République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignementsupérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITE YAHIAFARES DE MEDEA



Faculté de la **T**echnologie

Mémoire de fin d'études de Master

Spécialité :Génie des Procédéspharmaceutiques

Thème :

Isolement de nouvelles souches productrices d'enzymes en vue d'une application industrielle.

Présenté par:

BADNI Sirine

Proposé et Dirigé par:

Dr.BENKIAR Amina

Annéeuniversitaire 2022-2023

Remerciements



Je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de Dr BENKIAR Amina, je la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant la préparation de ce mémoire.

J'adresse mes remerciements et ma gratitude à «MohammedSayah Madani» et à «Aymen».

Mes sincères remerciements a mesdames les membres de jury pour l'honneur qu'elles nous font en participant Au jugement de ce travail.

Je remercie sincèrement tous les enseignants du département de Génie des Procédés et Environnement de la Faculté de Technologie de l'Université de Médéa.

Mes profonds remerciements vont également à toutes les personnesqui m'ont aidé et soutenue de près ou de loin.

Dédicaces

Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail :

Àmes très chers parents

Je vous dois ce que je suis aujourd'hui grâce à votre amour, à votre patience, à vos innombrables sacrifices et pour tout l'enseignement que vous m'avez transmis.

Que ce modeste travail, soit pour vous une petite compensation et reconnaissance envers ce que vous avais fait d'incroyable pour moi.

À mon cher mari

Tarek mon bonheurpourleurgrand soutienet ses encouragements

Qu'Allah le protège.

À mes chères sœurs

Sabrina et Maria que j'aime profondément etqu'ALLAHlesprotège.

A ma chère sœur

Nourhane qui est toujours dans mon cœur. Que dieu la garde dans son vaste paradis.

À ma Grand famille paternelleBadni et maternelleAmor sans exception.
À ma belle-familleKoudjil.

À toutes mes amis

Raounak,Linda,Houda, Maissa, Nadia etMeroua.

A tous qui ont contribué dans ma formation depuis mon enfance. Toutespersonnes que je n'ai pas cité mais que je porte dans mon cœur et à tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin.

Sérine

الملخص :

الإنزيمات هي بروتينات قادرة على تسريع التفاعلات الكيميائية. تعتبر الإنزيمات اليوم أدوات مهمة لتصنيع وتثبيت وتوليد خصائص أطعمتنا. يتمثل هدف عملنا في البداية في عزل بكتيريا من مخلفات المذابح. تم استخدام وسط GNLلغرض فرز سلالات بكتيرية تفرز البروتياز. وبالإضافة إلى ذلك ، تم تحديد البكتيريا الأكثر نشاطًا وهيBacillus و .Staphylococcusتم تقدير القدرة البروتيوليتية لبكتيريا Bacillus باستخدام طريقةKhembhaviلتحسين وسط النمو وإنتاج البروتياز القاعدية. تُظهر النتائج المتحصل عليها في أن النشاط البروتيوليتي يعتمد على العديد من المعايير: طبيعة المواد الأساسية وتراكيزها وحتى الظروف الفيزيكوكيميائية (درجة الحرارة ، درجة الحموضة ، سرعة الخلط).

كلمات مفتاحية: بروتياز، بكتيريا، سينتيك النمو، نشاط بروتيوليتي ,Bacillus، Staphylococcus

Résumé :

Les enzymes sont des protéines capables de catalyser des réactions chimiques. Les enzymes sont aujourd'hui des outils importants pour fabriquer, stabiliser ou générer les propriétés de nos aliments. L'objectif de notre travail consiste dans un premier temps à isoler des bactéries provenant des effluents d'abattoir. Le milieu GNL a été utilisé pour le criblage des souches bactériennes sécrétrices de protéases. Par ailleurs, les bactéries les plus actives ont été identifiées, il s'agit de Bacillus et *Staphylococus*. Le pouvoir protéolytique de *Bacillus* été estimé par la méthode de Khembhavi afin d'optimiser le milieu de croissance et de production de protéases alcaline. Les résultats obtenus montrent que l'activité protéolytique dépend de plusieurs paramètres : nature des substrats et leurs concentrations et même les conditions physicochimiques (température, pH, vitesse d'agitation).

Mots clé : Protéase, Bactérie, *Bacillus*, *Staphylococus*, Cinétique de croissance, Activité protéolytique.

Abstract

Enzymes are proteins capable of catalyzing chemical reactions. Enzymes are more important tools for manufacturing, stabilizing, or generating the properties of our foods. The objective of our work is in the first time to isolate bacteria from slaughter house effluents. The GNL medium was used for screening bacterial strains secreting proteases. Furthermore, the most active bacteria were identified as Bacillus and Staphylococcus. The proteolytic power of Bacillus was estimated using the Khembhavi method to optimize the growth medium and production of alkaline proteases. The results obtained show that the proteolytic activity

depends on several parameters: nature of the substrates and their concentrations, as well as physicochemical conditions (temperature, pH, agitation speed).

Keywords: Protease, Bacteria, Bacillus, Staphylococcus, GrowthKinetics, Proteolytic Activity.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Les enzymes et leurs applications industrielles

1.1. Définition des enzymes ……...3

1.2. Classifications des enzymes…….3

1.3.Les hydrolases……...……...4

1.4. Les enzymes les plus utilisées en industrie ……...……..4

1.4.1.Les protéases ……...……...……..4

1.4.1.1.Définition……...……...……..……4

1.4.1.2. Classification et nomenclature des protéases ……4

1.4.1.2.1. Exopeptidases……..5

1.4.1.2.2. Endopeptidases…….……...6

1.4.1.3. Sources des protéases…….8

1.4.1.4.Applications industrielles de protéases……...……...9

1.4.1.4.1.Industrie alimentaire……...……9

1.4.1.4.2.Industrie pharmaceutique et médicale……...……10

1.4.1.4.3.Détergents ……...……...……..10

1.4.1.4.4.Traitement des eaux usées industrielles ……...……11

1.4.1.4.5.Tanneries……...……....11

1.4.1.4.6.Autres applications…..…….....11

Chapitre 2 : Les microorganismes.

2.1. Place des microorganismes dans le monde vivant…….12

2.2. Découverte du monde bactérien…….12

2.3. Généralité sur les Bactéries ……...12

2.3.1. Définition……12

2.3.2. La cellule bactérienne……13

2.4. Facteurs responsables à la multiplication bactérienne ……..16

2.4.1. La température……16

2.4.2. Le pH……...16

2.4.3. La présence d'oxygène……..…..17

2.5. La croissance bactérienne……..17

2.6. Application des bactéries dans le domaine industrielle ……19

2.6.1. En pharmaceutique……..19

2.6.2. En agro-alimentaire……20

2.6.3. En environnement……...21

2.6.4. En Bio-remédiation……21

2.6.5. En production de bio-polymère……...21

Partie expérimentale

Chapitre 3 : Matérielles et méthodes

3.1. Matériels ……22

3.1.1. Verreries et matériels……..22

3.1.2. Matériels biologiques…….....22

3.1.3. Produits chimiques et réactifs……22

3.1.4. Tampons…….……24

3.1.5. Milieux de culture……...24

3.2. Les méthodes ……25

3.2.1. Échantillonnage……...25

3.2.2. Préparation des dilutions……25

3.2.3. Isolement et purification de bactéries productrices de protéase……..26

3.2.4. Conservation des isolats protéolytiques……..27

3.2.5. Estimation de la zone des secrétions……...27

3.2.6. Les méthodes d'identification ……28

3.2.6.1. Examen microscopique……28

3.2.6.2. Les études physiologiques……...29

2.7. Cinétique de croissance……..30

2.8. L'activité protéolytique (caséinolytique)……..30

2.9. Optimisation du milieu de production des protéases……...……..32

a) Variation de la source de carbone et de sa concentration……...…..32

b) Variation de la source d'azote et de sa concentration……..…32

Chapitre 4 : Résultats et discutions

4.1. Isolement des souches bactériennes et purification……...34

4.2. Estimation de l'activité protéolytique……35

4.3. Identification des souches isolées …….36

4.4. Cinétique de croissance……..41

4.5. Dosage de l'activité protéolytique…….42

4.6. Optimisation du milieu de production des protéases…….43

4.6.1. Effet de la nature de la source carbone sur la production des protéases…….43

4.6.2. Effet de la concentration de la source de carbone sur la production des protéases……44

4.6.3. Effet de la nature de la source d'azote sur la production des protéases……..45

Conclusion générale……

Références bibliographique ……

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 1.1	Les six classes des enzymes	**3**
Tableau 1.2	Classification des protéases	**5**
Tableau 4.1	Test qualitatif sur GNL	**36**
Tableau 4.2	Tableau récapitulatif des tests d'identification	**40**
Tableau 4.3	pH et DO (600 nm) des différentes sources de carbone	**44**
Tableau 4.4	pH et DO (600 nm) des différentes concentrations en caséine**.**	**45**
Tableau 4.5	pH et DO (600 nm) des différentes sources d'azote	**46**

Liste des figures

Figure	Titre de figure	Page
Figure 1.1	Représentation simplifiée du conceptd'exopeptidases	**5**
Figure 1.2	Mécanisme d'action de l'endopeptidase et de l'exopeptidase	**8**
Figure 2.1	Différentes formes des bactéries	**13**
Figure 2.2	Structure d'une bactérie	**14**
Figure 2.3	Les bactéries à paroi positive- négative	**16**
Figure 2.4	Développement de différents types de bactéries en fonction du pH	**17**
Figure 2.5	Les phases de la croissance bactérienne en milieu liquide	**18**
Figure 3.1	Le lieu d'échantillonnage.	**22**
Figure 3.2	Prélèvement de l'échantillon et conservation.	**25**
Figure 3.3	Les différentes dilutions	**26**
Figure 3.4	Les étapes d'isolement et de purification	**26**
Figure 3.5	La conservation des souches.	**27**
Figure 3.6	les étapes de coloration des GRAM.	**29**
Figure 3.7	Optimisation de la source de carbone.	**32**
Figure 3.8	Optimisation de la source d'azote.	**33**
Figure 4.1	Isolement et purification des souches sur GNL.	**35**
Figure 4.2	Mesure les diamètres de zone de sécrétion de protéases	**36**
Figure 4.3	Observation microscopique (G*100)	**37**
Figure 4.4	Coloration de GRAM	**38**
Figure 4.5	Test catalase	**38**
Figure 4.6	Test oxydase	**39**
Figure 4.7	Test mannitol mobilité.	**40**

Figure 4.8 Profil de croissance de souches isolées **41**

Figure 4.9 Dosage de l'activité protéolytique **43**

Figure 4.10 Optimisation de la source de carbone **44**

Figure 4.11 Optimisation de la concentration en caséine **45**

Figure 4.12 Optimisation de la source d'azote. **46**

Liste des abréviations

ATP : acides tri phosphoriques.

