MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DR. YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE 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

Spécialité : Bioprocédés pharmaceutiques

THEME

Production et purification d'une enzyme protéolytique et sa mise en evidence dans un procédé industriel

Proposé et dirigé par :

Mme. Benkiar Amina

Préparé et présenté par :

Melle. Hamdani Hadjer

Melle. Zouaoui Lynda

Année Universitaire 2013-2014

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de hall technologie de l'Université ***Yahia Farés de Médéa***

Nous souhaitions adresser nous remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Nous tenons à présenter nos vifs remerciements, les plus sincères à notre promotrice madame ***Amina Benkiar*** pour l'aide et le soutien qu'elle nous a apportés,

et pour ses précieux conseils qu'elle nous a fournis durant la réalisation de ce mémoire

Nous tenons également à remercier les membres du jury, qui ont bien voulu accepter de porter leur jugement sur ce travail que nous souhaitons à la mesure de leur satisfaction.

N'oublions pas, en signe de gratitude de rendre hommage à tous les enseignants des sciences et technologie.

Zouaoui Lynda & Hamdani Hadjer

Dedicace

A mes parents qui ont éclairé mon chemin,qui mon assister moralement et matériellement durant tout mon cursus de formation.

À tous mes proches de la famille Hamdani, et plus particulièrement, mes sœurs et mes frères tout à son nom .

A mon mari Yacine, je n'oublierai jamais ton soutien et tes encouragements, aucune dédicace ne pourra

exprimer mon profond amour et respect.

A ma chère amie, ma binôme, Lynda qui m'a supporté durant ces cinq

dernières années.et chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin.

A mes meilleurs amis : fella- Amina- fatiha- anissa- Affaf- Sabrina- Amina-Imene-soumia.

A une personne très chère pour moi qui n'est pas là aujourd'huit

Et enfin, à tous mes collègues de la promotion 2ème année Master Bioprocédés 2014.

Hadjer

Dédicace

Je dédie ce mémoire à ma famille, notamment:

A mes parents qui ont éclairé mon chemin,

Qui m'assister moralement et matériellement durant tout mon cursus de

Formation.

À tous mes proches de la famille ZOUAOUI, et plus

Particulièrement, mes sœurs et mes frères tout à son nom

A mon neveu mon petit « nounours » MOHAMMED

YACINE

Sans oublier son père

A ma chère amie, ma binôme, Hadjer qui m'a supportée durant ces cinq

dernières années.et chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin.

A tout mes amies

A mes meilleurs amis : Anissa- Affaf- Sabrina- Amina-

Saliha-Imene-Nour elhouda et khalida.

A une personne qui est très chère pour moi et qui n'est pas là aujourd'huit

Et enfin, à tous mes collègues de la promotion 2ème année Master Bioprocédés 2014.

Z.LYNDA

sommaire

Remerciement
Dédicace
Sommaire
Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des abréviations
Résume
Introduction générale…… 01

Etude bibliographique

I.1Introduction……. 03
I.2. Définition…….…. 03
I.3. Structure d'enzyme……... 04
I.4. Nomenclature & classification……. 05
I.5. Source des enzymes……. 07
I.6.Avantages des enzymes d'origine microbienne…… 08
I.7. Propriétés d'une enzyme ……. 09
I.7.1 la réaction biochimique…… 09
I.7.2 la réaction enzymatique…… 09
I.7.3 mode d'action des enzymes…… 10
I.7.4dénaturation d'une enzyme…….. 12
I.7.5 éstimation de l'activité enzymatique…….……. 12
I.8. Marché des enzymes ……. 15
I.9 les protéases…….…… 16
I.9.2 classification des protéases ……. 17
I.9.3 Origines des protéases……. 19
I.9.4 Protéase alcalines……. 22
I.9.5. Applications des protéases alcalines……... 24

I.9.5.1. Industrie du détergent ……. 24
I.9.5.2. L'industrie du cuir…… 25
I.9.5.3. Récupération de l'argent ……. 25
I.9.5.4. Usages médicaux …… 25
I.9.5.5. Industrie alimentaire …… 26
I.9.5.6. Traitement des déchets …… 26
I.9.5.7. Industrie chimique…… 26
I.10. Conclusion…… 27

Matériels et méthodes

II.1 Introduction……..... 28
II.2. Matériels & méthodes ……... 28
II.2.1. Matériels biologique ……... 28
II.2.2. Verrerie et petit matériel……... 28
II.2.3. Produits et réactifs…… 29
II.2.4. Méthodes…… 31
II.2.4.1 Réactivation de souche …….. 31
II.2.4.2 test de l'activité protéolytique…….. 31
II.2.4.3. Identification de la souche bactérienne…….. 31
a. Observation àl'état frais…….. 31
b. coloration de gram ……... 32
c. test de catalase …….. 32
d. test d'oxydase…….. 32
e. Galerie API CH50…… 33
II.2.4.4. Dosage de l'activité protéolytique ……... 34
II.2.4.5 Extraction de l'enzyme protéolytique …… 35
II.2.4.6. Purification de l'enzyme protéolytique……... 35
a. Traitement thermique ……. 35
b. Précipitation par sulfate d'ammonium……. 35

c. La dialyse ……. 36
II.2.4.7. Immobilisation de l'enzyme……... 37
II.2.4.8. Mise en évidence de l'activité protéolytique (Kératinolytique)…… 37
II.2.4.9.Conclusion……. 40

Résultats et discussions

III.1 Introduction…….. 41
III.2. réactivation de la souche…….. 41
III.3 Test qualitatif de l'activité protéolytique…….. 42
III.4 identification de la souche ……. 43
III.4.1 Caractéristique morphologique et physiologique…….. 43
III.4.2 Caractéristique biochimique……. 45
III.5 Dosage de l'activité protéolytique ……..…… 47
III.6. purification de la solution enzymatique……. 48
III.6.1 traitement thermique…… …… 48
III.6.2 précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium…….. 48
III.6.3. dialyse de la solution enzymatique……. 48
III.7. Immobilisation de protéase …… 50
III.8 Mise en évidence de l'activité protéolytique (Kératinolytique) ….. 50
III.9. Conclusion …….. 53
Conclusion générale 54
Annexe
Annexe N°1…….. 56
Annexe N°2…….. 58
Annexe N°3…….. 60
Références et bibliographie

Liste des figures

Figure I.1 : Diagramme d'une réaction catalytique qui montre l'énergie (E) requise à différentes étapes suivant l'axe du temps (t)……04

Figure I.2:formation de complexe enzyme-substrat (réaction enzymatique)…… …….05

Figure I.3 : réaction enzymatique……..……..10

Figure I.4 : les voix métaboliques…….……..12

Figure I.5 : Effet de la température sur l'activité enzymatique……13

Figure I.6 : variation de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de pH ……..14

Figure I.7 :l'fluence de la concentration du substrat sur la vitesse d'une réaction enzymatique…….….14

Figure I.8 : parts de marché occupées par les enzymes dans déférents secteurs……...……..15

Figure II.1 :l'encemencement des galeries API 50 ……..……..33

Figure II.2 : traitement thermique de la solution enzymatique ……..35

Figure II.3 : dialyse de la solution enzymatique……...…36

Figure III.1: Le développement de la souche dans le milieu LB solide……...…...…42

Figure III.2 : Aspect des halos produits par la souche protéolytique sur GNL (photos originales)…….…….42

Figure III.3 : Aspect des cellules bactériennes sous microscope optique (G×100)…….43

Figure III.4 : Test de la catalase ……..…44

Figure III.5 Le test biochimique en utilisant la galerie API CH50 ……..…….…45

FigureIII.6: Action des protéases semi purifier sur une peau d'animal…….…….51

FigureIII.7: Elimination des poiles par l'enzyme semi-purifier encapsulé…….…….51

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Les producteurs commerciaux de protéases alcalines ……24

Tableau III.1 : Résultats des tests morphologiques et physiologiques……..……45

Tableau III.2: Résultats de la galerie API 50 CH de la souche……..……46

Tableau III.3 : l'activté proteolytique à déffirents états ……...……..…49

Liste des abréviations

- Aas: acides amines
- Ap: activité enzymatique partielle
- $A_{t:}$ activité enzymatique totale
- Da: Dalton
- (DFP): di-isopropylfluorophosphate
- Do: densité optique
- E: enzyme
- (E.C): Enzyme Commission
- (ES): enzyme-substrat
- (EDTA): l'acide diaminetétracétique éthylène
- GNL: gélose nutritive au lait
- LB: milieu de Lysogeny Broth
- (MEC): la matrice extracellulaire
- (pCMB): p-chloromercure benzoate
- pH: puissance en hydrogène
- (PMSF): phenylmethylsulphonylfluoride
- Rpm: tour par min
- [S]: substrat
- TCA: trichlorrure acide acitique
- (TLCK): Na-tosyl-L-lysine chloromethylketone
- UI: unite international

Résumé

Les protéases sont le groupe le plus important d'enzymes industrielles qui représentent environ 60% des enzymes totales sur le marché. Parmi les différentes protéases, les protéases alcalines produites par les micro-organismes sont d'intérêt principal d'un point de vue biotechnologique. Le but de notre travail est de réactiver et identifier une souche bactérienne qui est caractérisée par une importante activité protéolytique. Par ailleurs la souche sujette de notre étude est du genre ***Bacillus circulans.*** Egalement, nous avons étudié la variation de son pouvoir protéolytique après extraction des protéases en fonction des étapes de purification. En suite, nous avons réalisé une étape d'encapsulation des protéases afin d'assurer leur conservation et réutilisation. En fin cette activité protéolytique de cette protéase est mise en évidence dans une application industrielle notamment le traitement biologique des peaux d'animaux. Les résultats obtenus, montrent que cette bactérie possède une activité considérable qui est amélioré après des étapes de purifications.

Mots clés : ***Bacillus circulans,*** Protéase alcaline, Purification, Immobilisation, Epilage.

ملخص

البروتياز هي المجموعة الأكثر أهمية من بين الانزيمات الصناعية والتي تمثل حوالي 60 بالمائة من مجمل إنزيمات السوق، من بين مختلف البروتيازات يعتبر البروتياز القلوي المنتج من طرف الكائنات الدقيقة المجهرية ذو قيمة أساسية في التكنولوجيا البيولوجية

تهدف دراستنا إلى إعادة تنشيط وتعريف بكتيريا من نوع باسيلوسسيركولون موازن مع ذلك قمنا بدراسة تفير قدرتها على تفكيك الرابطة البروتينية بعد استخلاص البروتياز المسؤول عن ذلك بالنسبة لمراحل التنقية التي مر بها هذا الأخير، بعد ذلك قمنا بعملية بلورة البروتياز حتى نتمكن من استعماله وإعادة استعماله في مراحل الدراسة المتبقية أخيرا البروتياز الناتج والمنقى في مراحل الدراسة المتبقية والبروتياز المبلور كذلك تم استعماله في عملية معالجة بيولوجية لجلد حيواني.

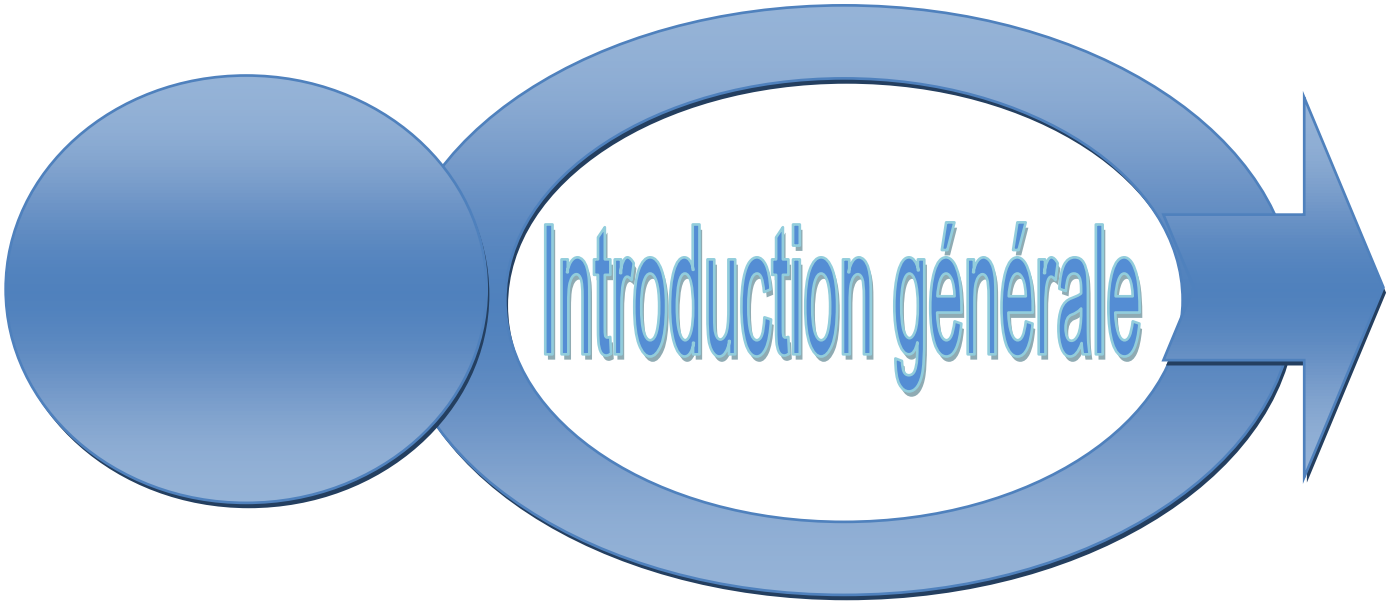
النتائج المتحصل عليها أثبتت أن البكتيريا المدروسة تملك قدرة معتبرة على انتاج إنزيم مفكك للرابطة البيبتيدية هذه القدرة تم تحسينها عن طريق عدة مراحل للتنقية بعد انتاج الإنزيم المذكور.

الكلمات المفاتيحية:عصية، البروتيازالقلوية،تنقية ، تجميد، أزالة الشعر الزائد

Abstract

Proteases are the most important industrial enzymes, whichrepresentapproximately 60% of total enzyme market group. Among the differentproteases, alkalineproteasesproduced by microorganismsis a principal view of biotechnologicalinterest. The aim of ourworkis to identify and activate a bacterialstrainthatischaracterized by asignificantproteolyticactivity. Moreover, the subject of ourstudyisstrain Bacillus circulans. Also, westudied the variation of itsproteolytic power after extraction of proteasesbased purification steps. Next, weperformed a step encapsulation proteases to ensuretheir conservation and reuse. In the end thisproteolyticactivity of thisproteaseisdemonstrated in industrial applications includingbiologicaltreatment of animal skins. The resultsobtained show thatthisbacterium has significantactivityisimprovedafter purification steps.

Keywords :*Bacillus circulans*,Alkaline protease, Purification,Immobilization, Epilation.


Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

De nos jours, l'utilisation des enzymes ou catalyseurs biologiques s'est rapidement étendue et la découverte de nouveaux catalyseurs enzymatiques ouvre de nouvelles possibilités d'applications et d'exploitations. En effet, par comparaison aux catalyseurs chimiques, les enzymes possèdent une spécificité très importante (procédé sélectif), elles favorisent des réactions dans des conditions plus douces et surtout elles assurent un procédé écologiquement propre et des produits finis purs [1].

Les biocatalyseurs demeurent les outils clés de la biotechnologie. Parmi ceux-ci, les enzymes,qui sont des protéines extraites à partir de micro-organismes naturels, de végétaux et d'animaux. Elles peuvent être utilisées pour catalyser biologiquement des réactions chimiques avec beaucoup d'efficacité et de spécificité.

Le développement récent de plusieurs disciplines tels que l'ingénierie des protéines, le génie enzymatique et le génie génétique a permis de créer de nouvelles activités spécifiques capables d'agir dans différentes conditions industrielles. En outre, l'utilisation de substances naturelles comme matières premières, présente plusieurs avantages dont la disponibilité à bon marché de substrats renouvelables et un intérêt double à savoir: une valorisation d'un déchet qui doit être traité et une diminution du coût du produit final au cours de la fermentation.

En tant qu'outils technologiques, les systèmes biologiques ont émergé en compétition avec les procédés chimiques qui permettent de réaliser la réaction souhaitée par voie non biologique. D'ailleurs, dans certains secteurs industriels l'utilisation des enzymes a complètement remplacé les procédés traditionnels réalisés par voie chimique [2].

Aujourd'hui, les protéases figurent parmi les enzymes hydrolytiques les plus importantes et les plus largement étudiées depuis l'avènement de l'enzymologie. Ces enzymes catalysent des réactions d'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines et des peptides [1].

