin 2016) [en ligne] Adresse URL : http://www.skwcds.ch/fileadmin/skwcdsch/03_Wasch_und_Reinigungsmittel/Info_Corner/Publikationen/Les_enzymes_dans_la_technologie_des_detergents.pdf

**43.** Annamalai N., Rajeswari M.V., Balasubramanian T. *Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from Bacillus alveayuensis CAS 5 using marine wastes.* Food and Bioproducts Processing, 2014, 92 p. 335-342.