E.C : Enzyme Commission.

GNL : Gélose nutritive à base de lait.

KDa :kilo Dalton.

LB : Luria Bertani.

LPS : Lipopolysaccharides.

PHA : Polyhydroxyalkanoates.

Introduction Générale

Les enzymes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme**[1]**. Elles sont présentes dans toutes les cellules et sont indispensables pour la survie de toutes les espèces vivantes**[2].** En effet, elles sont utilisées comme catalyseurs pour induire des réactions chimiques et stimuler les processus de production**[3].**

Le marché des enzymes est très prometteur, en effet, il a atteint 6,30 milliards de dollars US en 2022. Cette demande croissante est liée à l'expansion des installations de traitement des aliments et au nombre croissant de tanneries et d'installations de fabrication de textiles **[4].** Parmi ces enzymes, les protéases occupent une place centrale avec plus de 65 % du marché mondial **[3]** car elles offrent de nombreuses possibilités d'applications. Elles sont utilisées dans la transformation de la viande**[5],** la transformation des fromage**[6],** la transformation des aliments**[7],** la panification **[8],**le traitement de la laine et le dégommage de la soie dans les industries textiles **[9],** la récupération de l'argent dans les films photographiques**[10],**les industries du tannage **[11],** l'industrie de l'alimentation des volailles **[12].**

De plus, les protéases seretrouvent aussi bien dans les plantes que chez les animaux et les microorganismes.Les enzymes bactériennes sont les plus utilisées du fait que les bactéries peuvent croître plus rapidement que les espèces fongiques et ont donc un potentiel dans les applications industrielles**[13].**

L'objectif de notre travail est donc d'isoler à partir deseffluents, une nouvelle souche microbienne capable de fournir une protéase de bonne activité protéolytique, d'optimiser les conditions de production par le choix d'un milieu de culture. L'ensemble de ce travail est reparti en plusieurs volets :

Le premier volet comporte une synthèse bibliographique traitant les enzymes en général et les protéases en particulier, leurs classification, leurs application dans le domaine industriel. Et des généralités sur les bactéries,cinétique de croissance et les différentes applications industrielles.

Un deuxième volet consacrée à l'expérimentale, regroupant les méthodes utilisées lors de l'isolement, l'identification de la souche, la détermination du profil de la cinétiquedecroissance, ledosage de l'activitéprotéolytique et l'optimisation du milieu de production des protéases. Ensuite, une autre partie où les résultats obtenus sont représentés et discutés.

On termine par une conclusion générale qui rassemble tous les résultats et les perspectives à envisager.

Revue Bibliographique

Chapitre1 :

Les enzymes et leursapplications industrielles

1.1.Définition des enzymes :

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules protéiques de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa). Elles catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 106 fois, par rapport à la réaction en leur absence. En effet, les enzymes sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires **[14, 15, 16]**.

En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées **[17]**; la structure d'environ 1300 d'entre elles ont été déterminée **[18].**

Les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés **[19].**

1.2. Classifications des enzymes :

Selon la commission de l'Union Internationale de Biochimie **[20],** les enzymes se répartissent en six classes **(Tableau 1.1).** Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases **[21].**

Tableau 1.1 : Les six classes des enzymes **[21]**

Classes	**Les réactions catalytiques**
Oxydoréductases (EC 1)	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atome d'hydrogène).
Transférases (EC 2)	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, etc.).
Hydrolases (EC 3)	Réactions d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau).
Lyases (EC 4)	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse.
Isomérases (EC 5)	Réactions d'isomérisation (réaction o un composé est transformé en un de ses isomères).
Ligases (EC 6)	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP

1.3.Les hydrolases :

Les hydrolases 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. Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes, elles sont activables par des cations [**22].**

Il est très difficile de les classer. Le plus simple est d'étudier leur action sur quelques groupes de molécules. Généralement, les hydrolases produites par les champignons sont des enzymesendocellulaires (catalase, lactase et invertase) ou exocellulaires (amylases, cellulases, pectinases et protéases) **[23],** ces enzymes libérées dans le milieu extérieur ou localisées sur la surface de champignons, ce qui simplifie leur récupération.

Dans la nature, les microorganismes utilisent les enzymes pour dissocier les protéines, les polysaccharides, les lipides et d'autres grandes molécules, les réduisant en monomères, servant de source de carbone et d'énergie **[24].**

1.4.Les enzymes les plus utilisées en industrie :

1.4.1. Les protéases :

1.4.1.1.Définition :

Les protéases (enzymes protéolytiques ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases **[25]**. Eneffet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bienspécifiquesen scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique **[26].**

1.4.1.2. Classification et nomenclature des protéases :

Selon la nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et Biologie moléculaire, lesprotéases sont classées dans le sous-groupe 4 du groupe 3 des hydrolases.

Les protéases peuvent être classées en deux grands groupes : exopeptidase et endopeptidases, en raisondu site d'action, elles peuvent également être regroupées en trois types selon leur pH optimal, c'est-à-direles protéases acides : pH optimal inférieur à 7,0 (2,0–5,0), protéases alcalines : pH optimal au-dessus de7,0 et protéases neutres : pH optimal de 7,0 **[27].** Elles sont subdivisées en six groupes selon leur spécificité de chaîne latérale et sur legroupe fonctionnel présent au site actif:protéases à Sérine, protéases àCystéine, Protéases à acides aspartiques, les métalloprotéases, protéases à thréonine, protéases à glutamique **[28].**

Tableau 1.2 : Classification des protéases **[21].**

Type de protéase	Classe et sous-classes
Exopeptidases	Aminopeptidases :-Peptidyle peptidase ; - Dipeptidyle peptidases - Tripeptidylepiptidases
	• Carboxypeptidases :- Sérine carboxypeptidases -Métallo carboxypeptidases -cystéine carboxypeptidases
Endopeptidases	• Protéases sérines • Protéasescystéines ou protéasesthiols • Protéases aspartiques ou protéases acides • Métallo protéases

1.4.1.2.1.Exopeptidases :

Les exopeptidases n'agissent qu'à proximité des extrémités des chaînespolypeptidiques. En fonctionde leur site d'action à l'extrémité N ou C, elles sont classées en aminopeptidases et carboxypeptidases [**29,30,31].**

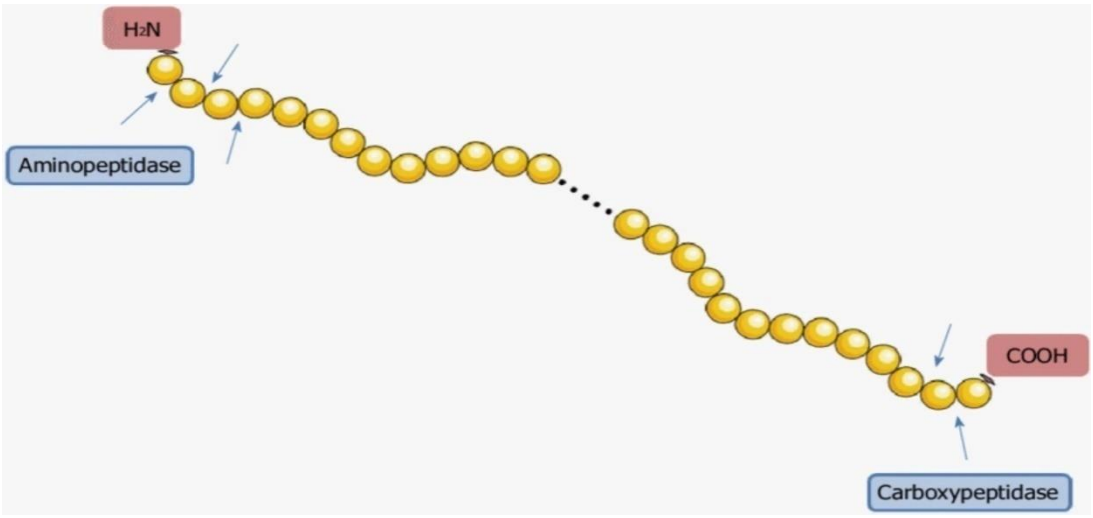


Figure 1.1: Représentation simplifiée du concept d'exopeptidases **[32].**

a) Aminopeptidases :

Agissent à une extrémité N libre de la chaîne polypeptidique et libèrent un seul résidu d'acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide. Ils sont connus pour éliminer l'acide aminé N-terminale méthionine qui peut être trouvé dans les protéines exprimées de manière hétérogène

mais pas dans denombreuses protéines matures naturelles. Les aminopeptidases sont présentes dans une grande variété de microorganisme, y compris les bactéries et les champignons **[29,30,31].**

b) Carboxypeptidases :

Agissent aux extrémités C de la chaîne polypeptidique et libèrent un seul aminoacideou un dipeptide. Les carboxypeptidases peuvent être divisées en trois groupes principaux, sérinecarboxypeptidases, métallo carboxypeptidases et cystéine carboxypeptidases selon lanature du résidud'acide aminé au site actif des enzymes**[21,29,30,31].**

1.4.1.2.2.Endopeptidases :

Sont caractérisées par leur action préférentielle au niveau des liaisons peptidiques des régions internes de la chaîne polypeptidique éloignées des extrémités N et C. La présence de groupe aminooucarboxyle a une influence négative sur l'activité enzymatique **[29,30,31,33].** Les endopeptidases sont divisées en quatre sous-groupes selon leur mécanisme catalytique:

a)Sérine Protéases (EC 3.4.21) :

Elles sont caractérisées par la présence d'un groupe sérine dans leur site actif. Elles sont abondantes et communes chez les virus, les bactéries et les eucaryotes, indiquant qu'elles sont utiles pour les organismes. Les sérines protéases se trouvent dans les groupes exopeptidase, endopeptidase, oligopeptidase et omégapeptidase**[29,33,34,35].**

b) protéases cystéines, ou thiols (EC 3.4.22) :

L'activité de toutes les protéases cystéines dépend d'une dyade catalytique constituéede la cystéine et de l'histidine. En général, les protéases cystéines sont actives uniquement en présence d'agents réducteurs tels que HCN, ou la cystéine. La papaïne est la cystéine-protéase la plus connue **[36].**

c)Protéases aspartiques ou protéases acides (EC 3.4.23) :

Ce sont les endopeptidases qui dépendent des résidus d'acide aspartique pour leur activité catalytique qui sont vitaux pour leur activité catalytique. Il est communément connu sous le nom de protéases acides. Ils sont principalement classés en deux groupes : les enzymes de type pepsine et de type rénine **[29,33,34,35].**

d) Métalloprotéases (EC 3.4.24) :

Les métalloprotéases sont les plus diversifiées des types catalytiques de protéases. Elles sont caractérisées par le besoin d'un ion divalent pour leur activité. Ces enzymes sont sensibles aux agentschélateurs mais insensibles aux agents sulfhydriques, les esters de phosphate ont un ion métallique impliqué dans leur mécanisme catalytique. Les protéases neutres et alcalines de nombreuses sources microbiennes appartiennent à ce groupe d'enzymes **[37].**

e) Protéases à thréonine :