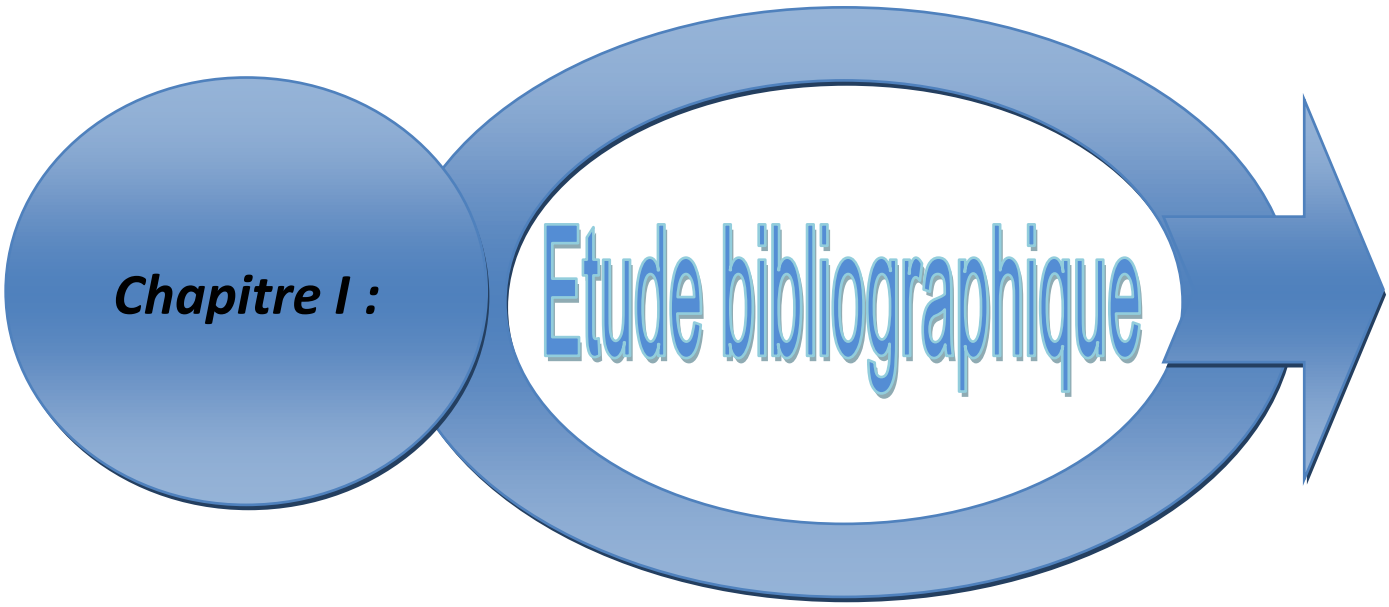
Les principaux objectifsdes cette étude sont l'identification de la souche bactérienne productrices de protéases alcalines et l'extraction de l'enzyme protéolytique et sa purification afin de l'introduire dans une application industrielle notamment dans le traitement des peaux des animaux.

Le travail présent à été rédigée sous forme de deux chapitres :

- Unpremier chapitre réserver à la recherche bibliographiquequi regroupe des généralités sur : Les enzymes, ou on a défini les enzymes en général, les protéases en particulier, leurs propriétés et structures, leur classification ainsi que leurs applications industrielles.
- Un deuxième chapitrepartagé en deux parties :
  - Une première partie qui contient des illustrations sur les différentes méthodes utilisées tout en long de ce travail.
  - Et une deuxième partieconsacrée a la démonstration des résultats obtenus.

La partie expérimentale a été consacrée à l'identification de la souche bactérienne protéolytique. Puis une étude d'estimation de l'activité de l'enzyme produite par cette bactérie et sa purification. Enfin, une application industrielle à été réalisée dans le traitement biologique des peaux des animaux dans le but de mètre en évidence son pouvoir kératinolytique.

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


Chapitre I :
Etude bibliographique

I.1. Introduction

Au niveau industriel, les enzymes sont souvent utilisées en raison de la spécificité de leur action et des températures relativement économiques aux quelles elles fonctionnent. Ces raisons en font des catalyseurs très compétitifs face aux procédés chimiques industriels classiques, leur utilisation constitue le génie enzymatique qui est une des branches de biotechnologie [2].

I.2. Définition de l'enzyme

Une enzyme est une macromolécule qui joue un rôle de catalyseur biologique (ou biocatalyseur), c'est-à-dire de composé qui facilite une réaction biochimique sans en modifier les produits. Elle fixe un substrat pour le transformer en produit. Ainsi, elle possède un site actif formé de l'ensemble des acides aminés qui entrent en contact avec le substrat. Ce site actif est formé de deux sites :

- Le site de fixation du substrat ;
- Le site catalytique qui va agir sur le substrat et lui faire subir la réaction chimique.

Les acides aminés qui constituent le site catalytique sont en général la sérine, la cystéine, l'histidine, la tyrosine et la lysine. Le site de fixation du substrat et le site catalytique peuvent être confondus ou distincts.

Les enzymes sont des catalyseurs capables d'abaisser l'énergie d'activation d'une réaction et ainsi d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme, sans pour autant modifier l'équilibre formé. Les enzymes agissent à faible concentration et elles se retrouvent intactes en fin de réaction [3].

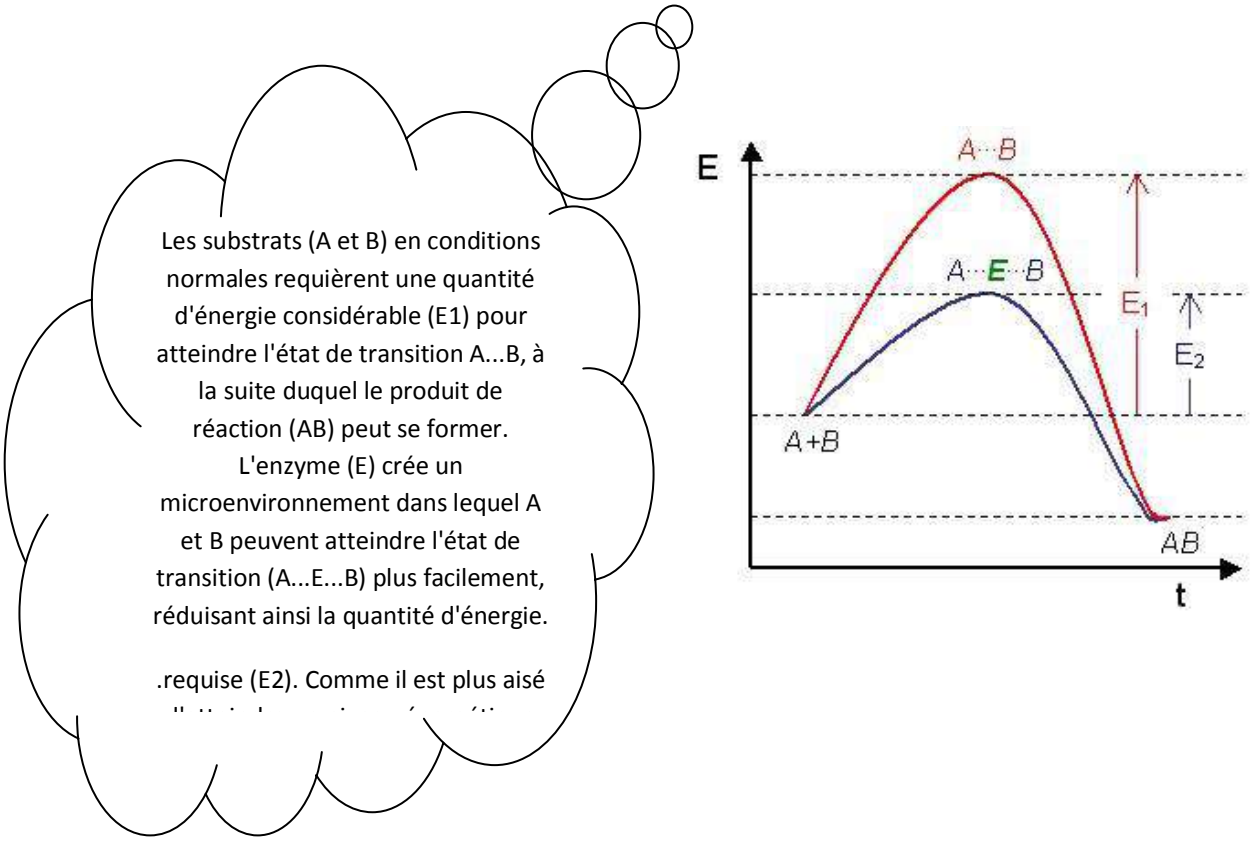


Figure I.1 : Diagramme d'une réaction catalytique qui montre l'énergie (E) requise à différentes étapes suivant l'axe du temps (t) [3].

I.3. Structure d'enzyme

Les enzymes sont le plus souvent des protéines, et sont donc constituées de chaînes d'acides aminés. Parfois, les activités enzymatiques sont portées par des ARN, et sont dans ce cas appelées des ribozymes [4].

La fonction des enzymes est liée à la présence dans leur structure d'un site particulier appelé le site actif. Schématiquement, il a la forme d'une cavité ou d'un sillon dans lequel vont se fixer les substrats grâce à plusieurs liaisons chimiques faibles.Une fois fixés, les substrats vont réagir et se transforment en produit [5]. Le site actif est subdivisé en deux parties :

- ***Le site de liaison/fixation/reconnaissance :*** il reconnaît la complémentarité de forme avec un substrat spécifique à l'enzyme ;
- ***Le site catalytique :*** il permet la réaction transformant le substrat en produit.

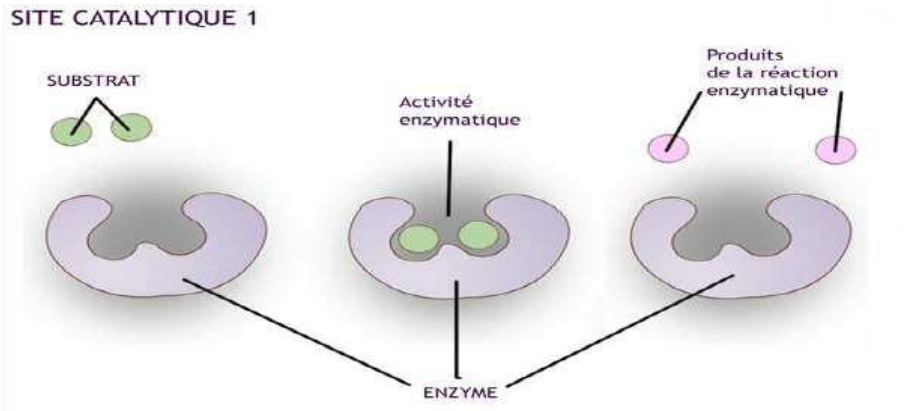


Figure I.2 : formation de complexe enzyme-substrat (réaction enzymatique) [6].

La partie importante de l'enzyme est constituée du site actif. C'est dans ce site, qui prend souvent la forme d'une cavité, que se fixe le substrat qui pourra alors être soumis à l'action de l'enzyme afin de le transformer en produit. Chaque enzyme protéique possède une structure adaptée à sa fonction, et peut être sous forme monomérique, alors que certaines au contraire sont actives sous formes dimériques, voire plus. Elles peuvent alors s'associer à plusieurs chaînes protéiques codées par le même gène (homodimère) ou codées par des gènes différents (hétérodimère) [7]. Il existe deux grandes catégories d'enzymes :

a. *Les enzymes purement protéiques* : ne sont constituées que d'acides aminés. Ce sont les holoenzymes ;

b. *Les enzymes en deux parties* : contiennent une partie protéique appelée apoenzyme et une partie non protéique appelée cofacteur. L'association des deux parties forme l'hétéroenzyme.

I.4. Nomenclature & classification

La nomenclature des enzymes n'est pas standardisée mais, par convention, elle prend en compte le nom du substrat de l'enzyme et le type de réaction catalysée. Pour désigner une enzyme on indique : d'abord le nom du substrat puis le type de réaction catalysée et on ajoute enfin le suffixe ase.

Les enzymes sont classées en six principaux groupes, en fonction du type de réaction qu'elles catalysent.Elles sont classifiées par un système numérique standard. Leur numéro est attribué par l' " Enzyme Commission " (E.C).

a. Les enzymes d'oxydoréduction et de fixation d'oxygène (E.C.1)

Les réactions, qui échangent des électrons ou des hydrogènes, sont les plus fréquentes en biochimie, celles de fixation d'oxygène sont rares. Les enzymes qui catalysent ces réactions sont appelées des déshydrogénases. Lorsque les enzymes fixent préférentiellement des électrons ou des hydrogènes sur des substrats elles sont appelées des déshydrogénases ou des réductases [8].

b. Les transférases (E.C.2)

Ces enzymes transfèrent des radicaux ou des groupes d'atomes d'une molécule (substrat donneur) à une molécule (substrat accepteur). Leur nom complet comporte le donneur, l'accepteur, le radical transféré suivi de transférase. Les groupes transportés sont : le méthyle (-CH3), l'hydrox méthyle (-CH2OH), Carboxyle (-COOH), groupement carboné comportant des fonctions aldéhydes ou cétones (-CHO) ou (-CO-R), groupe acyle, groupe osidyle, amine, phosphoryle, etc...[9].

c. Les hydrolases (E.C.3)

Ce sont des enzymes de dégradation. Elles provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ce sont des enzymes sans coenzymes. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, liaisons O-O des peroxydes, C-N des amides. Il est très difficile de les classer [10].

d. Les lyases ou synthéases (E.C.4)

On y trouve les enzymes suivantes : décarboxylases, lyases proprement dites, synthases, hydratases, déshydratases, etc… [11].

e. Les isomérases (E.C.5)

Elles catalysent des changements de structure dans une même molécule sans changer sa formule globale [12].

f. Ligases (synthetases) (E.C.6)

Elles forment des liaisons C-C, C-N, C-S, C-O, O-P grâce à l'utilisation de l'énergie fournie par l'hydrolyse concomitante d'un groupement phosphate ou pyrophosphate de l'ATP [13].

I.5. Source des enzymes

Les enzymes extraites des végétaux comestibles et des tissus des animaux , ainsi que celles produites par des microorganismes (bactéries, levures et champignons), sont utilisées depuis des siècles dans plusieurs fabrications.

I.5.1. Origine végétale

Les enzymes d'origine végétale sont par ordre décroissante en Technologie β-amylase, peroxidases, papaïne, bromélaïne, uréase, ficine, polyphénol oxidase (tyrosinase), lipoxygénase etc. représentent quelques-unes des enzymes bien connues d'origine végétale [14].

1.5.2. Origine animale

La plupart des enzymes d'origine animales sont pancréatiques. En effet, elles ont la propriété de dégrader les protéines et les lipides alimentaires. Elles sont toutes synthétisées sous forme d'un précurseur qui peut s'activer de façon autocatalytique dans des conditions bien déterminés [14]. Les enzymes de cette classe sont : Pepsine, Lipase, Lysozyme, Rénine, Trypsine, Phospho-mannase, Chymotrypsine …etc.

I.5.3. Origine microbienne

Les enzymes microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toute les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles. Elles sont produites par une grande variété de bactéries dont, les actinomycètes, de moisissures et de levures [15]. Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial [16]. Les enzymes de cette classe sont : α-amylase, cellulase, penicillineacylase, protéase, invertase, lactase, dextranase, pectinase, pullulanase etc.

Les enzymes d'origine végétale et animale ont longtemps été plus utilisées que celles d'origine microbienne, mais pour des considérations techniques et économiques, ces dernières prennent de plus en plus d'importance. Ainsi, des efforts considérables sont déployés pour produire de plus en plus d'enzymes par des procédés de culture microbienne [17].

I.6. Avantages des enzymes d'origine microbienne

Avec les avancées biotechnologiques dans le domaine des protéines, les enzymes, jadis confinées aux procédés de biocatalyse conventionnels, ont évoluées et sont devenues des outils importants largement employées dans une panoplie de procédés industriels. Les avantages d'employer les

enzymes microbiennes en industrie tiennent à leur grande efficacité, leur précision, leur spécificité et leurs aspects pratique et économique. Elles remplacent ainsi les catalyseurs chimiques dans de nombreux procédés de production de produits à valeur ajoutée. Par contre, les sources animales d'enzyme sont limitées. La grande diversité biochimique des microorganismes potentiellement producteurs d'enzyme les rend beaucoup plus attrayants.

Les applications potentielles des enzymes se sont diversifiées dues aux développements des domaines suivants [18]:

- De hauts rendements peuvent être obtenus par manipulation génétique des souches ;
- Optimisation des conditions de fermentation par l'induction de la production d'enzyme, utilisation de milieux de culture de faible couts, et introduction des fermentations en fedbatch ;
- Relargage des enzymes intracellulaires par des nouvelles méthodes de lyse des parois cellulaires :
- Méthodes de purification modernes telle que la chromatographie par affinité, par échange d'ions et la précipitation ;
- Développement de procédés pour l'immobilisation et la réutilisation des enzymes. La proportion des couts reliés aux enzymes devient alors minime dans certains procédés ;
- Production continue d'enzyme en réacteur spécial.

Les enzymes suivantes font actuellement l'objet d'une production commerciale [19]:

- Enzymes industrielles utilisées en industrie : amylase, protéase, pénicilline acylase, isomérases, catalases etc ;
- Enzymes analytiques utilisées à des fins d'analyses: glucose oxydase, cholestérol oxydase etc ;
- Enzymes utilisées en médecine: protéases, streptokinase, asparaginase etc.

I.7. Propriétés d'une enzyme

Les enzymes agissent comme catalyseurs de plusieurs réactions chimiques. Une caractéristique importante des enzymes est leur très grande sélectivité à catalyser des réactions chimiques précises. En effet, l'enzyme agit sur le substrat en formant avec lui un complexe intermédiaire [ES]. Ceci provoque des déplacements électroniques dans le substrat permettant le déclanchement de la

réaction. Par contre, tout agent chimique susceptible de se fixer sur les acides aminés du site actif bloque cette réaction et inhibe l'enzyme

Toutes les enzymes sont des biocatalyseurs :

- Diminue l'énergie d'activation d'une réaction chimique ;
- Récupérée en fin de réaction ;
- Agit à très faible concentration ;
- Spécifique : Les enzymes sont des catalyseurs spécifiques, c'est à dire qu'une enzyme donnée ne peut catalyser qu'une réaction chimique bien précise.[20]

I.7.1. La réaction biochimique

C'est une réaction chimique qui se déroule dans la cellule ou le milieu cellulaire, en présence d'un catalyseur biologique (biocatalyseur), l'enzyme [20].