Les protéases à thréonine sont des enzymes qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques impliquant l'acide aminé thréonine. Elles jouent un rôle dans la dégradation des protéines et maintiennent l'homéostasie cellulaire **[38].**

f) protéases glutamiques :

Les peptidases glutamiques sont un groupe distinct de peptidases caractérisées par un dyad catalytique composé d'un glutamate et d'un résidu de glutamine, une activité optimale au pH acide et une insensibilité à l'inhibiteur de la protéase d'origine microbienne, la pepstatine. Auparavant, seules les peptidases glutamiques dérivées de champignons filamenteux étaient caractérisées **[39].**

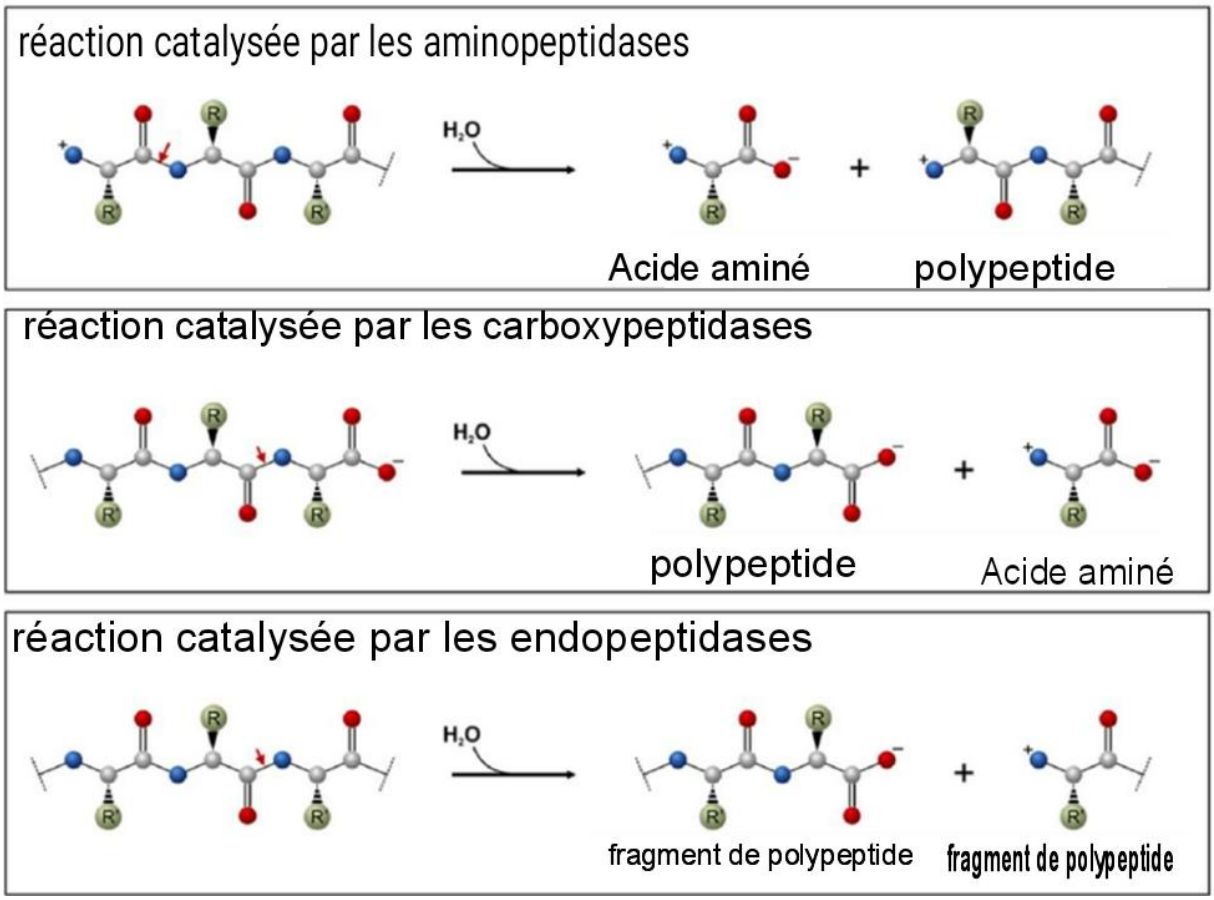


Figure1.2 : Mécanisme d'action de l'endopeptidase et de l'exopeptidase **[40].**

1.4.1.3.Sources des protéases :

Les protéases se trouvent partout dans la nature, à savoir dans les plantes, les animaux etles micro-organismes **[41].**

a) Protéases d'origine végétales :

L'utilisation de plantes comme source de protéases est régie par plusieurs facteurs tels que la disponibilité des terres pour la culture et l'adéquation des conditions climatiques pour la croissance **[21].**

La Papaïne, la broméline, les kératinises et la Ficine sont quelques-unes des protéases bien connues d'origine végétal, cependant, leur production à partir de sources végétales est un processus qui prend du temps **[42].**

b) Protéases d'origine animale :

Les protéases les plus connues d'origine animale sont la trypsine pancréatique, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine **[42],** ceux-ci sont préparés sous forme pure en grandesquantités mais la production de ces enzymes dépend de la disponibilité de bétail, qui est gouverné par lapolitique et les bris d'agriculture [**21].**

c) Protéases d'origine microbiennes :

Les micro-organismes représentent une excellente source de protéases, étant également la principale source de production **[43]**, elles possèdent presque toutes les caractéristiques requises pour leursapplications industrielles.

De plus, les microbes nécessitent un minimum d'espace pour la culture, unecroissance rapide, une productivité plus élevée à faible coût et peuvent être facilement manipulés génétiquement pour produire de nouvelles enzymes aux propriétés modifiées **[44].**

1.4.1.4.Applications industrielles de protéases :

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Lesprincipaux secteurs industriels employant des protéases sont :

1.4.1.4.1. Industrie alimentaire :

a) Préparation du fromage :

Les protéases sont utilisées pour la coagulation du lait, la principale étape de la production de fromage, depuis des milliers d'années **[45]**. Les industries de fabrication dufromage utilisent une source microbienne de protéases, parmi plusieurs classes de protéases, les protéases aspartiques sont considérées comme les meilleures pour les industries fromagères **[46].**

b) Boulangerie :

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

protéases d'origine bactérienne sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte **[21].**

c) Produits à base de soja :

Des protéases neutres et alcalines sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Les modifications des protéines du soja par les protéases aident àaugmenter leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, le traitement de ces protéines par la protéase alcaline alcalase à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats de protéines solubles avec des propriétés nutritives très intéressantes. Ces hydrolysats sont utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans les formulations d'aliments diététiques **[21].**

1.4.1.4.2. Industrie pharmaceutique et médicale :

La grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans ledéveloppement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple :

- Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont employées comme complément digestif chez des individus présentant des carences en enzymes, en enzymes lytique au sein de leur systèmedigestif.
- Des collagénases provenant de *Clostridium sp*. ou des subtilisinessont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement de brûlures et de plaies.
- Uneélastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès etdeplaiesprofondes **[47].**
- Une asparaginase provenant de *E. coli* est utilisée pouréliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes deleucémie **[21, 48].**

1.4.1.4.3. Détergents :

L'industrie des détergents représente la plus grande application industrielle d'enzymes équivalant à 25 à 30% des ventes totales d'enzymes **[49].**

Les Protéases obtenues à partir de *Bacillus sp*. Sont très utiles dans la fabrication de détergent à lessive. La demande de protéase compatible avec les détergents est élevée et, par conséquent, le criblage des bactéries productrices de protéase est un processus continu et leur

utilisation microbienne dans la fabrication de détergents est bonne pour la santé et la nature **[50].**

1.4.1.4.4. Traitement des eaux usées industrielles :

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. En effet, les protéases peuvent traiter les rejets riches en protéines **[51,52].**

1.4.1.4.5. Tanneries

Les protéases sont utilisées en tannerie depuis le début du siècle dernier pour leurscapacités à libérer les poils et la laine **[53].** Les trois traitements de la peau àtanner (le reverdissage, le délainage et le confitage) sont susceptibles de solutionsenzymatiques de protéases produites par *B. licheniformis*, *A. oryzae*et*B. amyloliquefasciens*.Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux quel'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporteplusieurs inconvénients **[21,48].**

1.4.1.4.6. Autres applications :

La protéase neutre peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Elles sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale**[54].**

Chapitre 2 :
Les microorganismes

2.1. La place des microorganismes dans le monde vivant :

Les microbes ne sont ni des animaux ni des végétaux, ils appartiennent à un troisième règne crée par Haeckel : celui des protistes. Auparavant, on rattachait volontiers les protozoaires au règne animal et les algues, les champignons ainsi que les bactéries au règne végétal.

Les protistes sont des êtres généralement unicellulaires et se subdivisent en deux sous-groupes **:**

- Les protistes supérieurs ou **« eucaryotes » ;**
- Les protistes inférieurs ou **« procaryotes ».** Ce groupe contient les bactéries et les cyanophycées (algues bleues) **[55].**

La place des bactéries dans le monde vivant a beaucoup varié. Elles ont été d'abord réunies avec les protozoaires mais l'absence de structures membranaires internes les a fait individualiser, ensuite sous le nom de procaryotes, par opposition aux eucaryotes pourvus de structures membranaires internes. Dans toutes ces définitions, les bactéries étaient caractérisées, non en elles-mêmes, mais par opposition aux autres classes d'organismes vivants **[56].**

2.2.Découverte du monde bactérien :

Dès 1546, Fracastoro suggéra que des organismes invisibles pouvaient être responsables des infections, mais c'est le Hollandais van Leeuwenhoek (1632-1723) qui a révélé à l'homme l'existence du monde microbien, en utilisant des microscopes simples. Les formes de bactéries qu'observait Leeuwenhoek n'étaient pas toutes identiques. Il a dessiné des formes sphériques (Cocci), des formes allongées, en bâtonnets (bacilles), et des spirilles contournés en spirale **[57].**

2.3. Généralité sur les bactéries :

2.3.1. Définition :

Les bactéries sont des micro-organismes dont la cellule unique ne comporte pas de noyau (cellule procaryote). On en trouve dans tous les milieux sous des formes très variées. Elles sont autonomes. Leur taille varie de 1 à 5 microns. Très abondantes, elles jouent un rôle

essentiel dans le recyclage de la matière organique. Elles vivent la plupart du temps en symbiose avec le milieu qui les abrite. Certaines espèces sont parasites et peuvent provoquer des maladies chez l'Homme, les animaux et les plantes, certaines sont mortelles **[58].**

2.3.2. La cellule bactérienne :

Les bactéries sont répertoriées selon plusieurs critères :

a) Selon la forme :

Les bactéries sont des organismes de formes variées. On distingue :

- Bactéries de formes arrondies ou Cocci, isolées, en chaînette ou en amas (nombre variable de cellules), exemple : *Staphylocoques*, *Streptocoques* …
- Bactéries de forme allongée ou bacilles isolés, en chaînette ou amas, de longueur et diamètre variables, exemple : *E. coli*, *Salmonella, Bacillus* etc.…
- Bactéries de forme spiralée, spirilles ou spirochètes comme : *Treponema…*
- Un groupe particulier de bactéries de forme filamenteuse se rapprochant des moisissures : les *Actinomycètes* **[59].**

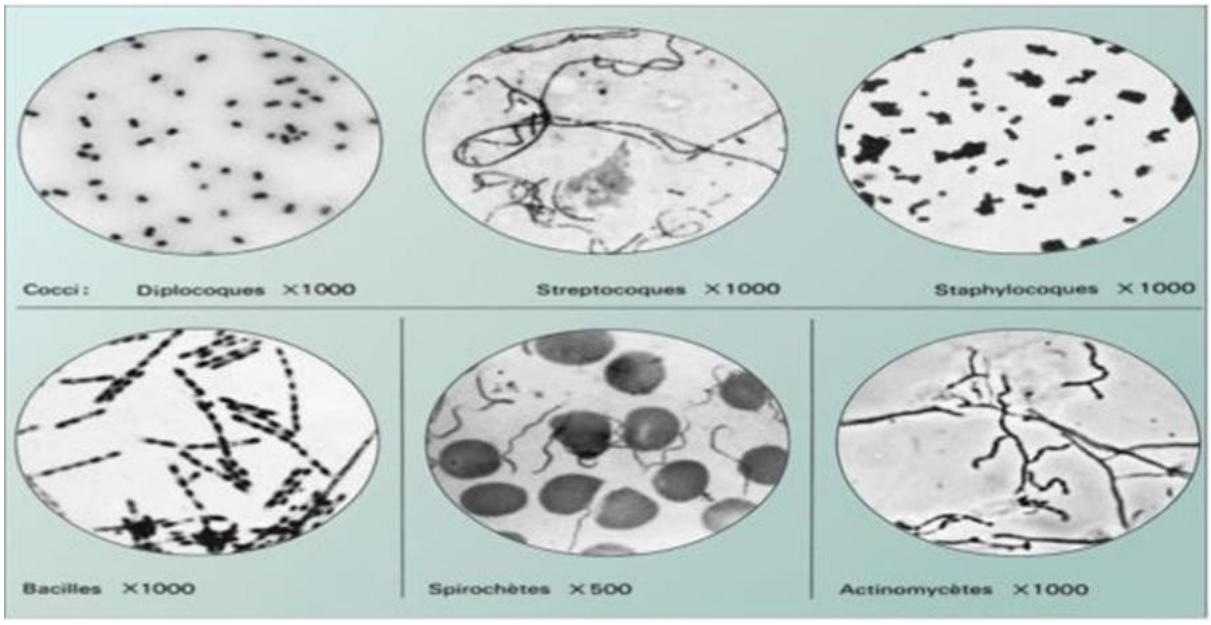


Figure 2.1 : Différentes formes des bactéries**[60].**

b) Structures d'une bactérie :

Chez les bactéries, on distingue des structures obligatoires, présentes chez toutes les bactéries et des structures dont la présence est facultative et caractérisent certains groupes bactériens.

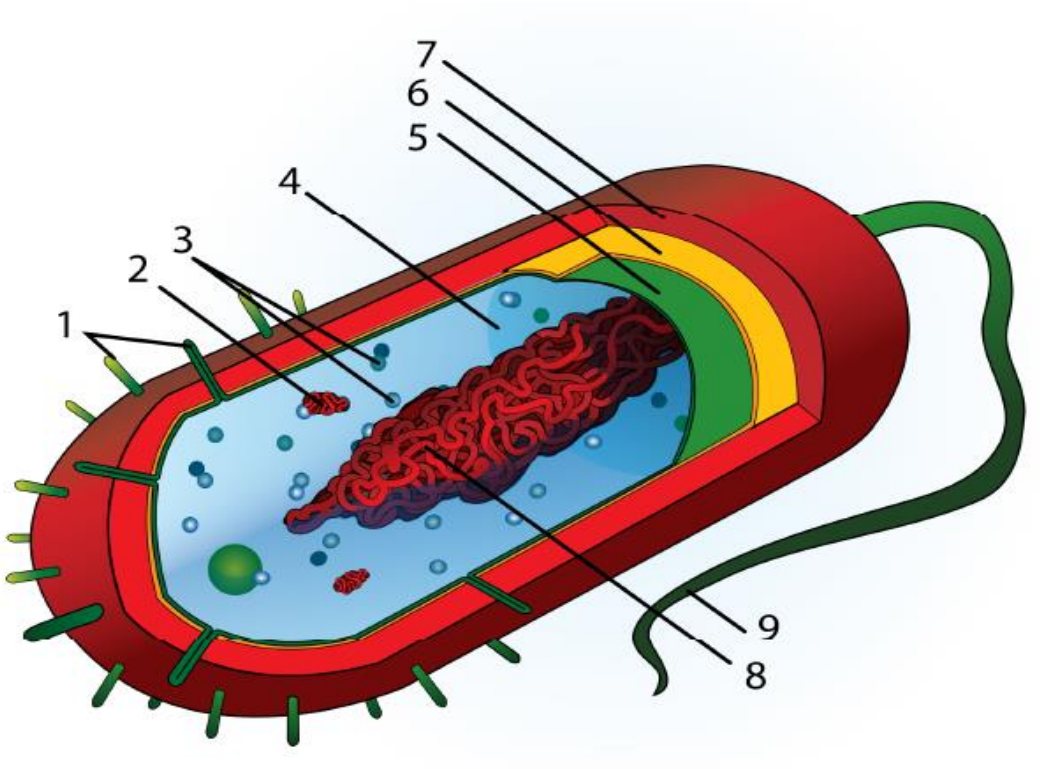


Figure 2.2 : Structure d'une bactérie **[61].**

1. **Pili :** structures semblables à des cheveux qui aident la bactérie à se fixer à des surfaces et àd'autres bactéries ;
2. **Plasmides :** matériel génétique (molécules d'ADN) ;
3. **Ribosomes :** structures qui fabriquent des protéines ;
4. **Cytoplasme :** matière vivante semblable à un gel dans laquelle les ribosomes et le matériel génétique sont contenus ;
5. **Membrane plasmique :** fine couche de phospholipides et de protéines qui régule le mouvement des nutriments dans et hors de la cellule ;
6. **Paroi cellulaire :** structure rigide qui entoure la cellule et protège la membrane plasmique ;

7. **Capsule :** troisième couche qui aide à prévenir le dessèchement de la bactérie ou à empêcher qu'elle soit engloutie par des microorganismes plus gros (présente uniquement dans certains types de bactéries) ;
8. **Nucléoïde :** amas de matériel génétique (ADN) ;
9. **Flagelle :** prolongement cellulaire qui aide les bactéries à se déplacer et à percevoir leur environnement.

c) La paroi bactérienne :

Une couche externe solide qui détermine la forme cellulaire. Elle constitue également une barrière de perméabilité qui exclut diverses molécules. D'une espèce bactérienne à l'autre, la paroi cellulaire peut différer beaucoup en épaisseur, en structure et en composition. Selon ces paramètres, on peut distinguer deux types de paroi et donc deux types de bactéries :

- **Les bactéries à paroi Gram négative :**

Ce type de paroi est de 20 à 30 nm d'épaisseur, composée de couches distinctes. On décrit la couche directement extérieure à la membrane cytoplasmique comme un « gel périplasmique » de peptidoglycane (en plusieurs couches), épais d'environ 15 nm (1 à 10%) du poids sec de la cellule, et une couche externe de la paroi, dite membrane externe qui est une bicouche lipidique contenant des protéines. Cependant, alors que la couche lipidique interne est faite de phospholipides, la couche lipidique externe, quant à elle se compose de macromolécules appelées lipopolysaccharides. Elle donne une coloration rose de paroi (LPS) **[62].**

- **Les bactéries à paroi Gram positive :**

La paroi est épaisse (de 30 à 300 nm), ayant un aspect simple et uniforme. Un polymère complexe et résistant, le peptidoglycane (muréine), constitue entre 40 à 80% de la paroi. Ce peptidoglycane, est fait de chaine linéaire hétéropolysaccharidique pontée par de courts peptides. Elle donne une coloration violette**[62].**

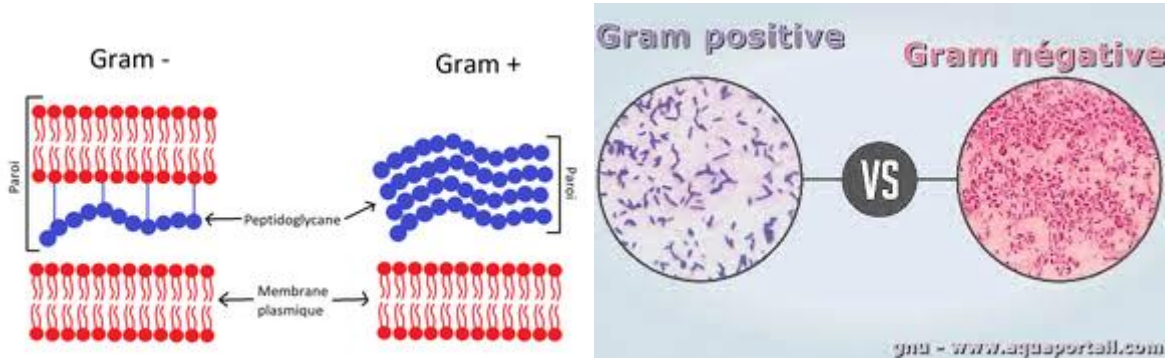


Figure 2.3 : Les bactéries à paroi positive- négative **[63,64].**

2.4.Facteurs responsables à la multiplication bactérienne :

2.4.1. La température :

Les bactéries, selon leur genre et espèce, peuvent se développer à des gammes de températurevariées, on les classe alors en 3 catégories **[65]** :

- Les psychrophiles (optimum de température compris entre 15 et 30°C) ;
- Les mésophiles (les plus communes, optimum de température compris entre 30 et 45°C) ;
- Les thermophiles (optimum compris entre 55 et 75°C).

2.4.2. Le pH :

On observe aussi une faculté de développement dépendant du pH **[66].** On classe des micro- organismes en 3 groupes :

- **Acidophile :** Des micro-organismes ayant un pH optimum de croissance entre 1 et5 ;
- **Neutrophiles :** Des micro-organismes ayant un pH optimum de croissance entre 5 et 7.5 ;
- **Alcalophile :**Des micro-organismes ayant un pH optimum de croissance entre 7.5 et 12.