I.7.2. Réaction enzymatique

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

1. Formation du complexe enzyme-substrat (ES) ;
2. Catalyse : succession de réactions intermédiaires permettant la transformation du substrat en produit.

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

I.7.3. Mode d'action des enzymes

Lorsque la chaîne d'acides aminés se replie sur elle-même, elle forme une structure compacte présentant des creux et des bosses. Dans certains creux se trouvent réunis des acides aminés qui, ensemble, confèrent à cette région de la protéine des caractéristiques chimiques spécifiques. C'est au niveau d'une telle région, appelée site actif, que s'effectue la réaction chimique catalysée par une enzyme [21].

Par exemple, c'est en se fixant sur le site actif de la lactase que le lactose se défait en glucose et en galactose. Et il n'y a que le lactose qui peut se fixer sur ce site. Le maltose (c'est un sucre formé de l'union de deux glucoses), par exemple, n'a pas d'affinité chimique avec le site actif de la lactase et il ne peut pas s'y fixer.

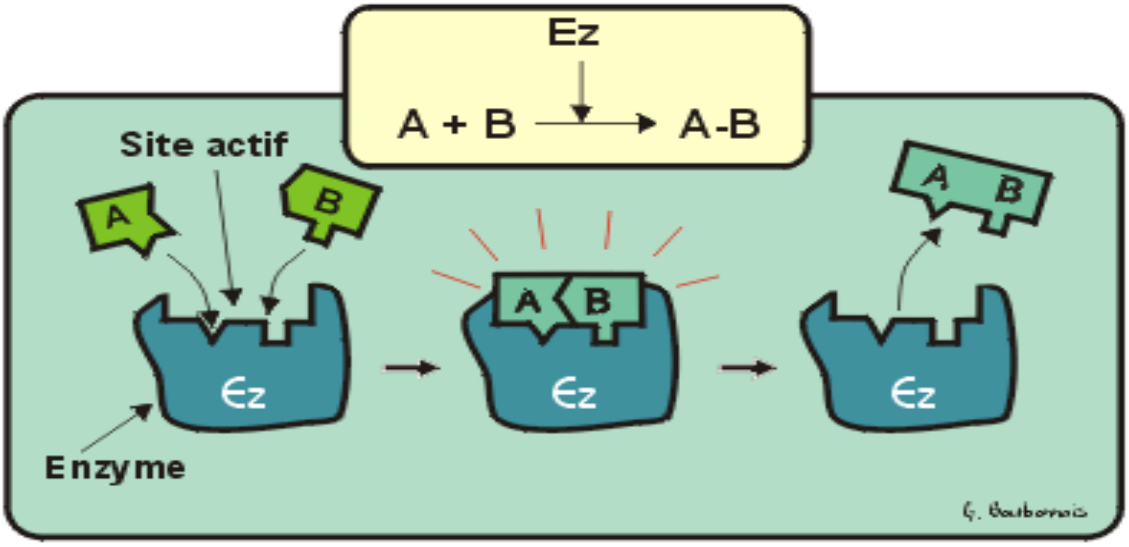


Figure I.3 : Réaction enzymatique [22].

L'enzyme illustré ci-dessus catalyse une réaction chimique au cours de laquelle une molécule A se lie à une molécule B pour former la molécule AB. On constate que chacune des deux molécules a une affinité avec le site actif de l'enzyme. Lorsque A et B sont fixées dans le site actif, elles sont exactement dans les bonnes conditions pour former une liaison entre elles et former AB. À la fin de la réaction, la nouvelle molécule AB se détache de l'enzyme qui, de ce fait, peut à nouveau recommencer la même réaction. L'enzyme n'est pas altérée par la réaction. Une même enzyme peut refaire la même réaction des milliers de fois à la seconde.

Il existe essentiellement 2 grands types de réactions biochimiques :

- Les réactions de dégradation de la matière organique (catabolisme) ;
- Les réactions de synthèse de la matière organique (anabolisme).

Un substrat est une molécule transformée au cours d'une réaction chimique.Dans une réaction enzymatique (c'est à dire catalysée par une enzyme), on appelle substrat la ou les substances qui se fixent sur le site actif et produit la ou les molécules obtenues à la fin de la réaction.



Dans la cellule, les réactions chimiques se font souvent à la chaîne. Le produit d'une première réaction devient le substrat d'une autre réaction dont le produit devient le substrat de la prochaine réaction et ainsi de suite jusqu'à l'obtention d'un produit final. De telles chaînes de réactions sont appelées voies métaboliques. Les enzymes cinétiques et mécanisme d'action [23].

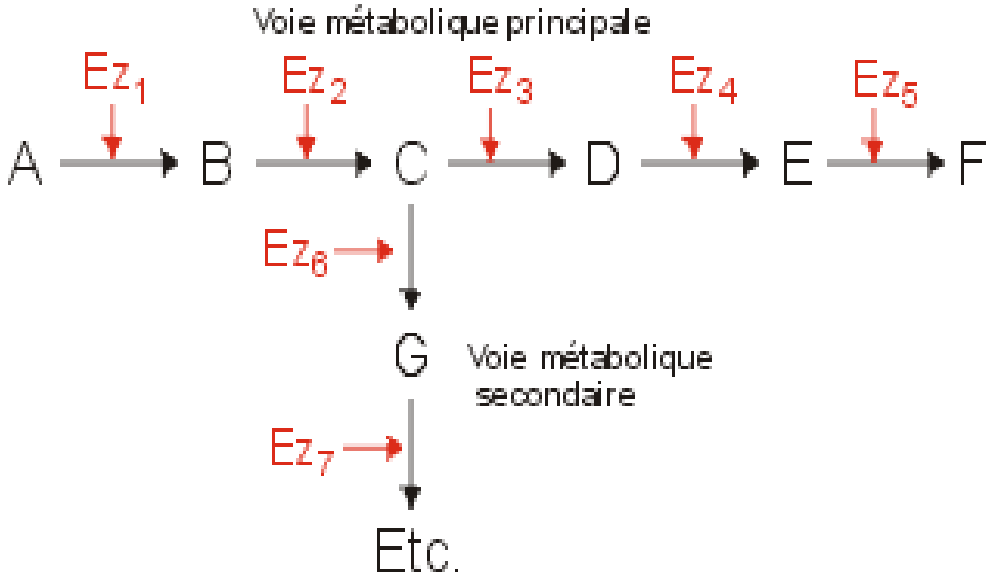


Figure I.4 : Les voix métaboliques [23]

I.7.4. Dénaturation d'une enzyme

Comme l'enzyme est de nature protéique et que les protéines peuvent être dénaturées par : la chaleur, la variation de pH, les fortes concentrations d'électrolytes et même par les solvants organique. La dénaturation des protéines engendre leur déformation ceci permet le risque de modification du site actif et qui devient par la suite inactif. Dans ce cas l'enzyme perd ses propriétés catalytiques, elle ne peut plus remplir sa fonction [24].

I.7.5. Estimation de l'activité enzymatique

Elle correspond à la vitesse de la réaction qu'une enzyme est capable de catalyser. Elle est mesurée à partir de la quantité de produit constitué ou de réactif disparu par unité de temps. L'affinité de l'enzyme pour son substrat est donnée par la constante de Michaelis. Elle est exprimée en UI (Unités Internationales), sachant que 1 U.I = 1 (mole de substrat consommée par minute) [23].

Cette activité peut être influencée par plusieurs facteurs dont :

a. Température

Pour des températures comprises entre 10 et 60°C environ, une réaction enzymatique (comme toute réaction chimique) voit sa vitesse de réaction augmenter.Les enzymes étant des protéines, elles sont dénaturées à partir d'une certaine température (autour de 60°C). La perte de la structure tridimensionnelle entraîne une perte de fonction et donc une chute de l'activité enzymatique [24].

Chaque enzyme est caractérisée par une température optimale pour laquelle son activité enzymatique est maximale.

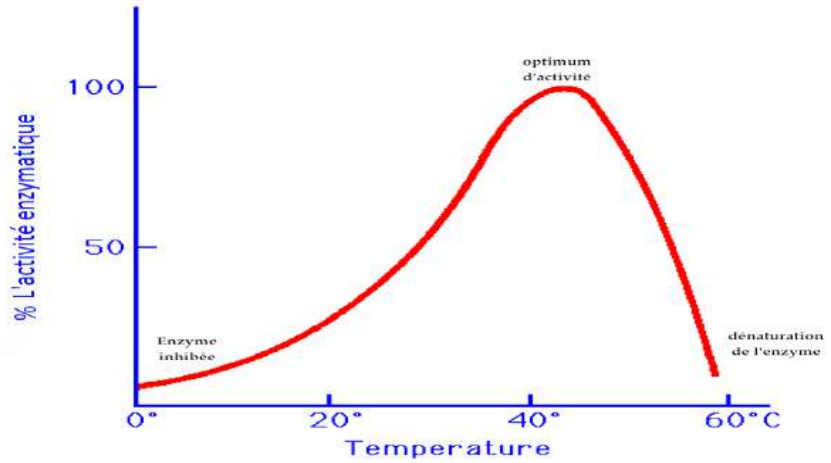


Figure I.5 : Effetde la température sur l'activité enzymatique [25].

b. pH

La plupart des enzymes sont actifs dans une gamme de pH restreinte, typiquement entre pH 5 à 10. Le pH influence l'activité d'un enzyme à plusieurs niveaux :

- par la liaison du substrat à l'enzyme **;**
- de l'activité catalytique ;

- de l'ionisation de substrat **;**
- de la stabilité structurale**.**

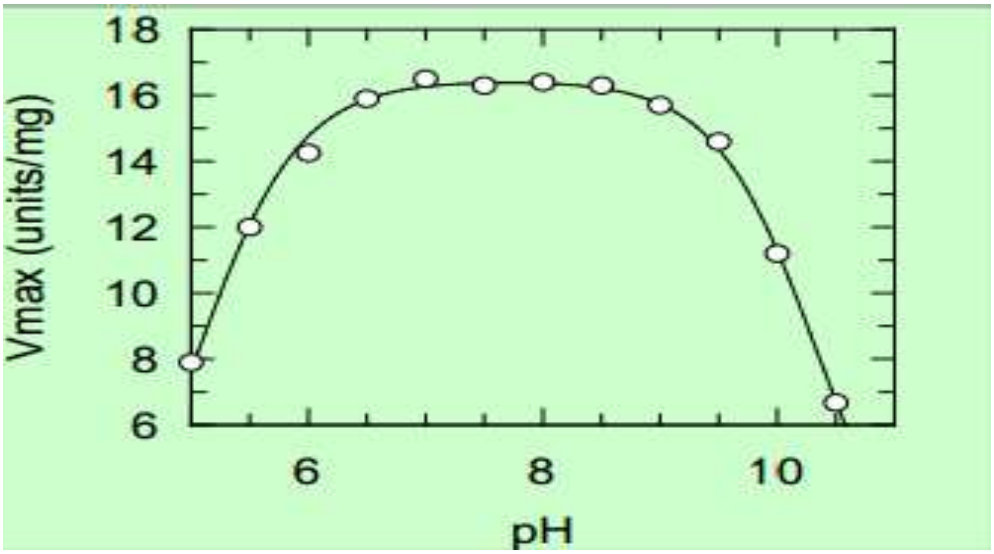


Figure I.6 : Variation de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de pH [26]

c. Concentration en substrat :

Les mesures de la concentration du produit en fonction du temps sont différentes pour chacune des concentrations de substrat essayées. Lorsque la concentration du substrat est grande (par exemple S3) la vitesse initiale est plus grande que lorsque la concentration du substrat est petite (par exemple S1) (voir figure I.7). On peut mesurer ces vitesses initiales en calculant la différence de concentration de produit au cours d'un temps donné, pour chaque concentration du substrat.

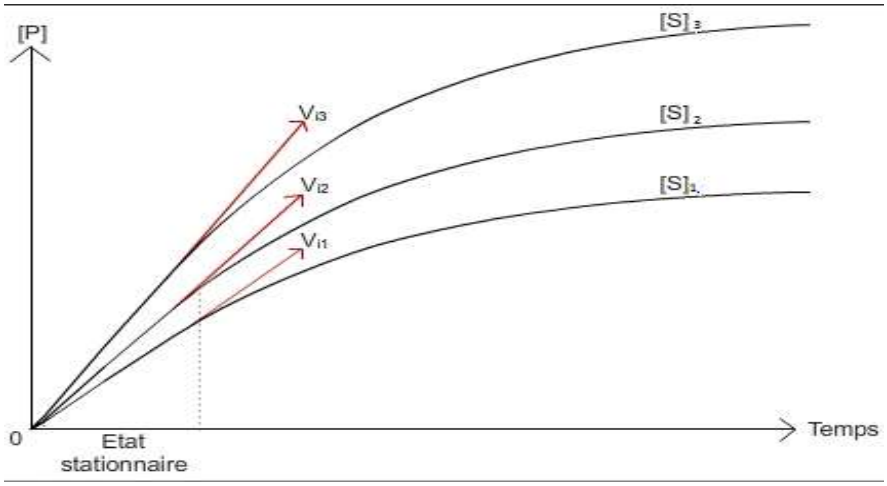


Figure I.7 :l'influence de la concentration du substrat sur la vitesse d'une réaction enzymatique [27]

d. Concentration en enzyme

Les mesures de la concentration du produit en fonction du temps sont différentes pour chacune des concentrations de substrat essayées. Lorsque la concentration d'enzyme est grande la vitesse initiale est grande et vis versa.[27]

I.8. Marché des enzymes

Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité conserve une forte croissance. Estimé à plus de 1,5 milliards dollars en l'an 2000. Il est prévu qu'en 2011, il atteindra 6 milliards de dollars. Parmi les enzymes industrielles, les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes, soit environ 60%. Les ventes industrielles des protéases sont estimées à plus de 350 millions US$ annuellement [28].

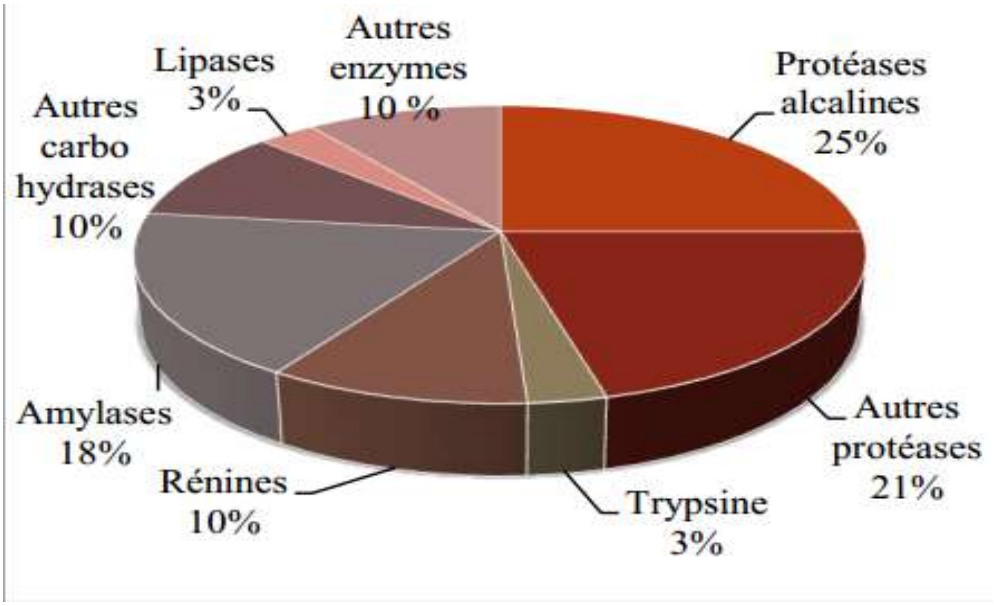


Figure I.8 : Parts de marché occupées par les enzymes dans déférents secteurs [29].

I.9. LES PROTEASES

Une protéase (ou peptidase) est une enzyme qui coupe les liaisons peptidiques des protéines. Elle permet de séparer deux acides aminés en cassant les liaisons peptidiques entre un atome de carbone et un atome d'azote au sein des protéines.

Les protéases possèdent une activité d'hydrolase, car elles utilisent une molécule d'eau pour effectuer cette cassure. Un atome d'oxygène et d'hydrogène de la molécule d'eau complète le groupement carboxyle d'un côté, et l'atome d'hydrogène restant est donné au groupement amine [30]. On distingue :

- Les exopeptidases, qui permettent la libération du premier ou du dernier acide aminé de la protéine ;
- Les endoprotéases, qui clivent des liaisons peptidiques au milieu des protéines.

Des protéases sont retrouvées dans les sucs digestifs (comme la trypsine ou la chymotrypsine) mais interviennent également dans des processus cellulaires pour assurer la maturation des protéines

I.9.1. Structure d'une protéase

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

Les protéases peuvent être sommairement divisées en deux groupes : les peptidases et les protéinases.

Les peptidases hydrolysent les liens peptidiques près des extrémités N ou C terminales, c'est à dire hydrolysent les liens entre les acides aminés qui sont à l'extérieur. Les peptidases étaient autrefois désignées par le terme exopeptidases.

Les protéinases hydrolysent les liens peptidiques à l'intérieur des chaines protéiques ou sur d'autres chaînes. Elles étaient autrefois désignées par le terme endopeptidases.

Les protéases peuvent aussi êtres classifiées sur la base de :

- pH ;
- spécificité du substrat ;

- Similarité dans le mécanisme d'action avec des enzymes bien connues et caractérisées comme la trypsine, chymotrypsine et l'élastase ;
- Résidu acide aminé au site actif et mécanisme catalytique. [30]

I.9.2.Classification des protéases

Selon leur spécificité de clivage, les protéases peuvent être classées en deux grands groupes : les exopeptidases qui clivent aux extrémités des peptides et les endopeptidases qui le font à l'intérieur des chaînes peptidiques. Il existe donc des endopeptidases et des exopeptidases qui sont soit des metallo-, cystéine- ou sérine-peptidases, les métalloprotéases étant les plus répandues chez les bactéries [31].

De façon plus conventionnelle, les protéases sont classifiées en 4 grands groupes : protéases sérines, cystéines, aspartiques et les métallo-protéases.

a. Protéases Sérines

Les protéases sérines sont les protéases les plus répandues et distribuées dans le commerce [32]. Les enzymes de ce groupe ont un résidu sérine au niveau du site actif et sont généralement inhibées par le (DFP) et le (PMSF). Laplupart de ces enzymes sont aussi inhibées par les agents thiols, tels que le (pCMB), probablement due à la présence d'un résidu cystéine près du site actif, qui ne participe probablement pas au mécanisme catalytique de l'enzyme.

Ces protéases sont généralement actives à pH neutres et alcalins, avec un optimum se situant entre 7 et 11. Elles ont un large spectre de spécificité au substrat, incluant une activité esterolytiquevis-à vis de nombreux substrats estérifiés, et sont généralement de faible poids moléculaire (18,5-35 kDa) [33].

b. Protéases Cystéines

Les cystéine-protéases ou protéases à cystéine sont des peptidases qui ont en commun un mécanisme catalytique qui implique un acide aminé cystéine présent dans la triade catalytique.

Les protéases cystéines sont sensible aux agents sulphydrés, tels que le pCMB, le (TLCK), l'acide iodoacétique, l'iodoacétamine, les métaux lourds, et sont activées par les agents réducteurs tels que le cyanide de potassium ou la cystéine, le dithiothreitol, et (EDTA). L'occurrence des protéases cystéines à été rapporté seulement pour quelques espèces de mycètes [34]. Des enzymes

intracellulaires avec des propriétés similaires aux protéases cystéines ont été rapportées chez Trichosporonsp., Oidiodendronkalrai, et Nannizziafulva.

Des protéases cystéines extracellulaires ont été rapportées chez Microsporiumsp., Aspergillus oryzae, et Sporotrichum pulverulentum. La plupart de ces enzymes sont actives à pH 5-8. Certaines sont stimulées par des agents réducteurs [34].

c. Protéases acides :

Une protéase aspartique, également appelée aspartate protéase et aspartyl-protéase, est une peptidase qui utilise un résidu d'aspartate pour catalyser les réactions affectant leur substrat peptidique. De telles enzymes possèdent généralement deux résidus d'aspartate fortement conservés dans leur site actif et leur activité est optimale à pHacide. La pepstatine est un inhibiteur de presque toutes les protéases aspartiques connues.

Les protéases aspartiques sont caractérisées par leur activité maximum à de faibles pH (3-4) et leur insensibilité aux inhibiteurs des trois autres groupes d'enzymes. Elles sont largement présentes chez les mycètes, mais rarement retrouvées chez les bactéries et les protozoaires. La plupart des protéases aspartiques sont sensibles aux composés époxy et diazo-ketone en présence d'ions cuivre. Elles sont également inhibées par la pepsatine ou les inhibiteurs de pepsine de Streptomyces.

La plupart des protéases aspartiques ont des poids moléculaires de 30-45 kDa, et leurs points isoélectriques sont généralement compris entre 3,4 - 4,6. Ces enzymes ont une action spécifique envers les résidus d'acide aminés chargés ou aromatiques de chaque coté du point de clivage.

L'activité catalytique implique deux résidus d'acide aspartique. Le mécanisme catalytique des protéases aspartiques requière la liaison initiale d'une molécule d'eau au site actif avant l'attaque nucléophilique sur le lien peptidique du substrat. La plupart des protéases aspartiques fongiques sont instables à des pH supérieurs à la neutralité et ne sont pas retrouvées dans les cultures réalisées à pH neutre ou alcalin. [34]

d. Métalloprotéases

Les métalloprotéases sont des enzymes protéolytiques caractérisées par la présence d'un ion Zn^{2+} lié à 3 résidus histidine, au niveau de leur site catalytique [35].

Les enzymes de ce groupe ont un pH optimum se situant entre 5 et 9, et sont sensibles aux agents les métaux, comme l'EDTA, mais ne sont pas affectées par les inhibiteurs de protéases sérines ou les agents sulfydryl [36]. Beaucoup d'enzymes ayant été inhibées par l'EDTA peuvent êtres réactivées par des ions tels que le zinc, le calcium et le cobalt.

Elles sont largement répandues, mais seulement quelques une ont été rapportées chez les mycètes. La plupart des métalloprotéases bactériennes et fongiques contiennent du zinc, avec un atome de zinc par molécule d'enzyme. L'atome de zinc est essentiel pour l'activité enzymatique. Le calcium est requis pour stabiliser la structure de la protéine.

e. Protéases à thréonine

Elles ont été récemment identifiées dans le protéasome de Thermoplasmaacidophilum [37] ou celui de **methanoarchaeon Methanos arcinathermophila.** La thréonine du site actif occupe l'extrémité N-terminale de l'enzyme mature. La taspase 1 humaine est aussi une protéase à thréonine.

I.9.3. Origines des protéases

Les enzymes protéolytiques sont ubiquitaires parmi tous les organismes vivants, elles peuvent être d'origines végétale, animale ou microbienne.

I.9.3.1. Protéases d'origine végétale

Les protéases d'origine végétale les plus connues sont :

a. La papaïne

Cette protéase a été isolée et caractérisée pour la première fois aux Etats Unis à partir du latex d'une plante équatoriale et tropicale (*Carica papaya*). C'est une protéase à cystéine formée d'une seule chaîne polypeptidique de 212 acides aminés avec une masse moléculaire de 23 kDa. La papaïne présente une activité optimale à une température de 65°C. Elle est stable jusqu'à 90°C en présence de son substrat. Elle est utilisée dans différents processus industriels comme l'attendrissement de la viande et la fabrication d'hydrolysats de poissons destinés à l'alimentation animale [38].

b. Ficine

Elle est extraite du latex des fruits d'une plante tropicale (figuier). Elle appartient à la classe des protéases à cystéine (papaïne-like). La masse moléculaire de la ficine purifiée est d'environ 25 kDa [38].

c. La broméline

Elle est extraite à partir de l'ananas (*Ananas comosus merr*). La broméline est une protéase à cystéine active à des pH allant de 5 à 9. Elle s'inactive à partir de 70°C.

I.9.3.2. Protéases d'origine animale

Les protéases les plus connues de cette famille sont :

a. La trypsine

Elle est d'origine pancréatique et est responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires au niveau de l'intestin. Sa masse moléculaire est de 23 kDa. Son pH optimum d'action est de 8. C'est la protéase à sérine la plus spécifique des protéases connues, elle coupe après la lysine ou l'arginine. La trypsine est utilisée pour la préparation des hydrolysats de caséine (Tryptone) ajoutés dans les milieux bactériologiques [39].

b. La chymotrypsine

C'est une protéase à sérine de 24 kDa, extraite de pancréas d'animaux. Elle coupe après les acides aminés arômatiques : la phénylalanine, la tyrosine ou le tryptophane.

La chymotrypsine est synthétisée au niveau du pancréas sous forme d'un précurseur inactif, le chymotrypsinogène qui est activé par la trypsine par hydrolyse de deux dipeptides (les acides aminés 14 et 15 et les acides aminés 147 et 148) donnant lieu à trois chaînes peptidiques A, B et C liées par deux ponts disulfures [39].

c. La chymosine

C'est une protéase aspartique extraite des caillettes de veaux et elle est utilisée dans la fabrication du fromage [40]. Elle a une action spécifique sur la caséine : elle hydrolyse la liaison 105-106 entre la phénylalanine et la méthionine de la caséine Ω, provoquant la coagulation du lait.

d. La pepsine

C'est une protéase acide de 35 kDa, qu'on trouve dans l'estomac de presque tous les mammifères. L'optimum de son activité est situé entre pH 1 et 2 et elle est complètement inhibée à partir de pH 6. La pepsine hydrolyse les liaisons peptidiques qui se trouvent entre deux acides aminés hydrophobes. Elle est thermosensible en solution à des températures supérieures à 55°C. Elle peut être utilisée en brasserie, au cours de la stabilisation colloïdale et dans la préparation du fromage [40].

e. La rénnine

Elle est produite sous forme de précurseur inactif (prorénnine) dans l'estomac des nourrissons de mammifères. Elle devient active après action de la pepsine ou par autolyse. Sa masse moléculaire est de l'ordre de 37 kDa. Elle est largement utilisée en industrie laitière pour produire un lait caillé [40].

I.9.3.3. Protéases produites par des microorganismes

Vu leur grande nécessité dans la physiologie des organismes vivants, les protéases sont ubiquitaires et ont une large variété d'origine, notamment, les microorganismes et particulièrement les bactéries. On distingue ainsi :

a. Protéases bactériennes

Ces dernières représentent la source enzymatique la plus intéressante puisqu'elles ont une croissance rapide, un espace de culture limité et une manipulation génétique facile permettant de générer de nouvelles activités enzymatiques désignées pour des applications variées. La majorité des protéases commercialisées, neutres et alcalines, sont produites par des bactéries du genre *Bacillus*. Les deux protéases très connues et bien caractérisées sont : la subtilisine Carlsberg produite par *B. licheniformis* utilisée dans les détergents [41] et la subtilisine commerciale BPN' produite par *B. amyloliquefaciens* [42].

b. **Protéases fongiques**

Les champignons produisent un spectre d'hydrolases plus large que les bactéries. Par exemple, *A. oryzae* produit des protéases acides, neutres et alcalines [43].

Les protéases fongiques acides présentent un pH optimum d'activité compris entre 4 et 4,5 et elles sont stables à des pH allant de 2,5 à 6. Ces enzymes sont particulièrement utilisées dans l'industrie fromagère.

Les protéases fongiques neutres sont des métalloprotéases actives à un pH avoisinant 7. Elles sont utilisées pour renforcer l'action des protéases végétales, animales et bactériennes et réduire le goût amer des hydrolysats protéiques alimentaires.

Les protéases fongiques alcalines sont aussi utilisées dans la modification des protéines alimentaires. Cependant, ces protéases ont un rendement réactionnel et une thermotolérance plus faible que les protéases bactériennes [43].

I.9.4. Protéases alcalines

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

Les bactéries alcalophiles isolées du sol représentent environ 1/10 au 1/100 de l'ensemble des bactéries neutrophiles. Cependant, certains neutrophiles sont capables de pousser à des pH extrêmes. Ceci est du en premier lieu à l'adaptation des systèmes physiologiques et métaboliques en modifiant les propriétés de la membrane bioénergétique, des mécanismes de transport permettant ainsi aux cellules de survivre et de se multiplier sous diverses conditions [44]. Ce genre de microorganismes est qualifié d'extrêmophile dépendant du pH.

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

Plusieurs champignons ont aussi été caractérisés pour la production de protéases alcalines dont principalement le groupe des *Aspergilli* [45].

De même, quelques levures ont été isolées pour la production de ces enzymes telles que les souches de *Candida sp*. qui sont considérées comme source potentielle de protéases alcalines [46]. La souche *Aureobasidiumpullulans* produit également des protéases.

Les protéases alcalines sont aussi produites par certains actinomycètes. *Kurthiaspiroforme* est une bactérie Gram positive spiroforme ayant une appartenance lointaine au genre Bacillus a été

reportée comme productrice de protéases alcalines [47]. Les souches de Streptomyces sont les sources privilégiées parmi les Actinomycètes

Les souches halophiles ayant été isolées pour leur production de protéases sont *Halobacteriumsp.*, *Halobacterium* ATCC 43214, et *Halomonassp*. ES-10 [48].

Les bactéries alcalopsychrotropes et alcalopsychrophiles représentent une nouvelle source de protéase alcaline. Ces souches sont caractérisées par leur capacité d'adaptation aux basses températures et aux conditions alcalines. Une souche alcalopsychrotrope de Bacillus sp. capable de produire une protéase alcaline à haute activité à de basses températures a été isolée par [49].

Peu d'études menées sur les protéases alcalines produites par *Bacillus sp*. rapportent la production de protéases thermostables à partir d'organismes alcalophiles. Plusieurs alcalophiles thermophiles sont capables de pousser à 60°C à quelques exceptions près [50]. De part l'importance industrielle et commerciale des protéases alcalines, nous avons résumé dans le Tableau I.1 une liste des souches utilisées à l'échelle industrielle.

Tableau I.1 : Les producteurs commerciaux de protéases alcalines [50]

Organisme	**Nom commerciale**	**Fabricante**
Bacillus licheniformis	Alcalase	Novo Nordisk, Denmark
Protein engineered variant of alkalophilic Bacillus sp.	Maxapem	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Alkalophilic Bacillus sp.	Savinase, Esperase	Novo Nordisk, Denmark
Alkalophilic Bacillus sp.	Maxacal, Maxatase	Gist-Brocades, The Netherlands
Alkalophilic Bacillus sp.	Opticlean, Optimase	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Alkalophilic Bacillus sp.	Proleather	Amano Pharmaceuticals Ltd., Japan

I.9.5. Applications des protéases alcalines

Les protéases alcalines sont des enzymes réputées pour leur robustesse et pour leur aptitude à être utilisées dans l'industrie du détergent, dans la tannerie, dans la récupération de l'argent, pour l'industrie pharmaceutique et alimentaire et les industries chimiques de même que pour le traitement des déchets. Ces enzymes contribuent au développement de produits à hautes valeurs ajoutées en exploitant leur activité de digestion partielle [17]. Les domaines utilisant couramment les protéases dans leurs procédés sont:

I.9.5.1. Industrie du détergent

L'industrie des détergents est actuellement le principal consommateur d'enzymes hydrolytiques agissant en milieu alcalin. Un intérêt particulier a été accordé aux enzymes pour leur capacité à éliminer les tâches protéiques et de ce fait atteindre des bénéfices impossibles à obtenir avec des technologies conventionnelles de fabrication de détergent. L'utilisation des protéases dans les détergents a connu un essor grandissant surtout en application dans la formulation des détergents à usage domestique. Cet intérêt porté aux enzymes protéolytiques est du principalement aux apports en terme de qualité du nettoyage reconnue par le consommateur, les protéases sont aussi très employées dans la formulation de détergents pour vaisselle et pour le nettoyage industriel et institutionnel [51].

I.9.5.2. L'industrie du cuir

L'industrie du cuir et de la tannerie fait aussi intervenir les enzymes protéolytiques pour l'épilage des peaux d'animaux. Traditionnellement, cette opération est effectuée par le traitement des peaux d'animaux par une solution de saturée de chaux et de sulfite de sodium. En plus d'être couteuse et drastique, cette technique produit un effluent très pollué. L'alternative à ce procédé est l'utilisation des enzymes pour l'épilage des peaux d'animaux. L'épilage à l'aide des enzymes est préférentiellement possible si la protéase est active en milieu alcalin (pH 11). Il serait aussi préférable qu'elle possède des activités élastolytiques et kératinolytiques.

Plusieurs essais sur un nombre d'enzymes protéolytiques ont été menés sans succès. Cependant, il a été rapporté que des protéases de certaines bactéries de nature alcalophiles étaient performantes pour l'épilage des peaux d'animaux [52].

Les protéases alcalines permettent d'accélérer l'opération d'épilage. En effet, en milieu alcalin, les racines capillaires gonflent ce qui facilite l'attaque des follicules capillaires par les protéases entraînant le décollement aisé des poils.

I.9.5.3. Récupération de l'argent

Les protéases alcalines sont aussi employées dans les bioprocédés utilisant les films de rayons X usagés pour la récupération de l'argent. En effet, ces pellicules contiennent approximativement 1.5 à 2% (m/m) d'argent dans leurs couches de gélatine. La pratique conventionnelle de récupération de l'argent consiste à bruler les films ce qui provoque des problèmes de pollution environnementale. Pour cela l'utilisation des enzymes hydrolytiques permet de recycler non seulement l'argent mais aussi la base de polyester du film [53].

I.9.5.4. Usages médicaux

Les collagénases à activité protéasique sont de plus en plus utilisées en thérapeutiques dans les formulations de médicaments à libération lente. Une nouvelle protéase semi alcaline avec une importante activité collagénolytique a été produite par *Aspergillus niger* LCF9. L'enzyme a permis l'hydrolyse de différents types de collagènes sans libération d'acides aminés mais plutôt des peptides à faible poids moléculaire possédant un potentiel thérapeutique.