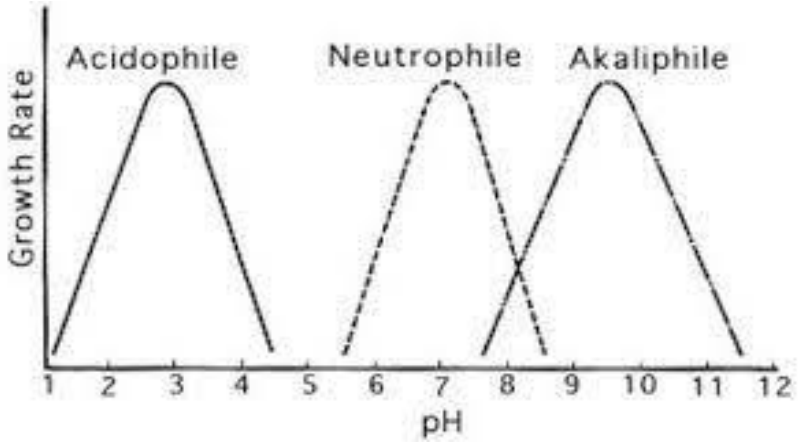


Figure 2.4 : Développement de différents types de bactéries en fonction du pH **[67].**

2.4.3. La présence d'oxygène :

Les bactéries possèdent des modes respiratoires variés : certaines nécessitent de l'oxygène pour leur croissance alors que, pour d'autres, l'oxygène peut être délétère. On distingue:

- Les bactéries aérobies strictes (exemple : *Pseudomonas*) nécessitant une teneur en oxygène moléculaire suffisante pour pouvoir se multiplier ;
- Les bactéries micro-aérophiles (exemple : *Campylobacter*) se développant uniquement lorsque la teneur en oxygène moléculaire est réduite ;
- Les bactéries aéro-anaérobies facultatives (exemple : *Escherichia coli*) dont la croissance n'est pas affectée par la concentration en oxygène moléculaire ;
- Les bactéries anaérobies strictes ne se développant qu'en absence d'oxygène (exemple : *Clostridium*)**[68].**

2.5. La croissance bactérienne :

La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné, en milieu liquide ou solide de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries.Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme**[69]**.Cette croissance peut être schématisée par 6 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance suivante**[70] :**

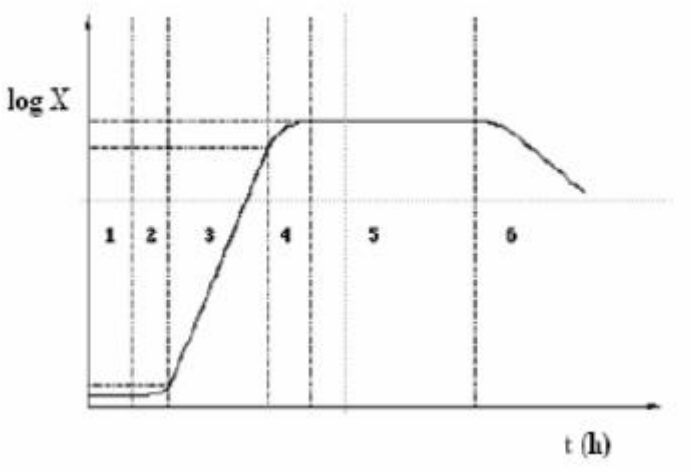


Figure 2.5 : Les phases de la croissance bactérienne en milieu liquide **[71].**

1° Phase de latence : peut être plus ou moins allongée selon les conditions préalables et la souche utilisée. Elle correspond à l'adaptation des bactéries aux conditions de culture, la température et le temps de synthèse des enzymes indispensables. C'est la phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance, le taux de croissance est nul ($\mu = 0$) **[70].**

2° Phase d'accélération de la croissance : caractérisé par une augmentation de la vitesse de croissance **[72,73].**

3° Phase de croissance exponentielle : le taux de croissance (μ) est le plus élevé et atteint sa valeur maximale (μ=max), le nombre de bactéries augmente en progression géométrique et cette phase est considérée en première approximation comme purement exponentielle. Elle dure tant que la vitesse de croissance est constante. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle) **[72, 73,74].**

4° Phase de décélération ou phase de ralentissement : cette phase intervient au fur et à mesure que le substrat s'épuise ou que des produits toxiques s'accumulent, le taux de croissance va diminuer et retrouve son niveau de base. C'est la fin de la phase exponentielle **[74].**

5° Phase stationnaire : arrêt de la reproduction, les bactéries vivent sur leurs réserves. Le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$), les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent **[72].**

6° Phase de déclin : elle correspond au vieillissement du milieu de culture. Il peut être plus

ou moins intense suivant les espèces bactériennes. Lorsque le milieu est épuisé on n'a plus de croissance active et le nombre de bactéries diminue, c'est la lyse des bactéries **[55].**

L'arrêt de la croissance est dû à un épuisement des substances nutritives, une modification des conditions métaboliques, une accumulation de produits toxiques.

2.6. Application des bactéries dans le domaine industrielle :

2.6.1. En pharmaceutique :

La biotechnologie est un procédé appliqué à la pharmaceutique dès le début des années 1980: le gène codant pour une protéine aux propriétés thérapeutiques est introduit dans un micro-organisme, qui fabrique ensuite lui-même la molécule d'intérêt. Des milliards de cellules de cet organisme sont obtenues par divisions successives dans des grandes cuves produisant des quantités industrielles du médicament.

Le premier exemple est celui du gène humain de l'insuline, isolé en 1978 par des biologistes de Genentech aux Etats-Unis et introduit en de multiples copies dans une bactérie appelée *Escherichia coli*. Cette souche microbienne est présente naturellement dans le système digestif humain. En ce qui concerne la variété des molécules issues de la biotechnologie dans le monde, 30% des produits sont générés par des bactéries. Même si, en termes de masse, les bactéries produisent la majorité des molécules sur le marché. Le reste étant produit par des cellules de mammifères **[75].**

L'hormone de croissance provient également en quasi totalité de bactéries recombinantes. Ceci évite de collecter des hypophyses humaines mais permet surtout de ne plus prendre le risque de transmettre la maladie de Creutzfeld-Jacob par le prion contaminant **[76].**

Les vitamines sont essentielles à la croissance et à la santé des animaux, qui ne peuvent produire des vitamines par eux-mêmes ou qui synthétisent une quantité insuffisante pour couvrir tous leurs besoins **[77,78].** Les méthodes de production des vitamines reposent soit sur la synthèse chimique, soit sur la production fermentative **[79]**.

2.6.2. En agro-alimentaire :

Les aliments ou les boissons fermentés sont obtenus par fermentation du produit alimentaire jusqu'à un niveau d'exigence souhaité. La fermentation est issue des microorganismes tels que des bactéries, des levures ou des moisissures.

Plus de 3 500 aliments fermentés existent dans le monde entier. Les plus connus sont les pains, les yaourts et les fromages en Europe et en Amérique du Nord. Puis, nous avons les fromages d'Afrique qui sont fabriqués à partir d'amidon fermenté (comme le manioc ou les ignames). Ils constituent une partie importante du régime alimentaire local. En Asie, il y a les produits fermentés à partir de fèves de soja ou de poissons. Ceux-là sont consommés quotidiennement dans le pays. Nous avons aussi des boissons fermentées. Ce sont non seulement des boissons alcoolisées mais aussi du thé, du café ou du cacao : dans ce cas les feuilles ou les fèves sont fermentées après la récolte. Cette fermentation entraine le développement des arômes caractéristiques du produit.

Grâce à la fermentation, les aliments sont plus nutritifs, plus savoureux et plus faciles à digérer. De plus, cette fermentation améliore la sécurité alimentaire, en aidant à conserver les aliments et à augmenter leur durée de vie, réduisant ainsi le besoin de réfrigération ou d'autres méthodes énergivores. Ce qui est très bien pour notre environnement d'ailleurs **[80].**

Différents types de microorganismes utiles en agroalimentaire :

Les bactéries lactiques (*Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc, Lactococcus,Pediococcus, Oenococcus,* …) interviennent dans l'affinage des fromages, dans l'élaboration des produits de charcuterie et de la choucroute notamment.

Les *Brevibacterium* sont responsables principalement de l'aromatisation et de la coloration de certains fromages lors de l'affinage.

Les bactéries acétiques (*Acetobacter, Gluconobacter*,…) interviennent dans la fabrication du vinaigre et du vin par exemple.

Les bactéries propioniques (*Propionibacterium*) interviennent dans l'affinage des fromages à pâte pressée cuite de type emmental (flaveur et " trous ").

2.6.3. En environnement :

L'utilisation des bactéries dans le traitement des eaux usées est une pratique courante dans les installations de traitement des eaux usées. Les bactéries jouent un rôle clé dans le processus de dégradation des matières organiques et des substances nocives présentes dans les eaux usées**[81].**

2.6.4. En Bio-remédiation :

Certaines bactéries sont capables de dégrader les polluants environnementaux présents dans les sols et les eaux souterraines. Par exemple, les bactéries dégradatrices d'hydrocarbures peuvent être utilisées pour traiter les sols contaminés par des déversements de pétrole. Les bactéries peuvent décomposer les hydrocarbures en produits moins toxiques et biodégradables**[82].**

2.6.5. En production de bio-polymère :

La production de bioplastiques par les bactéries est réalisée à l'aide d'un processus appelé fermentation microbienne. Les bactéries sont génétiquement modifiées pour produire des enzymes spécifiques qui convertissent les substrats disponibles en polymères de type plastique, appelés polyhydroxyalkanoates (PHA)**[83].**

Partie Expérimentale

Chapitre 3 : Matériels &Méthodes

Notre étude se base sur la recherche de nouvelles bactéries productrices de protéases. Pour cela notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'UniversitéYAHIA FARES MEDEA, (Algérie).

3.1. Matériels :

3.1.1. Verreries et matériels :

a) Verrerie de laboratoire: Erlenmeyers, Tube à essai, Seringue, Pipette Pasteur, Micropipette, Verre à montre, Boîte Pétri, Bucher, Eprouvette graduée, Tube Eppendorf, Fiole jaugée.

b) Petit matériel : Balance, Bec benzène, Agitateur, pH-mètre, Vortex,

c) Grand matériel : Shaker, Bain marie, Autoclave, Etuve, spectrophotomètre UV-Visible,microscope,Centrifugeusethermo statée.

3.1.2. Matériels biologiques :

Le matériel biologique de notre étude a été prélevé à partir de la fosse septique de l'abattoir municipale de la wilaya de Médéa de numéro d'agrément 26101 situé à rue 15 décembre, Médéa.