De plus, *Bacillus sp.* à été reconnu en tant qu'organisme sans danger pour les humains et une protéase alcaline ayant une activité fibrinolytique a été utilisée comme agent thrombolytique [53].

I.9.5.5. Industrie alimentaire

Les protéases microbiennes ont beaucoup été exploitées dans l'industrie alimentaire. Ces enzymes ont été utilisées dans la préparation d'hydrolysats de protéines à haute valeur nutritionnelle. Les hydrolysats de protéines jouent un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et sont employés dans les formulations des aliments pour enfants, dans les produits diététiques et pour l'enrichissement des jus de fruits et des boissons non alcoolisées.

Les protéases jouent aussi un rôle prédominant dans l'attendrissage de la viande de bœuf. Une élastase alcaline et une protéase alcaline thermostable [54].

I.9.5.6. Traitement des déchets

Les protéases alcalines trouvent beaucoup d'applications dans le domaine de la gestion des déchets domestiques et des industries agro-alimentaires. Les protéines fibreuses de poils, de

cheveux, d'ongles ou encore de plume sont des déchets très abondants dans la nature. Ceux-ci peuvent être transformés en biomasse, en concentres protéiques ou en acides aminés en utilisant l'action des protéases de certains microorganismes 47 dans le traitement de déchets de plumes provenant de l'industrie avicole. Le produit final consistait en une poudre dense et grisâtre riche en protéines [53].

I.9.5.7. Industrie chimique

Il est maintenant bien établi que les enzymes dans les milieux organiques rendent possible d'utiliser la biocatalyse dans le domaine de la synthèse chimique. Cependant, une conséquence majeure de cette approche est que l'activité enzymatique soit réduite sous des conditions de déshydratation assez poussée. De ce fait, il serait important de découvrir un moyen de garder l'activité enzymatique à son maximum dans un milieu organique.

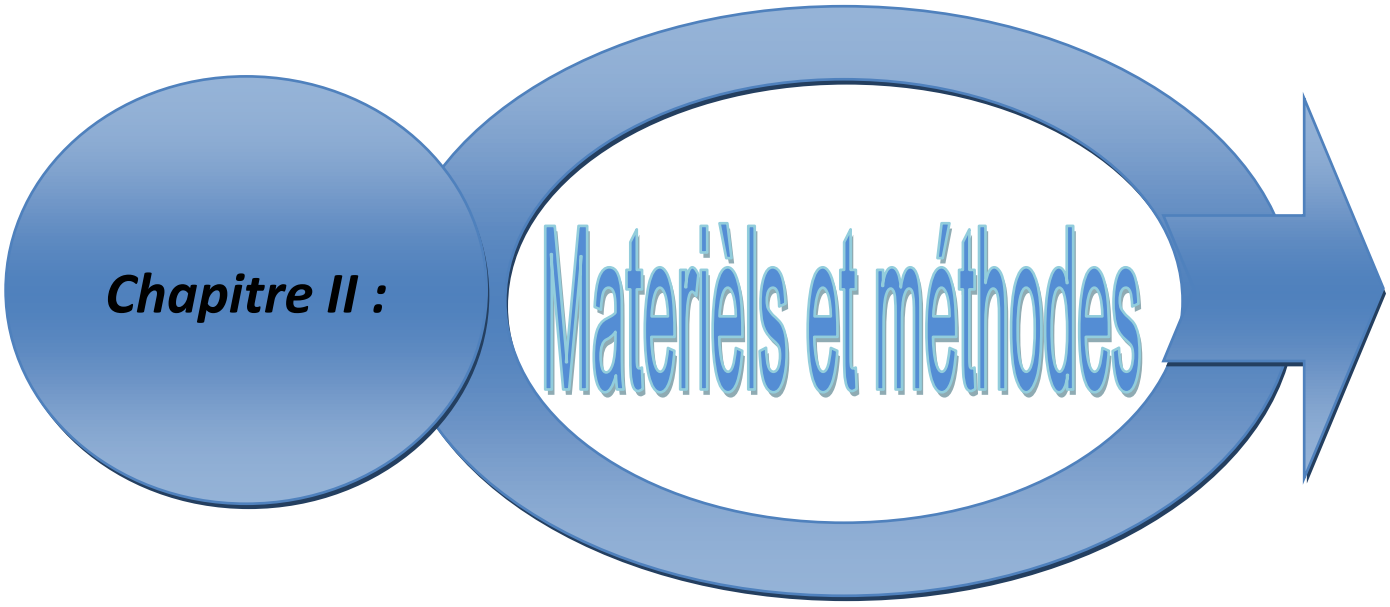
Certaines études ont montrép la possibilité d'utiliser la protéase alcaline pour catalyser la synthèse de peptides en milieu organique [55].

I.10. CONCLUSION

Les enzymes sont des biocatalyseurs permettant l'augmentation de la vitesse des réactions chimiques sans être modifier. Elles n'agissent que dans certaines conditions de température et de pH. En plus, elles sont spécifiques au substrat, au type de réaction. Ceci leur confère une fonction liée à leur structure.

Les protèases sont de loin le groupe le plus important. En effet, elles représentent à elles seules entre 35-40% du total des ventes d'enzymes et la dominance des protèases dans le marchè des enzymes industrielles devrait s'accroitre d'ici 2005.

A l'heure actuelle, la plus grande part du marchè des enzymes est occupèe par les protèases alcalines, principalement à cause de leur utilisation dans le marchè des dètergents. En effet, de toutes les protèases produites, 70 à 80 % sont destinèes au marchè des dètergents. Les protèases alcalines issues principalemnt de *Bacillus licheniformis* sont très utilisées dans les dètergents et occupent une grande part du marchè.


Chapitre II :
Materièls et méthodes

II.1. INTRODUCTION

Dans le but de la recherche de nouvelles protéases alcalines, nous avons réalisé la présente étude qui est l'une de premières au niveau de notre Université qui s'intéresse à l'application des bioprocédés. Pour cela, notre travail s'articule autour de trois parties :

- La réactivation et l'identification de la souche sujette de notre étude ;
- L'extraction des protéases produites par cette souche et leur purification ;
- La mise en évidence du pouvoir protéolytique de l'enzyme dans une application industrielle précisément dans le traitement des peaux d'animaux.

La réalisation de cette étude à été réalisé au niveau des laboratoires du Hall technologique de l'université Yahia Farès de Médéa.

II.2. Matériels & méthodes :

II.2.1. Matériels biologique :

La souche bactérienne munie d'une activité protéolytique sujette de cette étude à été isolée et purifiée au Laboratoire du centre de formation professionnel de Sidi Abdelkader de Blida.

II.2.2. Verrerie et petit matériel

a. ***Verrerie du laboratoire*** (erlen mayer, tubes a essai, pipettes Pasteur, seringues, entonnoir…etc) ;
b. ***Petit matériel*** (Boites de pétri, bec Bunsen, anse de platine, portoir, agitateur, balance, dessiccateur….) ;
c. ***Grand matériel*** (Réfrigérateur, bain Marie, étuve, autoclave, plaques d'agitations, haute microbiologique, centrifugeuse, spectrophotomètre, pH-mètre, conductimètre, shaker, microscope optique).

II.2.3. Produits et réactifs

a) Produits chimiques et réactifs

Les produits utilisés pour la préparation des solutions et des tampons lors de ce travail sont fournies par : MERC, BioMerieux et Disco.

- Solution glycine –NaOH ;
- Solution caséine- glycine- NaOH ;
- Solution TCA ;
- Chlorure de calcium ($CaCl_2$) ;
- Chlorure de sodium (Na Cl) ;
- Acide aspartique ($C_4H_7NO_4$) ;
- Sulfate de magnésium(MgSO4) ;
- Sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$);
- Monohydrogénophosphate de potassium (K_2 HPO_4) ;
- Potassium dihydrogenphosphate (K H_2PO4)

La composition ainsi que la préparation de l'ensemble des solutions et des tampons utilisés sont présentées au niveau de l'annexe N°1.

b) Milieux de culture

- **Milieu LB liquide :**

La composition du milieu LB [56] utilisé pour la pré-culture des souches bactériennes est la suivante :

- Eau distillée : 500 ml ;
- Peptone : 5 g/l ;
- Extrait de levures : 2,5 g/l ;
- Na Cl : 2,5 g/l.
- L'agar : 10 g

Le pH du milieu est ajusté à (7,2-7,4) par le Na OH (10N) puis subi une stérilisation à 120°C pendant 20 min.

- **Milieu LB solide**

C'est le milieu LB liquide contenant 15g d'agar en plus. Il est utilise pour la conservation des souches bactériennes.

- **Gélose nutritive au lait (GNL)**

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

- Eau distillée : 750 ml ;
- Peptone : 5 g/l ;
- Extrait de levures : 3 g/l ;
- L'agar : 20 g ;
- Lait écrémé : 250 ml.

Le pH du milieu est ajusté à (7,2-7,4) par le Na OH (10N) ensuite est stérilisé à 120°C pendant 20 min. après on lui rajoute du lait écrémé stérile (à 114 °C pendant 15 mn).

- **Bouillon nutritif**

Milieu liquide utilise pour l'estimation de l'activité protéolytique de souche bactérienne. Il est contient dans 1000 ml d'Eau distillée :

- Caséine : 15 g
- Peptone : 7g;
- Sulfate d'ammonium :2g;
- Monohydrogénophosphate de potassium : 1g;
- Potassium dihydrogenphosphate :1g;
- Chlorure de sodium : 3g ;
- Chlorure de calcium : 5 ml (20g/100ml);
- Sulfate de magnésium :1 ml (10g/100ml);
- Oligoélément : 1 ml (1/1000).

Le pH du milieu est ajusté à 10 par du Na OH (10N).

II.2.4. Méthodes

II.2.4.1. 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 été conservée à -18 °C, par étalement sur milieu LB solide coulé dans des boites pétri. Ensuite les boites été incubées à 37°C pendant 24h.

II.2.4.2. Test de l'activité protéolytique

Il s'agit d'un test microbiologique d'identification sur gélose nutritive au lait. Ce test qualitatif repose sur le fait que les protéases secrétées par la souches protéolytiques vont diffuser dans la gélose environnante et vont ainsi hydrolyser les caséines du lait. L'action protéolytique de ces enzymes se traduit par un halo transparent au tour de la colonie.

Ce test qualitatif repose sur l'ensemencement en spot au centre de la boite (GNL) et incuber à 37°C. Le diamètre de l'halo est proportionnel à la quantité d'enzymes libérée par la bactérie.

II.2.4.3. Identification de la souche bactérienne

L'identification de la souche a été accomplie par des études morphologiques et physiologiques basées sur des observations microscopiques et des tests biochimiques

a. Observation à l'état frais

Le but de l'examen à l'état frais consiste sur l'observation microscopique des bactéries vivantes. Cette méthode permet de mettre en évidence :

- La morphologie des bactéries qui est l'une des principales étapes de l'identification bactérienne ;
- La mobilité ;
- Le mode d'assemblage c'est-à-dire comment elles sont disposées ; libre ou liées.

La technique :

Prélèvement d'un milieu solide :

On prépare avant tout une lame stérilisée on met au dessus une goutte d'eau distillée à laide d'une pipette, on prend une anse flambée ;on prélève des bactéries on étale sur la lame ;on recouvre avec une lamelle stérilisée le liquide ne doit pas déborder ; on stérilise l'anse.

Observer la lame par un microscope optique à l'objectif 100.

b. Coloration de Gram

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste Danois Hans Christian Gram qui à mis au point le protocole en 1884 [57]. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classifier. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

Une suspension bactérienne est étalée sur une lame en verre propre, puis séchée et fixée à la flamme. La lame est recouverte pendant une minute du réactif N°1 (2% cristal violet, 20% alcool éthylique et 0,8% oxalate d'ammonium) puis lavée doucement à l'eau. La lame est ensuite recouverte par du réactif N°2 (1,3% iode, 2% iodure de potassium et 10% polyvinyl pyrrolidone) pendant une minute et de même lavée doucement à l'eau. On ajoute par la suite du réactif N°3 (50% alcool absolue et 50% acétone) pour la décoloration. En recouvre enfin la lame par le réactif N°4 (0,25% safarine et 10% alcool) pendant une minute et on réalise un lavage doux avant séchage de la lame, puis on observe au microscope (Objectif 100 × à l'huile d'immersion).

c. Test de la catalase

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram positifs. La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée (H_2O_2) qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air, des hydrogènes transportés par la voie oxydative directe. Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche de H_2O_2 à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de H_2O_2 sous l'action de la catalase.

d. Test de l'oxydase

Ce test est essentiel pour orienter l'identification des bacilles et coques GRAM négatifs.
Une parcelle de culture est déposée sur un disque de papier filtre (disque oxydase) imprégné de réactif. Une coloration rose se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive.

e. Galerie API CH50

L'identification de la souche a été complétée par des tests biochimiques moyennant des approches de la taxonomie classique : Galerie API. Il s'agit de galeries biochimiques miniaturisées comportant des capsules en nombre variable.

nous avons choisi la galerie adéquate à savoir la galerie API CH50. Cette galerie permet d'étudier le métabolisme de 49 substrats de carbohydrates et leurs dérivés par bactéries. Le microorganisme à tester est mis en suspension dans le milieu puis inoculé dans chaque micro-tube de galerie. Pendant l'incubation le catabolisme des glucides produit des acides organiques qui font virer l'indicateur du pH. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique de la souche et servant à son identification à l'aide d'un référentiel d'identification normaliser. La lecture s'effectue après incubation à 37 °C pendant 24 h.

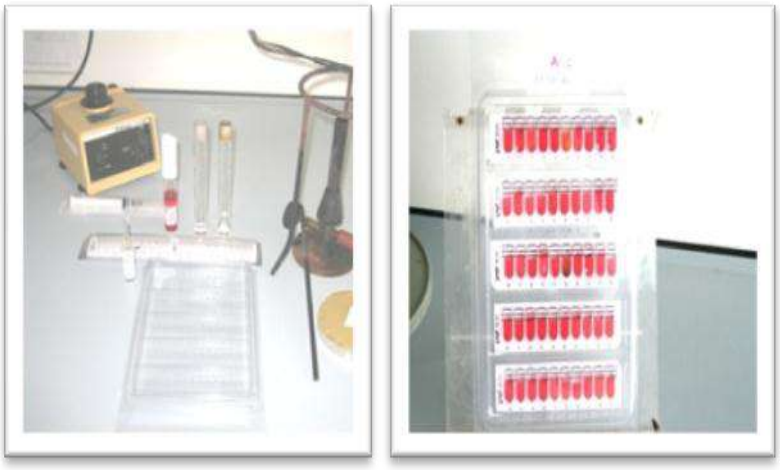


Figure II.1 L'ensemencement des galeries API CH 50.

II.2.4.4. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique particulièrement l'activité caséinolytique, est éstimée dans le surnageant, en déterminant la concentration des peptides solubles dans l'acide trichloro-acétique (TCA) à la concentration finale de 6,6% [58].

L'activité protéolytique est estimée selon le protocole suivant :

- Mélanger 0,5 ml d'une solution de caséine (1% p/v) dans un tampon glycine NaOH 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 6000 rpm pendant 30 min ;

- Mesurer l'absorbance à 280 nm (correspond au maximum d'absorbance des AAs).

Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1µg de tyrosine/ml/min dans ces conditions expérimentales. Dans cette méthode une courbe d'étalonnage de 0 à 100 µg/ml de tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions. Nous avons déduit que 1 µg/ml de tyrosine correspond à une $DO_{280\ nm}$ de 0,0055. L'activité protéasique (U/ml) est déduite à partir de l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité (U)} = \frac{DO * d * D}{T * 0.0055} \qquad [58]\ \text{II.1}$$

Avec :

DO: densité optique ;

d: la dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel;

t : temps de la réaction en minute.

D : d: la dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel*3

II.2.4.5. Extraction de l'enzyme protéolytique

En milieu liquide, les cellules sont cultivées en erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de bouillon nutritif. La mise en culture est toujours effectuée à partir d'une pré-culture repiquée par une colonie bactérienne, puis les cultures ont été incubées à 37°C et sous une agitation constante de 200 rpm pendant 24h.

Ensuite, on réalise une centrifugation à 6000 rpm pendant 30 min et à 4°C. Le surnageant récupéré, et gardé en vue de la purification selon les étapes suivantes.

II.2.4.6. Purification de l'enzyme protéolytique

a. Traitement thermique

Le surnageant obtenu subie un traitement thermique à 80°C pendant 30 min, puis centrifugés pendant 30 min à vitesse égale 6000 rpm. Cette opération a pour but de précipiter une part importante de protéines du surnageant par dénaturation thermique. Chaque surnageant récupéré contient l'activité protéolytique.



Figure II.2 : traitement thermique de la solution enzymatique

b. Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium

La précipitation est la méthode la plus couramment utilisée pour l'isolation et la récupération des protéines à partir d'un mélange biologique brut. Le processus fait également Intervenir deux étapes de purification et de concentration. Il est généralement affecté par l'ajout de réactifs tels que le sel ou un solvant organique, ce qui réduit la solubilité des protéines désirées dans une solution aqueuse.

C'est une technique sélective utilisée pour purifier partiellement et concentrer les protéines solubles dans un surnageant. Le sulfate d'ammonium à forte concentration entre en compétition avec les protéines pour réagir avec les molécules d'eau. La précipitation fractionnée des protéines de l'extrait brut a été réalisée de la manière suivante : On ajoute au surnageant contenant l'activité protéolytique, en faible quantité sous une agitation douce et à froid, du sulfate d'ammonium solide jusqu'à 40% de saturation (242 g/l). On laisse sous agitation pendant 2 h puis on centrifuge (6000 rpm pendant 30 min), le surnageant recueilli est additionné de sulfate d'ammonium solide jusqu'à 70% de saturation (136 g/l). Après 2 h d'agitation, on centrifuge (6000 rpm pendant 30 min).

c. Dialyse

Une fois la précipitation par sulfate d'ammonium est achevée et le culot obtenu est récupéré dans le minimum du tampon acide aspartique. En suite il est dialysé à 4 °C contre le même tampon pendant une nuit. Tout d'abord le boudin de dialyse doit être activé dans de l'eau distillée à 100°C pendant 5 min. [62]



Figure II.3 : Dialyse de la solution enzymatique

A chaque niveau de purification l'activité enzymatique doit être estimée à fin de déterminer le pouvoir protéolytique de cette solution enzymatique.

II.2.4.7. Immobilisation de l'enzyme

L'immobilisation est une étape clé dans l'utilisation d'enzymes lors des procédés industriels. Elle comporte plusieurs avantages majeurs. Du fait que les coûts de production des enzymes sont très élevés, les industriels cherchent des méthodes qui permettent la réutilisation des enzymes lors de cycles d'opérations multiples.

L'immobilisation d'enzymes sur un support solide s'avère une voie très intéressante, puisqu'elle permet facilement de séparer la phase liquide contenant le produit d'intérêt de la phase solide contenant l'enzyme (moyen de récupération).

De plus, l'immobilisation augmente généralement la stabilité de l'enzyme dans des conditions non favorables d'opération (pH extrêmes et températures élevées) [59].

En contre partie, l'immobilisation des enzymes affecte généralement leur rendement catalytique à la baisse. Selon le type d'immobilisation et l'enzyme utilisée, la perte d'activité peut atteindre 90% et même plus.

L'immobilisation de la solution enzymatique munie de l'activité protéolytique à été réalisé par l'introduction de 5 ml de la solution enzymatique purifiée dans 100 ml de solution d'alginate sodium. Ensuite, l'encapsulation à été effectuée par le versement goute à goute du mélange de la solution d'alginate de sodium avec l'enzyme dans un récipient contenant une solution de chlorure de calcium ($Ca\ Cl_2$) à 5% sous une faible agitation. Les capsules formées sont rincé par l'eau distillée et récupéré par une simple filtration.

II.2.4.8. Mise en évidence de l'activité protéolytique (Kératinolytique)

L'industrie du cuir utilise des enzymes protéolytiques et lipolytiques dans le traitement du cuir. Elles sont utilisées pour éliminer les parties non désirées. En épilage par phases bactériennes, les protéases sont utilisées pour aider le processus chimique alcalin.

Ce genre de processus est plus respectueux vis à vis l'environnement et permet même amélioration de la qualité du cuir.

a. Le cuir

Le cuir est issu des peaux animaux tannées (généralement des peaux des grands mammifères tels les bœuf et les porcs), c'est-à-dire une substance morte, imputrescible, souple et insoluble dans l'eau. Le cuir est le fruit de la transformation des peaux opérée par les tanneries et les mégisseries.

b. Composition de la peau

La peau est constituée de 3 couches :

- L'épiderme qui est en contact avec l'extérieur et qui subit les agressions ;
- Le derme qui est la couche de cellules vivantes, organisées en un tissu très serré. C'est le lieu de naissance des poils et où sont présentes les terminaisons nerveuses ;
- L'hypoderme qui est une couche de cellules graisseuses, c'est un tissu lâche, et qui est directement en contact avec les muscles.

c. Traitement du cuir

La méthode traditionnelle utilisée dans le traitement du cuir implique l'utilisation du sulfide d'hydrogène et d'autres composés chimiques qui sont chers et polluants.

Par contre, le bio-traitement du cuir utilisant l'approche enzymatique est nettement plus favorable ; ce qui permet le contrôle facile du processus, la réduction du coût du traitement et la protection de l'environnement [60].

Les protéases, qui présentent une activité kératinolytique et élastinolytique, peuvent être utilisées dans le processus de traitement des cuirs. Ces protéases sont employées dans les trois étapes du processus : trempage, épilage et confitage [61]. La voie enzymatique permet :

- La destruction des protéines interfibrillaires facilitant le trempage ;
- La dégradation des protéines au niveau des follicules des cheveux accélérant leur épilages ;
- L'assouplissement des cuirs au cours de l'étape de confitage pour améliorer leur tannage.

Traditionnellement, l'étape de trempage est réalisée par des protéases pancréatiques. Cependant, ces enzymes sont coûteuses et peu disponibles [48]. Pour ces raisons, les protéases des microorganismes, qui sont plus abondantes et plus performantes, ont été appliquées dans ce type de traitement. Hameed *et al.* ont utilisé la protéase alcaline produite par *B. subtilis* K_2 dans le traitement du cuir [48].

d. Principe de traitement

L'invention concerne un procédé d'épilage de cuirs ou de peaux ne nuisant pas à l'environnement, au moyen d'enzymes. Le dit procédé consiste à tremper les cuirs ou peaux (à les soumettre à un trempage principal), et à épiler les peaux ou cuirs ainsi traités, par addition d'eau, exposition à une force mécanique et à au moins une protéase, les peaux et cuirs étant exposés à au moins un agent d'oxydo-réduction protéique au bisulfure, au moins une fois dans chaque étape.

Dans notre travail, on a traitée une peau de 6x6 cm durant 1h a 40°C dans 100ml d'eau distillée sous agitation à 250 rpm. Et même des plumes de volaille.

Les deux échantillons on été introduits dans 100ml d'eau distillée contenant 5 ml de la solution enzymatique (brute, purifiée et même encapsulé) et incubée à 37°C sous une agitation de 250 rpm pendant 24h.

II.2.4.9. Conclusion

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 ; puis on a réalisé un test qualitatif sur un milieu GNL solide ce test là montre qu'il y a une activité protéolytique de notre microorganisme.

L'identification morphologique ; physiologique et biochimique demande un observation de la souche à l'état frais ce dernier a un but de donner la morphologie ; la mobilité et le mode d'assemblage du bactérie étudiée ;un autre test qualitatif qui est la coloration de Gram est réalisé pour découvrir les propriétés de la paroi bactérienne pour pouvons la classer selon ces dernies.

L'identification de la souche demande aussi un test de catalase et un autre d'oxydase pour assurer bien les propriétés de la paroi.

On été besoin aussi de faire une étude sur les propriétés biochimique grâce à une Galerie API CH50 qui permet d'étudier le métabolisme de 49 substrats de carbohydrates et leurs dérivés par bactéries.

L'étape importante de ce travail été l'extraction et la purification d'enzyme protéolytique qui passée par un traitement thermique de la solution enzymatique puis une précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium suivie par une étape de dialyse, l'une des meilleures méthodes de conservation de l'enzyme purifiée est l'immobilisation qui est réalisée dans ce travail par l'utilisation d'un support d'alginate de sodium.

La dernière étape été l'utilisation de notre enzyme protéolytique au traitement de cuir ; le procédé été l'épilage d'une peau d'animale, au moyen de notre protéase soit a l'état brute ; semi purifiée ou bien immobilisée.


Chapitre III :
Résultats et discussions

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Introduction

Le traitement biologique des peaux d'animaux est parmi les méthodes les plus récentes qui nécessite moins de produits et d'énergie et engendre des déchets biodégradables et moins polluants. De ce fait, nous avons opté pour ce genre de traitement en utilisant une souche munie d'une activité protéolytique et kératinolytique. La souche utilisée est une bactérie qui produits des protéases alcalines qui assure leur activité même a des conditions extrêmes de température et de pH.

Le travail présenté dans ce mémoire a pour objectif d'avoir une souche bactérienne à fort potentiel de production de protéases, d'extraire ses enzymes et les purifier, et de les introduire dans une application industrielle.

Dans la première partie nous nous sommes motivées à la réactivation de la souche déjà isolée et qui à fait l'objet d'autre travaux. Ensuite nous nous sommes passées à l'étape de son identification par des moyens morphologique, physiologique et biochimique. Ainsi nous avons estimées l'activité enzymatique de l'enzyme produite par cette souche.

Dans la deuxième partie, l'enzyme à été extraite et purifier et même immobiliser sur un support qui permet son utilisation dans une application industrielle.

III.2. Réactivation de la souche

La réactivation de la souche qui à été conservé a basse température **(-18 °C)** à été réalisée par ensemencement quadratique sur un milieu solide (LB solide) et incubation à **37C°** pendant **24 h**. Cette méthode a permet le développement des colonies sur la surface de ce milieu solide. Ce test est illustré sur **la figure III.1.**

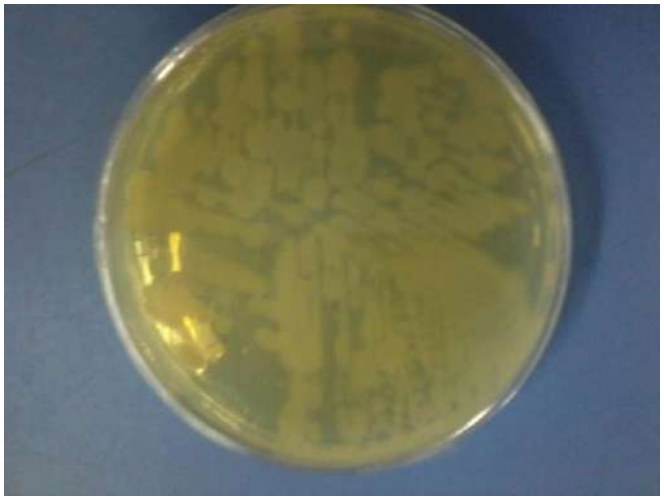


Figure III.1: Le développement de la souche dans le milieu LB solide

III.3. Test qualitative de l'activité protéolytique

Dans le but de se rassurer que notre souche est munie d'une activité protéolytique, elle à été repiquée sur gélose nutritive au lait (GNL : milieu utilisé pour déceler les activités protéolytiques extracellulaires) et incuber pendant **24 h** à **37 °C**. Ce test semi-qualitatif est visualisé par la diffusion des protéases secrétées dans la gélose environnante tout en hydrolysant les protéines du lait (notamment les caséines) ce qui se traduit par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie **(figure III.2).**



Figure III.2 : Aspect d'halo produit par la souche protéolytique sur GNL

D'après la **figure III.2** on peut constater que notre souche à une activité protéolytique puisque elle à sécrétée des enzymes extracellulaires qui ont hydrolysé les protéines du GNL. Et

comme ce test est un test qualitatif et non pas quantitatif, on a fait appel à des méthodes chimiques **(méthode de Khambahvi)** à fin d'estimer l'activité protéolytique de cette enzyme.

III.4. Identification de la souche

Pour identifier la souche sujet de notre travail, nous avons eu recours à des approches morphologiques, physiologiques et biochimiques.

III.4.1. Caractéristiques morphologiques et physiologiques

a. Examen microscopique

L'observation microscopique, à l'état frais, a montré que la souche isolée a une forme de bacille **(voir Figure III.3).**



Figure III.3 : Aspect des cellules bactériennes sous microscope optique (G×100).

b. Coloration de Gram

La coloration de Gram est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie; elle permet de colorer les bactéries et de les distinguer à l'examen direct par leur aptitude à fixer le violet de gentiane **(Gram +)** ou la fuschine **(Gram -).**

L'intérêt de cette coloration est de donner une information rapide sur la forme et la nature de la paroi.

- Les bactéries qui apparaissent violette après coloration et observation sous microscope sont dites **Gram (+)** et ont une paroi de peptidoglycanes épaisse ;
- Les bactéries qui apparaissent en rose sous microscope sont dites **Gram (–)** et ont une paroi de peptidoglycanes fine, mais ont en plus une membrane externe lipidique.

Les résultats de ce test effectuée sur notre souche bactérienne ont révélée qu'elle est de **Gram (+).**

c. Test oxydase

La recherche d'oxydase est un test fondamental pour orienter l'identification des bacilles **Gram (-)**. On utilise comme réactif le chlorhydrate, on l'utilise généralement avec des disques imprégnés de ce réactif (disques oxydases). S'il y a apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, on conclut que la bactérie est **oxydase (+)** et qu'elle possède la cytochrome oxydase. Et s'il n'y a rien qui apparaît ça veut dire que la bactérie est **oxydase (-)** et qu'elle ne possède pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).

Les résultats obtenus ont montres que toutes les souches étudiées sont : **oxydase (+).**

d. Test catalase

La plupart des bactéries aérobies possèdent une catalase, en particulier les bacilles **+Gram ( ).** Son absence est donc un critère d'identification intéressant. Les expériences **(voir figure III.4). [63]** effectuées ont montres que la souche est de **catalase (+)**



Figure III.4 : Test de la catalase

III.4.2. Caractérisation biochimique

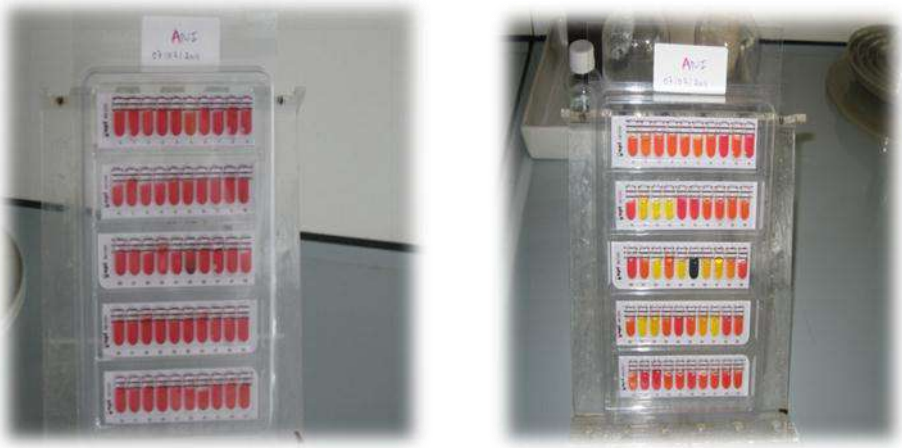
- **Identification de la souche par la méthode API CH50**

D'après les résultats des tests morphologiques et physiologiques, on a pu savoir que notre souche est de type ***Bacillus*** **(voir tableau III.1).**

Tableau III.1 : Résultats des tests morphologiques et physiologiques

Test	Souche
Observation a l'état frais	Long bacilles, mobiles
Coloration de Gram	+
Catalase	**+**
Oxydase	**+**

Mais ces méthodes ne permettent pas l'identification exacte de la souche, pour cette raison on a fait appel à une méthode biochimique on utilisant la galerie API CH50 (**voir la figure III.5)**



API CH50 après inoculation API CH50 après 24h d'incubation

Figure III.5 Le test biochimique en utilisant la galerie API CH50

Les résultats de cette analyse sont représentés dans le **tableau III.2.**

Tableau III.2 : Résultats de la galerie API 50 CH de la souche.

Carbohydrate	**Résultats du test**	**Carbohydrate**	**Résultats du test**
Aesculine	(+)	Glycérol	(-)
Salicine	(+)	Erythritol	(-)

Cellobiose	(+)	D-Arabinose	(+)
Maltose	(+)	L-Arabinose	(-)
Lactose	(-)	Ribose	(+)
Saccharose	(+)	D-Xylose	(+)
Trehalose	(+)	L-Xylose	(+)
Gentibiose	(+)	Adonitol	(-)
Melibiose	(-)	Béta-Méthyl xyloside	(-)
Raffinose	(-)	Galactose	(-)
Melezitose	(-)	Glucose	(+)
Amidon	(+)	Fructose	(+)
Glycogène	(+)	Mannose	(+)
Inuline	(-)	L-Sorbose	(-)
D-Turanose	(+)	Rhamnose	(+)
D-Tagatose	(+)	Dulcitol	(-)
D-Fucose	(-)	Inositol	(-)
L-Fucose	(+)	Sorbitol	(+)
D-Lyxose	(-)	Mannitol	(+)
D-Arabitol	(+)	L-Méthyl-D-mannoside	(+)
L-Arabitol	(-)	D-Méthyl-D-glucoside	(-)
Xylitol	(-)	*N*-Acétyl glucosamine	(+)
Gluconate	(+)	Amygdaline	(+)

2-Céto gluconate	(-)	Arbutine	(+)
5-Céto gluconate	(-)		

D'après les résultats obtenus et après interprétation de l'API 50 on utilisant une monographie appropriée à ce genre de galerie (le diagnostic biochimique bactérien. Djelouat. S), la souche est du genre ***Bacillus circulans.***

III.5. Dosage de l'activité protéolytique

Le test réalisé sur milieu solide (**GNL**) est un test qualitatif. Afin d'évaluer les niveaux de production de protéase par la souche, des cultures ont été réalisées sur milieu liquide (bouillon nutritif). L'activité protéolytique de la souche a été mesurée suivant la méthode de Kembhavi dans le surnageant de culture, ou le enzymes est récupérée, dans les conditions de **pH=10** et température adéquate **(37°C).**

Les résultats de ce dosage montrent que la souche présente une activité moyenne estimée à **1.31**U/ml. Est dans le but de concentré cette solution enzymatique, des étapes de purification on été réalisée.