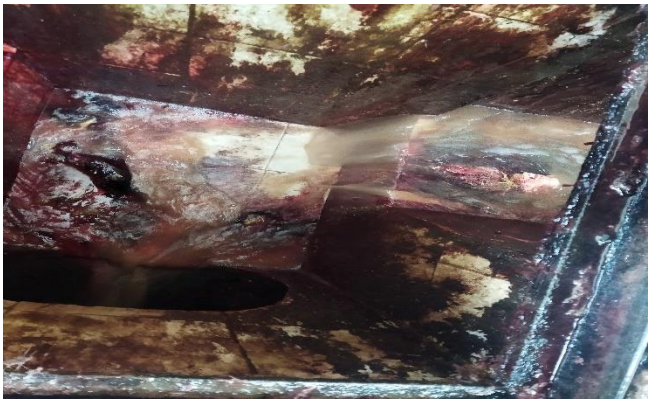


Figure 3.1 : Le cite d'échantillonnage.

3.1.3. Produits chimiques et réactifs :

Les produits chimiques et les réactifs utilisés sont :

- Lait écrémé (Candia).

- Eau physiologique.
- Peptone.
- Peptone de caséine.
- Agar.
- L'extrait de levure.
- Hydroxyde de potassium (NaOH).
- Gélatine.
- Peroxyde d'hydrogène(H_2O_2)
- Chlorure de calcium ($CaCl_2$).
- Diiode(I_2).
- Iodure de potassium (KI).
- Éthanol
- Violet de gentiane.
- Monohydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4).
- Potassium dihydrogénophosphate (KH_2PO_4).
- Sulfate de MagnésiumHeptahydrate ($MgSO_4$,$7H_2O$).
- Sulfate de fer heptahydrate ($FeSO_4, 7H_2O$).
- Chlorure de sodium (NaCl).
- Acide borique (H_3BO_3).
- Molybdate de sodium dihydraté ($MoNa_2O_4, 2H_2O$).
- Glycine.
- Glucose.
- Fructose.
- Lactose.
- Fushine
- Acide trichloracétique (TCA).
- Chlorure de zinc (ZnCl_2).
- Caséine.
- Nitrate de sodium (NaNO_3).

3.1.4. Tampons :

- Tampon Glycine NaOH 100 mM à pH 9,0-10,6.
- Tampon glycine NaOH + caséine.

3.1.5. Milieux de culture :

a) Gélose nutritive à base de lait (GNL)

C'est un milieu solide utilisé pour mettre en évidence le pouvoir protéolytique des souches enhydrolysant la caséine du lait introduite dans le milieu. Ce milieu est utilisé pour l'isolement et le criblage des souches productrices de protéases. L'activité protéolytique se manifeste par la diffusion d'un halo transparent dans le milieu qu'indique la sécrétion des protéases par les souches et l'hydrolyse des protéines du lait (Caséines). Il est composé de :

- Eau distillée 750mL.
- Lait écrémé 250mL.
- Peptone 5g.
- Agar 20g.

On ajuste le pH de milieu à (7.2-7.4) par une solution de NAOH et on fait une stérilisation à 120°C pendant 20 minutes après on rajoute le lait écrémé pasteurisé à 114°C pendant 15 minutes.

b) Milieu Luria Bertani (LB) liquide :

Le milieu Luria Bertani (LB) est utilisé pour la préculture des souches bactériennes. Il est composé de :

- 10g peptone.
- 5g NaCl.
- 5g extrait de levure.
- Eau distillée.

Le milieu subit une stérilisation pendant 20 minutes à 120 °C.

c) Milieu Luria Bertani (LB) solide:

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

d) Bouillon nutritif :

Les protéases alcalines sont produites sur milieu liquide dont la composition est la suivante: 15 g Caséine ; 5 g Peptone; 5 g $CaCl_2$; 1 g K_2HPO_4; 1 g KH_2PO_4; 1 g $MgSO_4$, $7H_2O$; 3 g NaCl dans un litre d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 10 avec du NaOH (0.1 N) avant la stérilisation. La gélatine est stérilisée séparément et elle est rajoutée au milieu après refroidissement (10g dans 1L).

Ce même milieu est amélioré pour la production des protéases en ajoutant 1% (v/v) d'oligoéléments (0.4 g $ZnCl_2$; 2 g $FeSO_4$ $7H_2O$; 0.065 g H_3BO_3 ; 0.135 g$MoNa_2O_4.2H_2O$ qui sont solubilisés dans l'eau qsp 1 L)

3.2.Les méthodes :

3.2.1.Échantillonnage :

Afin de s'assurer d'un bon isolement, l'échantillon prélevé est introduit dans un flacon stérile afin d'éviter l'introduction d'autres microorganisme qui n'existent pas dans le rejet. Ensuite, l'échantillon est transporté à 4 °C pour assurer sa conservation.



Figure 3.2 : Prélèvement de l'echantillon et conservation.

3.2.2. Préparation des dilutions :

En respectant l'ensemble des règles d'asepsie de manière à éviter toute contamination. Une quantité de 1 Ml du rejet est mise en suspension dans 9 mL d'eau physiologique stérile puis le mélange est agité au vortex pendant 2 min. Cette solution est considérée comme une solution mère.

Une série de dilutions est préparée dans des tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile, les dilutions sont réalisées à partir de la solution mère jusqu'à 10^{-6}**[84].**



Figure 3.3: Les différentes dilutions.

3.2.3. Isolement et purification de bactéries productrices de protéase :

Les ensemencements à partir de différentes dilutions ($10^{-2}, 10^{-4}$ et 10^{-6}) ont été réalisé sur des boites de Pétri individuelles contenant de milieu GNL.Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à trois températures différentes (30°C, 37 C°,45C°) dans un incubateur pendant 3 à6 jours pour un développement maximale **[85].**

La purification des colonies bactériennes (les colonies entourées de zone transparente) est effectuée par ensemencement en stries sur le milieu solide GNL. L'opération est reproduite plusieurs fois jusqu'à l'obtention des coloniesà aspect uniforme de chaque isolat.



Figure 3.4 : Les étapes d'isolement et de purification.

Le milieu solide GNL sélectif est utilisé communément pour l'isolement des bactéries productrices de protéase. La formation d'une zone claire (transparente) autour des colonies est le résultat de l'hydrolyse du substrat protéique.

3.2.4. Conservation des isolats protéolytiques :

Pour la conservation des souches protéolytiques ainsi purifiées, elles sont conservées sur milieu LB solide inclinée, après incubation à température approprié pendant 24 h au réfrigérateur à 4 °C **[86].**



Figure 3.5 : La conservation des souches.

3.2.5. Estimation de la zone des secrétions :

Le pouvoir caséinolytique ou protéolytique est défini par le rapport entre le diamètre (x) mesuré en mm de la zone de transparente autour de chaque colonie et le diamètre (y) en mm de la même colonie. Les souches ayant une forte activité protéolytique sont sélectionnées et retenues pour la poursuite de cette étude.

3.2.6. Les méthodesd'identification :

3.2.6.1.Examen microscopique :

a) Examen a l'état frais :

L'observation microscopique à l'état frais d'une goutte de culture permet de déterminer la morphologie et la mobilité de la bactérie**[87].**Le montage se fait à l'aide d'une pipette pasteur ou l'anse de platine sur une lame propre, une goutte de prélèvement, de culture en milieu liquide ou d'une suspension réalisée dans de l'eau distillée a partir des colonies ayant poussées sur un milieu solide. Ensuite la préparation est recouverte d'une lamelle. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope optique (G X 40). Cet examen met en évidence la présence des bactéries, la forme, le mode de regroupement et la mobilité**[88].**

b) Coloration de Gram :

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste DANOIS HANS CHRITIAN GRAM qui a mis au point le protocole en 1884. Elle permet la mise en évidence des propriétés de la paroi bactérienne afin de les utiliser pour la distinction et la classification.Cecipermet de donner une information rapide sur le type que sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu, tant sur le type que sur la forme.

Le test est réalisé parétalement sur une lame en verre propre d'une suspension bactérienne qui est séchée et fixée par une flamme. La lame est recouverte pendant une minute du réactif N°1(1% le violet de gentiane)puis lavée doucement à l'eau. La lame est ensuite recouverte par du réactif N°2(1% de I2 ,2% de KI)pendant une minute et de mêmelavéedoucement à l'eau. On ajoute par la suite du réactif N°3(1% alcool) pour la décoloration. On recouvre enfin la lame par le réactif N°4(1% la fuchsine)pendant une minute et ont réalise un lavage doux avant séchage,puis on observe au microscope optique (objectif GX100 à l'huile d'immersion).

La présence des spores peut être mise directement en évidence par examen microscopique d'un frottis coloré par la méthode de Gram. Elles se présentent sous forme de particules endocellulaires sphériques ou ovales non colorées et réfringentes. Dans des cas douteux, une coloration spécifique par le vert de malachite peut êtreréalisée**[89].**



Figure3.6 : Les étapes de coloration des GRAM.

3.2.6.2. Les études physiologiques :

a) Test de la catalase :

La catalase est une enzyme contenant du fer , qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air, des hydrogènes transportés par la voie oxydative directe. Elle est synthétisée par la plupart des bactéries en aérobies. Le test de la catalase sert àdétecter la présence de cette enzyme dans une souche bactériennes au peroxyded'hydrogène, la présence de catalase se manifeste par la formation de bulles de gaz (dégagementd'oxygène).

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram positives. Il est mis en évidence par le contact directe de la culture avec une solution fraiche de H_2O_2 à 10 volumes. Undégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles est observé **[90].**

b) Test de mannitol-mobilité :

Ce test permet à la fois l'étude de la dégradation du mannitol qui est un produit de l'hydrolyse du mannose et aussi de déterminer la mobilité. Les tubes sont ensemencés par piqure centrale à l'aide d'un fil droit et incubés pendant 24 h à la températureadéquate. Un virage de la couleur rouge du milieu vers le jaune à orange se manifeste en cas de réaction positive et la lecture de la mobilité est comme suit :

- Envahissement du milieu : la bactérie est dite mobile.
- Croissance concentrée autour de la piqure centrale : la bactérie est dite immobile **[91].**

c) Test de l'oxydase :

L'oxydase du cytochrome assure la fixation de l'oxygène moléculaire sur le cytochrome réduit.Ce test est essentiel pour orienter l'identification des bacilles et coque GRAM négatives. Pour cela, une parcelle de culture est déposée sur un disque de papier filtre imprègné de réactif (disque oxydase). Une coloration rose se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive **[92].**

2.7. Cinétique de croissance :

Les pré-cultures des isolats sont effectuées sur milieu LB dans des erlenmeyers de 250mL avec un volume utile de 50mL. L'incubation se fait pendant 18h aux températures correspondantes et sous une agitation de 250rpm.

Les cultures de ces isolats sont réalisées sur le milieu précité, inoculées par 1 mL de la pré-culture à 3 unités DO 600, l'incubation se fait pendant 72h à la températureadéquate et sous agitation de 250 rpm. Des prélèvements réguliers de 2 mL sont effectués toutes les deux heures.