III.6. Purification de la solution enzymatique

Il est à noter que l'extrait de protéase a servi pour purifier en utilisant uniquement deux étapes de purification, une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium **40%** à 70**%** suivie d'une dialyse. Cependant nous avons utilisé un protocole qui comporte trois étapes de purification à savoir, un traitement thermique (**15 min à 65°C**), une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (**40%** à **70%**) et une dialyse.

III.6.1. Traitement thermique

Le surnagent de culture de **500 ml** de **24h** faite sur bouillon nutritif constituent l'extrait brut enzymatique. Ce surnageant ayant une activité **1.31**U/ml a subit un traitement thermique à **80°C** pendant 30 min, puis centrifugés pendant **20 min** à **6000 rpm.** Le surnageant contenant l'activité est récupéré pour la suite de la purification. Cette opération a pour but de précipiter une part

importante de protéines du surnageant par dénaturation thermique, ce qui a pour but de concentré notre solution enzymatique. Ceci est exprimé par la variation de la valeur de l'activité protéolytique de **1.31** U/ml à **5.72 U/ml** qui correspond à un facteur de purification de **4.37.**

III.6.2. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

Les protéines contenues dans le surnageant récupéré après traitement thermique sont précipitée au sulfate d'ammonium entre **40%** et **70%.** Les protéines précipitées à **40%** ne contiennent pas d'activité protéolytique alors que le culot obtenu à **70%,** contenant l'activité, est récupéré dans le minimum du tampon A **(voir annexe N° 2).**

La précipitation fractionnée a permis d'éliminer une quantité importante de protéines qui ne font partie de notre protéase. Pour cela, l'activité protéolytique a évolue de 26.2 U/ml à 100 U/ml par un simple traitement thermique. Cette augmentation persiste à chaque étape de purification, par le sulfate d'ammonium à 40% elle est arrivée à 114.4 U/ml jusqu'à 170.4 U/ml à 70% de sulfate d'ammonium.

III.6.3. Dialyse de la solution enzymatique

Une fois la précipitation par sulfate d'ammonium est achevée et le culot obtenu est récupéré dans le minimum du tampon A. En suite il est dialysé contre le même tampon pendant une nuit à 4°C. Cette étape permet la concentration de la solution enzymatique par diffusion des molécules grossières (protéines) vers le tampon A à travers la paroi de tube de dialyse.

Tableau III.3 : L'activité protéolytique è différents états :

FACTEURE ETAPE	**Activité $_{partiel}$ (U/ml)**	**Activité $_{totale}$ (U/ml)**	**Facteur de purification**
Initiale (l'enzyme brute)	1.31	26.2	1
Traitement thermique	**5**	100	3.81

Ajout de sulfate 40%	5.72	114.4	4.36
Ajout de sulfate 70%	8.52	170.4	6.5
Après dialyse	23.75	475	18.12

L'ensemble des résultats montre que l'activité protéasique est représentée dans le tableau III.3. Par ailleurs, l'activité protéolytique dans la fraction 70% (170.4 U/ml) est nettement supérieure à celle enregistrée dans la fraction 40% (100 U/ml). Puisque la partie restante dans cette fraction est très riche en protéases. Par contre, la partie éliminée contient la partie non protéasique. Cependant, la fraction de 70% à été retenue pour la suite du travail.

Les protéines précipitées à 40% ne contiennent pas d'activité protéolytique alors que le culot obtenu à 70%, contenant l'activité, est récupéré dans le minimum du tampon A, puis dialysé contre le même tampon une nuit à 4 °C dans le but purifiée notre enzyme. Ceci est expliqué par la variation de l'activité enzymatique, elle a passée de 170.4 U/ml à 475 U/ml qui correspond à un facteur de purification de 18.

III.7. Immobilisation des protéases

Une enzyme immobilisée est une enzyme liée par des moyens physico-chimiques en surface ou à l'intérieur d'un support solide. On cherche généralement à conserver son activité enzymatique, qui a tendance à diminuer après immobilisation du fait de possibles gênes stériques, de limitations dans l'accessibilité au site actif ; et à augmenter sa stabilité dans le temps, ce qui est souvent le cas du fait de la structure plus rigide conférée par l'immobilisation aux enzymes

L'immobilisation d'une enzyme sur une structure solide d'alginate de calcium par la méthode d'encapsulation été par la préparation d'un mélange d'enzyme semi purifiée avec le gel d'alginate de sodium biodégradable.Ce dernier (le mélange) verser dans un solution de chlorure de calcium grâce à une seringue pour obtenir a la fin des capsules qui permis d'évoluer l'activité enregistrée dans les conditions usuelles de conservation et l'activité de l'enzyme pendant des essais répétitifs sans oublier la résistance à des températures plus élevées auxquelles l'enzyme est normalement dénaturée.

Cette méthode permet la conservation de l'enzyme pour cela on là introduit dans une étape d'un procédé industriel.

III.8. Mise en évidence de l'activité protéolytique (Kératinolytique) :

Le procédé choisie été l'industrie du cuir (Tannerie), et l'étape est l'épilage. Généralement dans ce genre d'industrie on utilise des produits chimiques très polluant et influe même sur la texture des peaux. Pour cela, on remplacé les produits qui assuré l'épilage par notre enzyme semi-purifiée et qui est un produit naturel

En utilisant la solution enzymatique semi-purifiée, l'activité protéolytique et même kératinolytique est mise en évidence pour une éventuelle exploitation à l'échelle industrielle en tannerie et tout particulièrement au niveau de l'étape du confitage protéolytique du processus. En effet, après incubation pendant **24 h** à **37 °C**, de la solution enzymatique avec différents morceaux de peaux ovins et bovins on observe d'après les figures **III.6**. et **III.7** que les deux peaux sont dépourvus partiellement de poils sans aucun endommagement des peaux n'est détecté à l'œil nu. Ceci suggère que notre solution enzymatique à la potentialité d'accomplir toute seule le processus de dégradation de ses protéines kératinolytiques (poiles) surtout si elle subit des étapes de purification plus poussées.



Figure III.6: Action des protéases semi purifiées sur une peau d'animal

Le même procédé à été réalisé sur une peau d'animal mais cette fois en utilisant des protéases encapsulés dans des billes d'alginate de calcium. Le même résultat est obtenu avec les protéases immobilisées. On observe des poiles dans le milieu réactionnel qui sont issu de la peau d'animal (voir figure III.7)



Figure III.7: Elimination des poiles par l'enzyme semi-purifiée encapsulée.

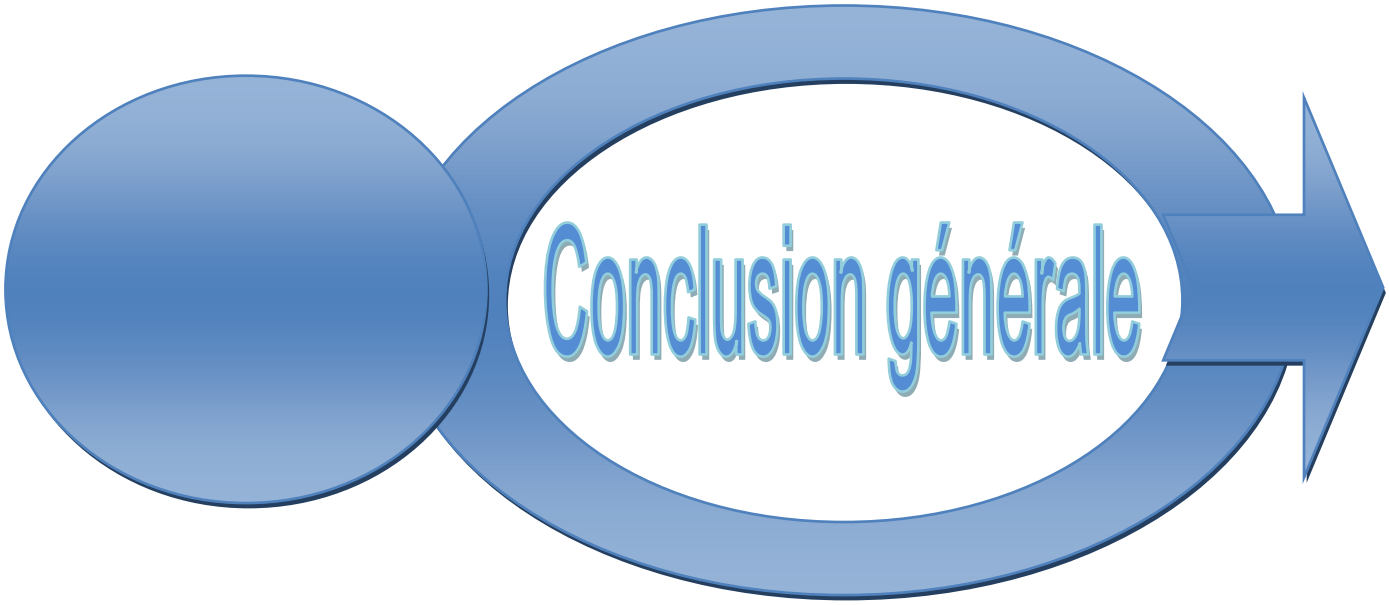
Ce procédé permet non seulement le traitement biologique des peaux d'animaux et même la récupération des protéases encapsulées par une simple filtration. Cette dernière assure leur réutilisation. Ceci rend le procédé de traitement moins couteux et peut être considéré parmi les procédés propres puisqu'il fait appel a des produits (enzyme) biodégradable.

D'après les résultats obtenus on peut conclure que la purification d'enzyme permet l'augmentation de l'efficacité de l'enzyme. Ce genre de procédés devient plus important surtout dans le domaine industriel ou le rendement augmente. En plus, l'utilisation des enzymes immobilisées ou encapsulées rend leur exploitation plus intéressante puisque leur efficacité est meilleure et permet même leur réutilisation et leur conservation.

III.9. Conclusion

Les méthodes utilisées dans notre travail sont débutées par la réactivation de la souche dans un milieu LB solide qui permet le développement et la reproduction des bactéries sur la surface du milieu, puis on a réalisé un test qualitatif sur milieu GNL solide ce test confirme que ce microorganisme a une activité protéolytique.
Ces résultats préliminaires nous ouvrent des portes sur la connaissance et l'identification des caractéristiques de cette bactérie. Pour cela on à commencé par l'étape d'identification morphologique, physiologique et biochimique suivie d'une étape d'estimation de l'activité protéolytique.

Vue le pouvoir protéolytique de cette bactérie, on a opté a l'étape d'extraction des protéases et même leur purification. Et d'après les résultats obtenus avec la solution enzymatique semi-purifiée, on a choisi la méthode d'encapsulation de cette dernière afin de l'introduire dans une application industrielle tel que le traitement des peaux d'animaux qui permîtes leurs épilage. En plus, cette méthode permet la récupération de l'enzyme et sa réutilisation.


Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

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

Actuellement, 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.

L'obtention de nouvelles protéases pourrait soit conduire à de nouvelles applications biotechnologiques, soit à une amélioration des performances des enzymes existantes.

C'est dans ce contexte que notre travail a été proposé, il s'agit de l'étude de l'activité protéolytique d'une protéase alcaline en fonction des étapes de purification et d'encapsulation. Ces dernières ont été introduites dans un traitement biologique des peaux d'animaux.

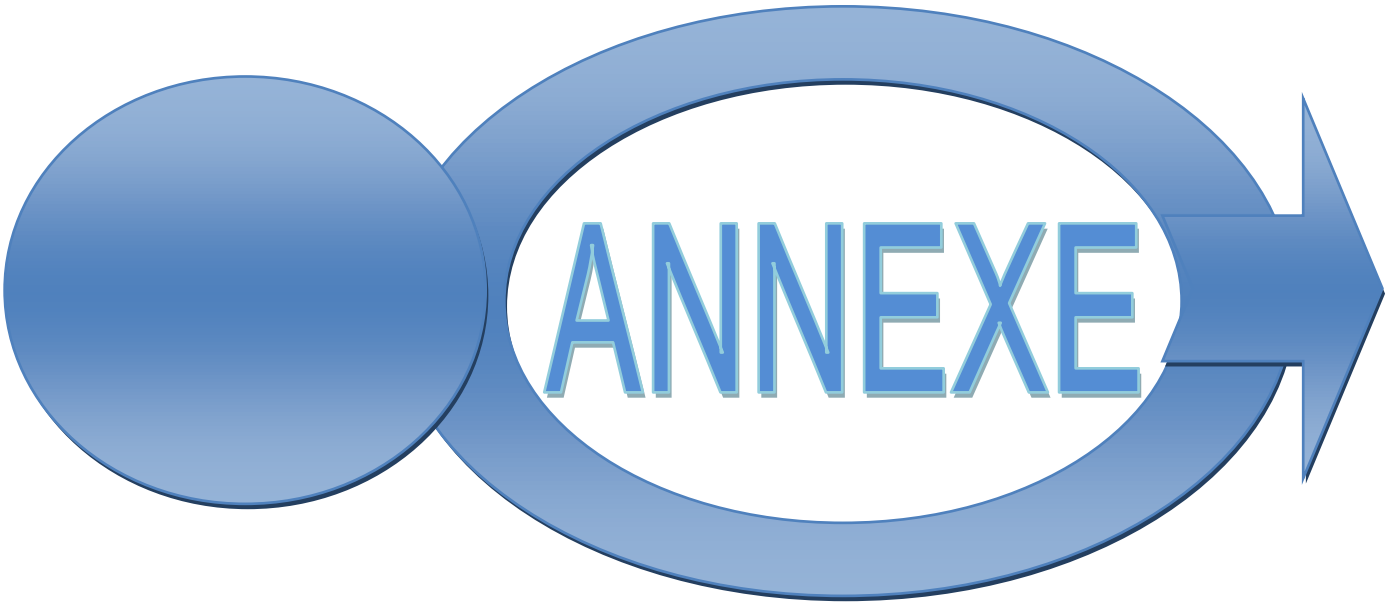
Notre travail porte sur les points suivants :

- La réactivation de la souche isolée sur un milieu LB solide, puis un repiquage sur GNL afin de prouvé son pouvoir protéolytique ;
- L'identification morphologique, physiologique et biochimique de notre bactérie. Il s'agit d'une ***Bacillus circulans*** *;*
- L'estimation de l'activité protéolytique et le suivie de sa variation en fonction des étapes de purification et même dans le cas d'encapsulation par la méthode de Kambhavi.

Les protéases sécrétés par cette souche, semblent être intéressantes et pourraient être utilisées dans d'autres domaines puisqu' elles sont actives a des conditions extrêmes de pH et température.

En guise de perspectives, nous envisageons de poursuivre cette étude dans le but de concrétiser les méthodes biologiques, ainsi nous proposons :

- ☆ La purification plus poussées des protéases secrétées par cette souche ;
- ☆ La mise en valeur de ces méthodes biologiques pour un environnement meilleur, surtout pour le traitement des effluents riches en protéines;
- ☆ L'application de ces protéases dans d'autres industries telle que les détergents.


ANNEXE

Annexe N°1

Préparation de milieu LB :

- Eau distillée : 500 ml ;
- Peptone : 5 g/l ;
- Extrait de levures : 2,5 g/l ;
- Na Cl : 2,5 g/l.
- L'agar : 10 g

Le pH du milieu est ajusté à (7,2-7,4) par le Na OH (10N) puis subi une stérilisation à 120°C pendant 20 min.

Préparation de milieu GNL:

Il est constitué de :

- Eau distillée : 750 ml ;
- Peptone : 5 g/l ;
- Extrait de levures : 3 g/l ;
- L'agar : 20 g ;
- Lait écrémé : 250 ml.

Le pH du milieu est ajusté à (7,2-7,4) par le Na OH (10N) ensuite est stérilisé à 120°C pendant 20 min. après on lui rajoute du lait écrémé stérile (à 114 °C pendant 15 mn).

Bouillon nutritif :

Il est contient dans 1000 ml d'Eau distillée :

- Caséine : 15 g
- Peptone : 7g;
- Sulfate d'ammonium (NH4)2SO4 :2g;
- K2 HPO4 : 1g;
- H2 KPO4 :1g;
- Na Cl : 3g ;
- Ca Cl2 : 5 ml (20g/100ml);
- Mg SO4 :1 ml (10g/100ml);
- Oligoélément : 1 ml (1/1000).