2.8. L'activité protéolytique (caséinolytique) :

La plus connue est l'hydrolyse enzymatique de la caséine permettant la libération d'acides aminés aromatiques détectés sous UV à 280 nm. L'activité est évaluée comme étant la quantité d'équivalent Tyrosine libérée par unité de temps. L'activité protéolytique a été mesurée dans le surnageant de la culture obtenue après centrifugation pendant 15 minutes à5000 rpm, en déterminant la concentration des peptides solubles dans l'acide trichloro-acétique (TCA) à la concentration finale de 6,6%. L'activité protéolytique est estimée selon la méthode de Kembhavi.

Méthode de Kembhavi

Elle est évaluée selon le protocole suivant **[93] :**

- ✓ Mélanger 0,5 ml d'une solution de caséine (1% p/v) dans un tampon désiré en présence de 2 mM CaCl2 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 15000 rpm pendant 15 min ;
- ✓ Mesurer l'absorbance à 280 nm (correspond au maximum d'absorbance des Aa).

Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/ml/min dans ces conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage (Annexe 3), de 0 à 100 µg/mL, de tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions à partir de laquelle 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 :

$$\textit{Activité protéolytique}\ (U/\text{mL}) = DO * D * d\ /t * \mathbf{0.00553.1}$$

Avec :

DO : Densité optique ;

D : Correspond à la dilution de l'enzyme ;

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

t : Temps de la réaction en minute.

2.9.Optimisation du milieu de production des protéases :

a) Variation de la source de carbone et de sa concentration :

La pré-culture sur LB est utilisée pour ensemencer le bouillon à optimiser. La croissance et la production de protéase par la souche sont testées sur le milieu de base en variant les sources de carbone : Caséine, Gélatine, Glucose, Fructose et Lactose à raison de 5 g/l. Ensuite, on a optimisé la concentration de la meilleure source de carbone en la variant de 0 à 30 g/L.

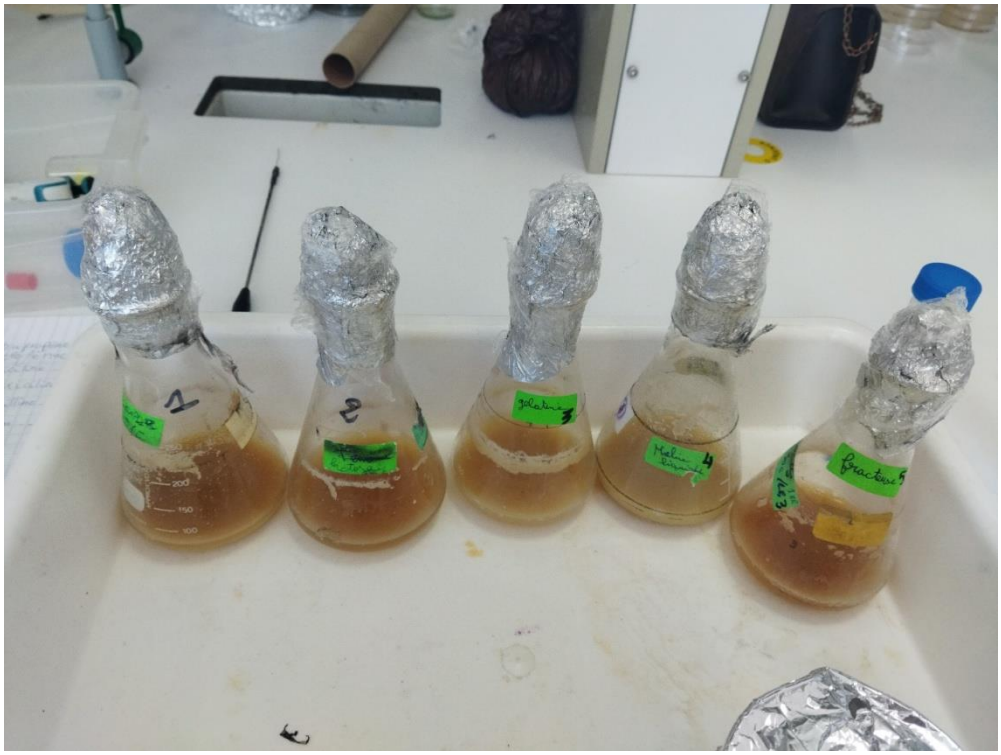


Figure3.7 :Optimisation de la source de carbone.

b)Variation de la source d'azote et de sa concentration :

Après avoir déterminé la source et la concentration optimale en carbone ; on à refait le même travail à fin d'optimiser la source d'azote organique ainsi que sa concentration. Les différentes sources d'azote organique utilisées sont ; extrait de levure et nitrate de sodium et ceci a des concentrations de0g allons 15g.



Figure3.8 : Optimisation de la source d'azote.

Chapitre 4 :
Résultats
& discussions

Depuis des siècles, l'homme exploite les capacités des systèmes biologiques en vue d'améliorer son existence et le monde dans lequel il vit. Sans doute, les biotechnologies ont vu le jour il y a des milliers d'années, quand l'homme a commencé à sélectionner des traits spécifiques chez certains végétaux et à fabriquer des aliments à l'aide de microorganismes.

Afin d'aboutir à des caractérisationsplus performantes, il n'a pas cessé de développer de nouvelles méthodes d'analyse.

Notre travail à pour objectif l'isolement de nouvelles souches bactériennes à fort potentiel de production de protéase, l'identification de cette souche et l'optimisation des conditions de production de cette protéase.

Il est reconnu que la production d'enzyme extracellulaire chez les bactéries est influencée par des conditions physiques (température, pH, temps d'incubation, vitesse d'agitation) et d'autre part, par les conditions chimiques (composition des milieux de culture). Un milieu de culture doit contenir qualitativement et quantitativement les sources indispensables pour la croissance des bactéries et pour l'induction de l'enzyme.

Le travail à été réalisé au niveau du laboratoire de biologie de la faculté des sciences de l'université YAHIA FARES DE MEDEA. En premier lieu, on était motivépour l'isolement de nouvelles souches productrices de protéases. Ensuite à sélectionner la plus performante et la plus active puis l'identifier. Et à la fin optimiser les conditions de croissance et de production.

4.1.Isolementdes souches bactériennes et purification :

Dans le but de trouver de nouvelles souches bactéries productrices de protéase, nous avons isolé des bactéries à partir des effluents d'abattoir. En utilisant la méthode des dilutions décimales et ensemencement sur milieu solide (GNL milieu utilisé pour déceler l'activité protéolytique extracellulaire) et incubation à différentes températures (30, 37 et 45 °C) pendant des durées de 24 jusqu'à 120 h, à fin de permettre un développement maximale de bactéries dans les différentes conditions.



Figure 4.1 : Isolement et purification des souches sur GNL.

Après incubation, les boites présentant un meilleur développement de microorganismes sont prises pour la poursuite de notre travail. Des repiquages successifs sur GNL ont été réalisés à fin de purifier les souches isolées.

4.2.Estimation de l'activité protéolytique :

La quantité de protéases sécrétées par les souches purifiées est estimée par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie. Ce test qualitatif indique la diffusion des protéases sécrétées dans la gélose environnante tout en hydrolysant les protéines du lait (notamment la caséine).

En se basant sur les rapports du diamètre de l'halo (mm) sur le diamètre de la colonie (mm), on a retenu celles qui ont un rapport supérieur à 1.

Les résultats obtenus après l'ensemencement des milieux GNL et incubation à 30°C et à 37 °C en fonction du temps, donnent des zones d'hydrolyse de diamètres différents suivant la capacité de chaque souche à dégrader le substrat disponible sur le tableau suivant ;

Tableau 4.1: Test qualitatif sur GNL

	La souche a 30 C°			La souche de 37 C°		
Diamètre (mm)	Dh	dc	dh/dc	dh	dc	dh/dc
24 h	1.6	1.5	1.066	2.4	2.0	1.200
48 h	2.2	1.6	1.375	3.7	2.7	1.370
72 h	3.5	2.1	1.666	5.0	3.0	1.666

D’après le tableau 4.2 on remarque que le diamètre de la zone transparente augmente avec celui de la colonie et en fonction du temps. Le diamètre du halo est proportionnel à la quantité de protéase sécrétée par les bactéries, soit à la diffusion des enzymes sécrétéesdans la GNL. Les souches incubées à 37 °C présentent des rapports supérieurs par rapport à celles incubées à 30 °C.



Figure 4.2 : Mesure des diamètres de zone de sécrétion de protéases.

4. 3. Identification des souches isolées :

Pour identifier les bactéries isolées, on a eu recours à des approches morphologiques, physiologiques et biochimiques.

4.3.1.Caractérisation morphologiques et physiologiques :

a) Examen microscopique :

L’observation microscopique des cellules à l’état frais n’a pas indiqué la forme exacte de ces souches.

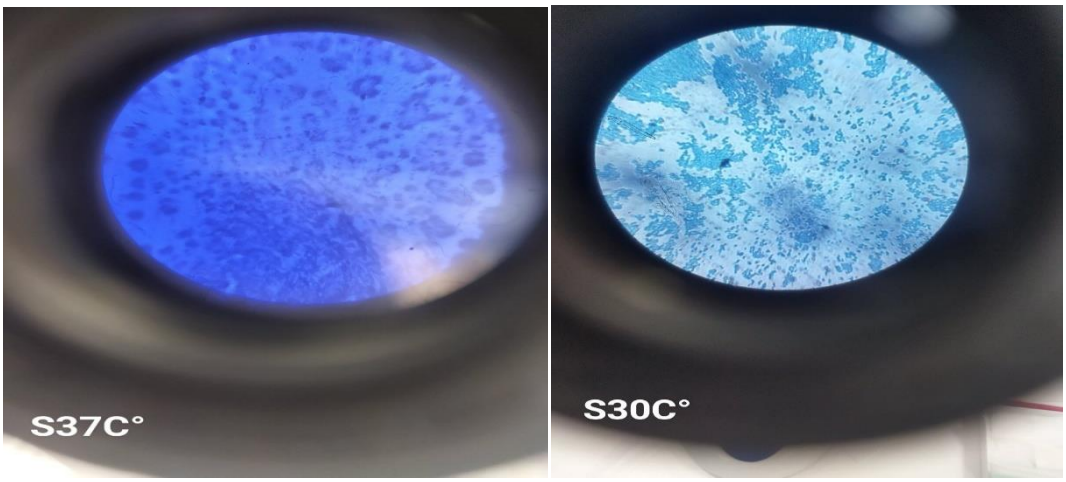


Figure 4.3 : Observation microscopique (G*100)

b) Coloration de GRAM :

La coloration de gram est la technique la plus utilisée en bactériologie. Elle permet la coloration des bactéries et leur distinction à l'examen direct par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou fuschine (Gram -). L'intérêt de cette méthode est de donner la forme des bactéries et la nature de la paroi.