Le pH du milieu est ajusté à 10 par du Na OH (10N)

b/ coloration de Gram :

- **COLORANTS**

Violet phéniqué (Nicole)

Violet de gentiane (cristal violet) 1 gramme

Alcool absolu..... 10 ml

Eau phéniquée à 1%..... 90 ml

Liquide de Lugol (IKI)

Iode ..... 1 g

Iodure de potassium... 2 g

Eau distillée..... 300 ml (200 g d'après Nicole)

Solution de Fuchsine

Solution de fuchsine saturée dans l'alcool 10 ml

Eau distillée .....90 ml

Alcool Absolu. ou bien

Alcool-Acétone (Nicole)

Alcool Absolu 5 Volumes

Acétone .....1 Volume

Annexe N°2

Purification d'enzyme :

Préparation de tampon A :

121.14g….tri-H Cl

5.55g…….Ca Cl2

14.61g……Na Cl

Dans 1000ml eau distillée

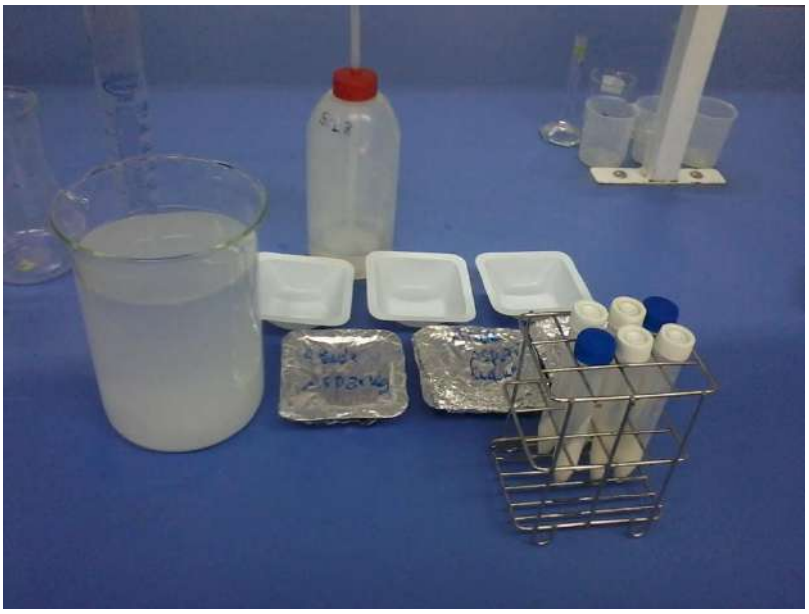


Figure XIV : préparation de tampon A

Protocole de l'immobilisation :

4 g d'alginate dans 100 ml d'eau distillée melanger la solution avec

5 ml d'enzyme purifier

- **Préparer une solution de 5% CaCl2**

Par une Seringue verser le mélange goute à goute dans un cristallisoir rempli par la solution CaCl2 ; ramener et rincer les billes résultantes par l'eau distillée.

- **Dosage de l'activité protéolytique:**

Calcule de l'activité enzymatique totale

A_{ET} = (DO*D*d)/t*a(pente)

D : dilution de l'enzyme = 1

d : dilution de l'enzyme * 3 = 3

t : temps de réaction = 15 min

a : la pente = 0.0055

Annexe N°3

Matériel utilisée :

PH mètre :

Un **pH-mètre** est un appareil, souvent électronique, permettant la mesure du pH d'une solution



Bain marie :



Les chimistes utilisent souvent le bain-marie pour éviter toute destruction de molécules par contact avec la paroi excessivement chaude du récipient ; l'agitation ne suffisant pas à la répartition des calories. Il permet un meilleur réglage de la température bien qu'il nécessite un apport d'énergie plus important.

On peut ainsi augmenter la température du milieu réactionnel.

Centrifugeuse :



Instrument auquel un moteur
Imprime un mouvement
de rotation extrêmement rapide
qui produit la séparation
de substances de densités
différentes tenues en suspension
ou en émulsion dans un liquide.

incubateur thermostatique :



Un incubateur en biologie est une
enceinte thermostatée dans
les laboratoires . Ils sont généralement
réglés à 37 °C et équipés d'une arrivée
de CO_2 et d'un bac d'eau pour obtenir
une atmosphère à 5 % de CO_2
et environ 98 % d'humidité

Autoclave :

Le principe est généralement d'atteindre la stérilité microbiologique.

Etuve :

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

spectrophotomètre :

Un **spectrophotomètre** est un appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée ou sur une région donnée du spectre. Selon la loi de Beer-Lambert,

microscope optique :



Le **microscope optique** est un instrument d'optiquemuni d'un objectif et d'un oculaire qui permet de grossir l'image d'un objet de petites dimensions afin qu'il soit observable par l'œil humain. Il est utilisé en biologie, pour observer les cellules, les tissus

bec benzène :

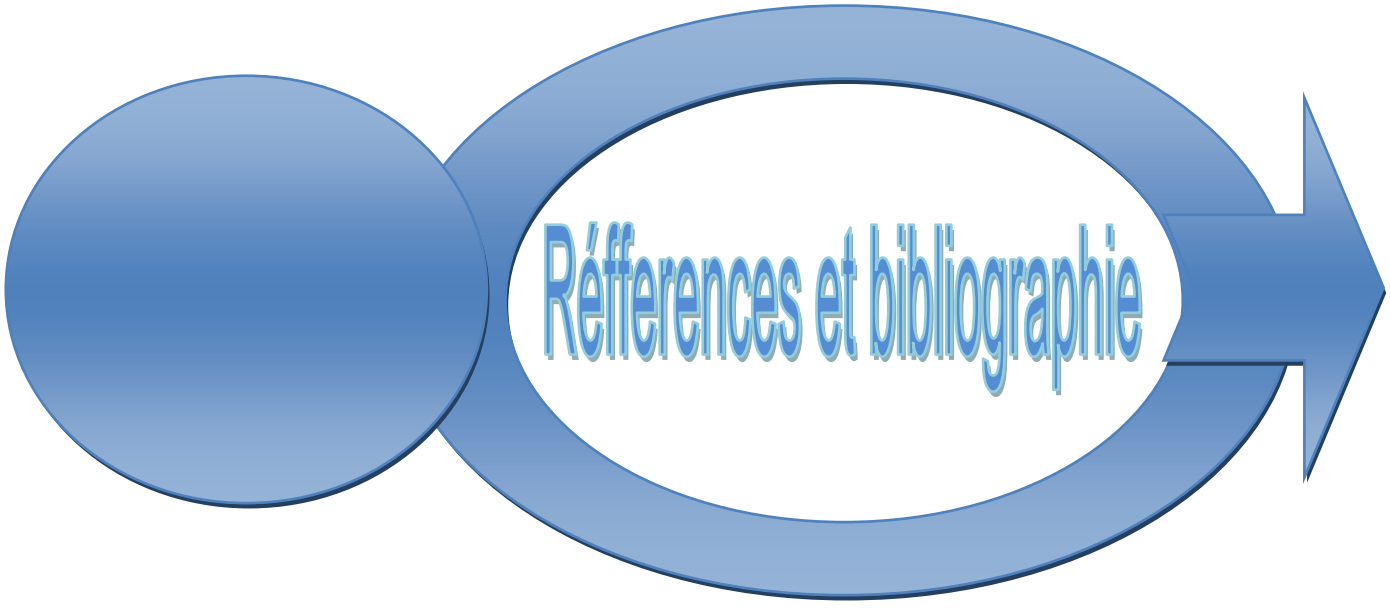


est un appareil de laboratoire destiné à produire une flamme ouverte avec du gaz combustible afin de chauffer des préparations, stériliser du matériel ou brûler des substances.

plaque chauffante :



Une **plaque chauffante** est un appareil de laboratoire portable qui sert de source de chaleur pour chauffer divers objets. Elle peut être couplée avec un système d'agitation magnétique


Réfferences et bibliographie

1. Cui ZF, Bellara SR, Homewood P. "Airliftcrossflow membrane filtration– a feasibility studywith dextran ultrafiltration". J Membr Sci 1997; 128:83-91.

2. Sen R, Swaminathan T. "characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the smalls calerecovery of surfactant". Process Biochem, 2005; 40:2953-58.

3. S.S. Zumdahl, "Chemical Principles", D.C. Health, Lexington, 1995

4. L.A. Moran, K. G. Scrimgeour, H. R. Horton, R. S. Ochs et J. D. Rawn. , Neil Patterson, New Jersey, 1994, p. 13-11

5.George. S., Raju, V., Krishnan, M.R.V., Subramanian, T.V., Jayaraman, K., "Production of protease by Bacillus amyloliquefaciens in solid state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins, Process Biochem", Vol. 30, 1995, pp. 457-462.

6.Reed G. (1975) Enzymes in Food Processing, 2nd edition, Academic Press, Orlando .Ryu K., Kim J. and Dordick J.S. (1994) "Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. Enzyme Microb. Technol »., 16: 266-275.

7.L.A. Moran, K. G. Scrimgeour, H. R. Horton, R. S. Ochs et J. D. Rawn. , Neil Patterson , New Jersey, 1994, p. 19

8. Marcin Sienczyk et Jozef Oleksyszyn, 2004.

9.Auberger B., Lamberet G. & Lenoir J. (1985) « Les activités enzymatiques »

10. García-Gómez et al., 2009; Rai et Mukherjee, 2010.

11. Ramesh S, Rajesh M, Mathivanan N. "Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine Streptomyces fungicides MML1614. Bioprocess Biosyst" Eng 2009; 32:791-800.

12. Beg KB, Sahai V, Gupta R. “Stastical media optimization and alkaline bprotease production from B. mojavens is in a bioreactor. Process Biochem” “2003; 39:203-9.

13. Kunamneni A, Poluri E, Davuluri SP. “Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a new lyisolated B. subtilis “PE-11. AAPS PharmSciTech 2003b; 4 (4): article 56.

14.Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M.S. & Deshpande V. V. (1998). « Molecular andbiotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol”. Mol. Biology Rev. 62 (3): 597-635.

15. Divies K., Jost R., Mahadevan J. & Monti J. C. (1984). « Utilisation de la méthodologie expérimentale pour la production des acides organiques par les bactéries acétiques ». J. Milk Dairy. 35 : 292-297.

16. Sandhia, G.S., and Prema, P. (1998). “Selection of optimal growth medium for the synthesis of alkaline proteinase from Bacillus SGP-26”. J. Sci. Ind. Res., 57, 629-633.

17. Michalik I., Szabova E., Polakova A. and Urminska D. (1995) The selection of Bacillus licheniformis strains for protease production: “Characterization of bacterial alkaline protease”. Biologia., 50: 249-252.

18. Baseem J, Ellouz-Chaabouni S, Mamdouh Ben A, Ezzedine Ben M, Begacem N, Abdelhafidh D, Samir B. Excellent laundry detergent compatibility and high dehairingability of the B. pumilus CBS alkaline proteinase (SAPB). Biotechnol Bioprocess Eng 2009; 14:503-12.

19 .Penasse. L. (1974). « Les enzymes cinétiques et mécanisme d’action. Masson.” Paris. P. 58-86.

20. Tyagi, R.D., Sikati Foko, V., Barnabe, S., Vidyarthi, A., Valero, J.R., “Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by Bacillus

thuringiensis using wastewater as a raw material, Water Sci Technol", Vol. 46, 2002, pp. 247-254.

21. M. A. Ferrero, G. R. Castro, C. M. Abate, M. D. Baigori and F. Sineriz, Applied Microbiology and Biotechnology,1996, 45(3)327– 332

22. Ben Rebah, F., Tyagi, R. D., Prévost, D., Surampalli, R. Y., "Wastewater Sludge as a New Medium for Rhizobial Growth", Water Qual. Res. J. Canada, Vol. 37, 2002, pp. 353–370

23. Li Z, Youravong W, H-Kittikun A. «Separation of proteases from yellow fin tuna spleen by ultrafiltration. Bioresour Technol « 2006; 97:2364-70

24. APHA, AWWA, WPCF, "Standard methods for examination of water and wastewaters, 20thed , American Public Health Association", Washington, DC, 1998.

25.Morya VK, and Yadav D (2010). "Production and partial characterization of neutral protease by an indigenously isolated strain of Aspergillus tubingensis" NIICC-08155. The Internet J. Microbiol., Vol. 8, No. 1

26. Haki GD, Rakshit SK. "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review". Bioresour Technol 2003; 89:17-34

27. Naidu KSB, and Devi KL (2005). "Optimization of thermostable alkaline protease production from species of Bacillus using rice bran". Afr. J. Biotechnol., 4:724-726

28. Puri, S., Beg, Q.K., Gupta, R., "Optimization of alkaline protease production from Bacillus sp. using response surface methodology", Curr Microbiol, Vol. 44, 2002, pp. 286-290.

29. Prakash M, Mohan Banik R, Koch-Brandt C. “Purification and Characterization of Bacillus cereus Protease Suitable for Detergent Industry”. Appl Biochem Biotechnol 2005; 127:143-155

30.Kaur. S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., Hoondal, G.S., “Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from Bacillus” sp, P-2. World J Microbiol Biotechnol, Vol. 17, 2001, pp. 125-129.

31.Ajila CM, Prasada Rao UJS. « Purification and characterization of black gram (Vigna mungo) husk peroxidase”. J Mol Catal B: Enzym 2009; 60: 36-44.

32. Salvesen G. and Nagase H. (1989) “Inhibition of proteolytic enzymes, edited by edited by Beynon RJ & Bond JS, Proteolytic enzymes a practical approach “(Oxford, IRL Press, New York), pp. 83-103.

33. APHA, AWWA, WPCF., 1998. In: Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. (Eds.), “Standard Methods for Examination of Water and Wastewaters, 20 edn”. American Public Health Association, Washington, DC, USA.

34. Kresze G. B. (1991). “Proteases during purification. Bioprecess-technol”. 12 : 85-120.

35. Zambare VP, Nilegaonkar SS, and Kanekar PP (2007). “Production of an alkaline protease by Bacillus cereus MCM B-326 and its application as a dehairing agent”. World J. Microbiol. Biotechnol., 23:1569-1574

36. Huang GR, Ying TJ, Huo P, and Jiang JX (2006). “Purification and characterization of a protease from Thermophilic Bacillus strain HS08”. Afr. J. Biotechnol., 5:2433-2438

37. Kunitz, M., Crystalline Soybean trypsin inhibitor. J Gen Physiol, Vol. 30, 1947, pp. 291-310

38. Walker J. (1998) Biosolids Management, Use and Disposal. In: Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation. Robert A. Meyers, Eds. John Wiley & Sons, Inc.

39. El-Safey EM, and Abdul-Raouf UM (2004). "Production, Purification and Characterization of Protease enzyme from Bacillus subtilis".

International Conferences for Development and the Environment in the Arab World, Assiut University

40. Christy C, Vermant S. "The state-of-the-art of filtration in recovery processes for biopharmaceutical". Desalination 2002; 147:1-4.

41. M. Braford A. "rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Anal Biochem 1976; 72:248-54.

42. Godfrey T. et West S. (1996) Introduction to industrial enzymolgy.

In : Godfrey T. and West S. (eds) Industrial enzymology, 2nd ed.

Mac-Millian Press, London, pp. 89-99, 211-212

43. Keay L, and Wildi BS (1970). Proteinases of the genus Bacillus. I. Neutral proteinases. Biotechnol. Bioeng., 12:179-212

44. Krulwich T.A., Guffaanti A.A. and Seto-Young D. (1990) pH homeostasis and bioenergetic work in Alkalophiles. FEMS Microbiol. Rev., 75: 271-278

45. Abdel-Ghani MS. Cross-flow ultrafiltration of an aqueous polymer foam solution produced by gas sparging. J Membr Sci 2000; 171:105-17.

46. Gupta R., Beg Q.K. and Lorenz P. (2002b) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol., 59:15–32.

47. Varela H., Ferrari M.D., Belobradjic L., Vazquez A. and Loperena M.L. (1997) Skin unhairing proteases of Bacillus subtilis: production and partial characterization. Biotechnol. Lett., 19:755–758.

48. Hameed A., Keshavarz T. and Evans C.S. (1999) Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of Bacillus subtilis K2, for use in leather processing. J. Chem. Technol. Biotechnol., 74: 5–8.

49. shih Y.C, Prausnitz J.M. and Blanch H.W. (1992) Some characteristics of protein precipitation by salts. Biotechnol. Bioeng., 40: 1155-1164.44 Tsujibo et al., 1990, Kim et al., 1996

50. Yezza, A., Tyagi, R.D., Valero, J.R., Surampalli, R.Y., Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by Bacillus thuringiensis var kurstaki grown in waste water sludge, Process Biochem, Vol. 41, pp. 2006, 794–800.

51.Anagnostakis D. & Hankin A. (1975). Enzymes tests in bacterial identification. Biochem. J. 312: 543-583.

52. Larcher G., Bouchara J.P., Annaix V., Symoens F., Chabasse D. and Tronchin G. (1992) Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from Aspergillus fumigatus culture filtrate. FEBS Lett., 308: 65-69.

53. http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/

54.Audigié C. L. Fagerella J. & Zonszain F. (1984). Manipulation d'analyse biochimique. Doin. Paris. P. 270.

55.Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.Masson. Paris. P. 12-426.

56.Miller, 1972 NUM Experiments in molecular genetics Jeffrey H. Miller – 1972.

57.Prescott, C.E., Hope, G.D., Blevins, L.L., 2003. Effect of gap size onlitter decomposition and soil nitrate concentrations in a high-elevation spruce-fir forest. Can. J. For. Res. 33, 2210–2220.

58. Kembhavi, A A, Kulkarni, A & Pant, A (1993). Salttolerant and thermostable alkalien protease from Bacillus subtilis NCIM No. 64. Appl. Biochem. Biotechnol., 38, 83-92.

59. L. Cao, Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design, Wiley-VCH, (2005) 334.

60.E. Séverac, O. Galy, F. Turon, C.A. Pantel, J.-S. Condoret, P. Monsan, A. Marty,” Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oiltransesterification: Analysis of the economical impact, Enzyme and Microbial Technology”, 48 (2010) 61-70.

61.A. Magnusson, Rational redesign of Candida Antarctica lipase B, in, Royal Institute of Technology School of Biotechnology, Stockholm, 2005, pp. 12-16.

62.DT plummer(1987) An introduction to practical biochimestry (3°ed) Mc grow-hill ,London

63. A. Magnusson, Rational redesign of Candida Antarctica catalase, in, Royal Institute of Technology School of Biotechnology, Stockholm, 2005, pp. 20-28.