Les bactéries qui apparaissent violettes sont dites Gram + et ont une paroi de peptidoglycanes épaisse.

Les bactéries qui apparaissent en rose sont dite Gram – et ont une paroi de peptidoglycanes fines et ont aussi une membrane externe lipidique.

L'observation des souches étudiées après coloration de Gram au « G x 100 », nous a révélé quelles sont de Gram positif. Les bactéries isolées et incubées à 37 °C ont une forme en bacilles par contre les bactéries isolées et incubées à 30 °C ont une forme cocci.

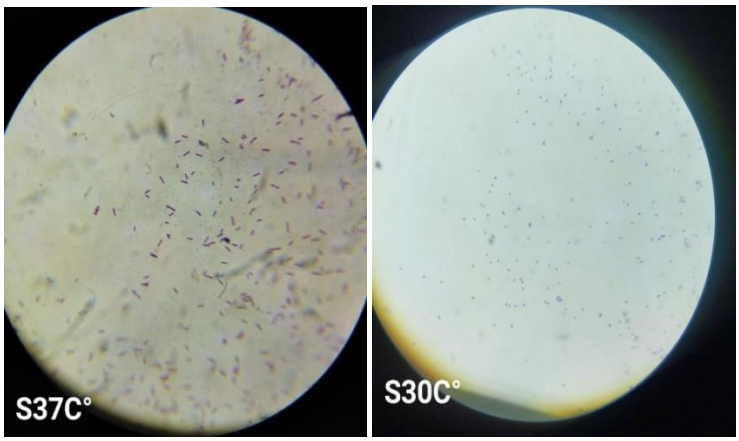


Figure 4.4 : Coloration de GRAM.

c) **Test catalase :**

La plus part des bactéries aérobies possèdent une catalase, son absence est donc un critère important d'identification. Les expériences effectuées sur les deux souches montres que ce sont des **catalases(+).**

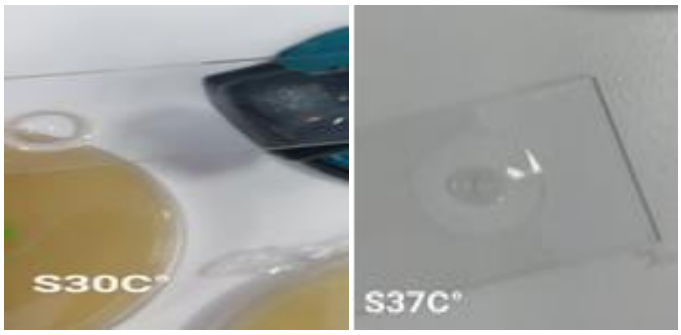


Figure 4.5: Test catalase.

d) Test oxydase:

La recherche d'oxydase est un test fondamental pour orienter l'identification des bacilles. Pour réaliser ce test on utilise des disques imprégnés de réactif chlorhydrate ou le PDA (disque oxydase). S'il y a apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, on dit que la bactérie est oxydase (+) et qu'elle possède le cytochrome oxydase. Si non la bactérie est oxydase (-) et qu'elle ne possède pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).

Les résultats de ce test montrent que:aucun changement de couleur n'est observé pour la souche incubée à 30°Cdonc elle est **oxydase (-)** (**La** couleur du disque n'a pas changé), par contre on observe la coloration du disque en violet pour la souche incubée a 37 °C donc elle est oxydase (+).

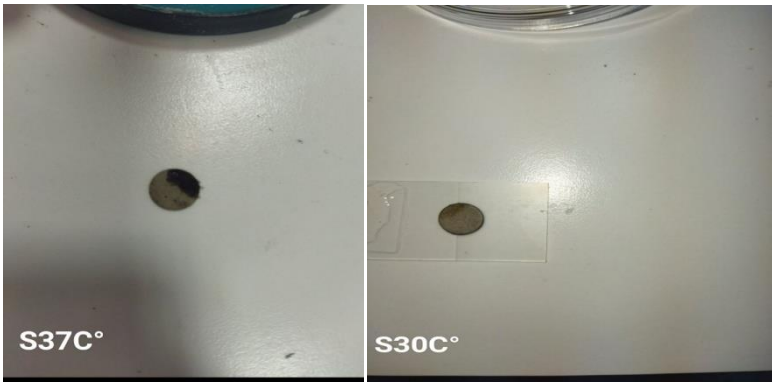


Figure 4.6: Test oxydase.

e) Test mannitol-mobilité:

Le test du mannitol permet la lecture de trois caractères :

- L'utilisation du mannitol ;
- La mise en évidence de la mobilité ;
- La présence d'une enzyme respiratoire qui est la nitrate réductase.

Ce test est un outil précieux pour discriminer les bactéries entre elles, donc un autre outil pour l'identification bactérienne.

Après incubation des tubes inoculés par les bactéries aux températures appropriées pendant 24 h, on a obtenu les résultats illustrés sur la figure 4.7.

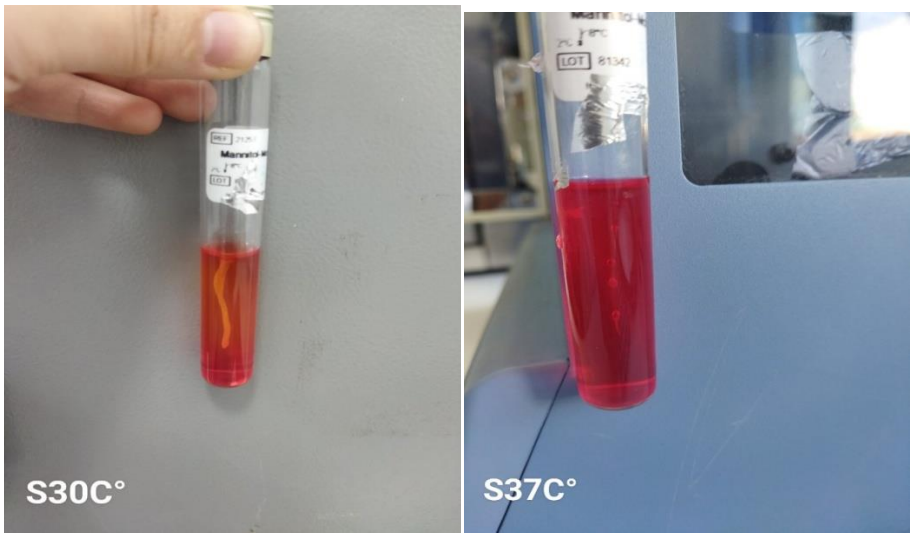


Figure 4.7 : Test mannitol mobilité.

La dégradation du mannose est observée par le virage de la couleur du rouge vers l'orange juste à l'endroit de l'inoculation du milieu mannitol pour les bactéries immobiles et le changement de couleur total pour les bactéries mobiles.

Les tests précédents ont révélé que la souche incubée à 30 °C est mobile, puisqu'on observe un virage de la couleur rouge du milieu vers le jaune à orangé. Tandisque la souche incubée à 37 °C est immobile, d'où on à une croissance concentrée autour de la piqure centrale et aucun changement de couleur n'est observé.

Tableau 4.2 : Tableau récapitulatif des tests d'identification.

	Bactérie incubée à 30 °C	Bactéries incubée à 37 °C
Forme	**Cocci**	**Bacilles**
Coloration de Gram	+	+
Catalase	+	+
Oxydase	-	+
Mannitol mobilité	+	-

D'après les résultats obtenus à partir des tests d'identification, on peut conclure que la souche incubée à 30 °C est du genre « Staphylococcus » et la souche incubée à 37 °C est du genre « Bacillus ».

Des études supplémentaires sont nécessaires à fin de pouvoir déterminer le genre et l'espèce.

4.4. Cinétique de croissance :

La détermination de la vitesse de croissance et le temps nécessaire pour l'adaptation de la bactérie productrice de protéases dans le boillon nécessite le suivi de la cinétique de croissance. Cette dernière est déterminée par des mesures de la densité optique à 600 nm dans des intervalles de temps bien déterminés. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure ci-contre :

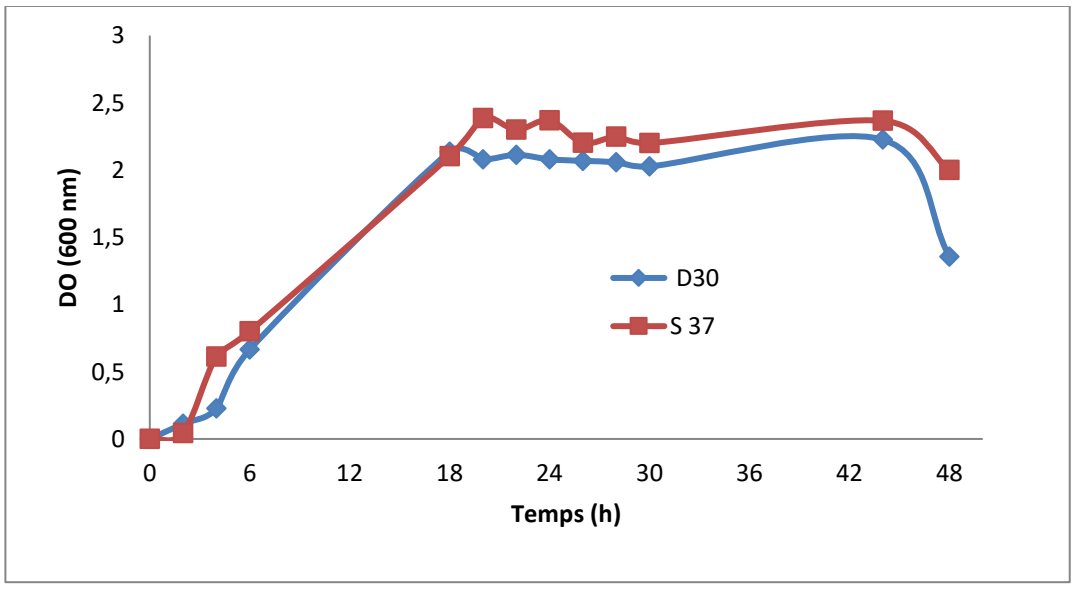


Figure 4.8 : Profil de croissance de souches isolées.

Le suivi de production de la croissance de deux bactéries nouvellement isolées en fonction du temps, montre que la multiplication des bactériescommence après une phase de latence de 4 heures pour les deux souches. Durant cette phase, les cellules sont actives et se précipitent à la synthèse de nouveaux constituants cellulaires de façon à s'adapter au nouveau milieu. La durée de cette période est influencée par la quantité et l'âge de l'inoculum ainsi que la composition du nouveau milieu par rapport à celle du milieu d'origine.

Suite à cette période d'adaptation les bactériescommençant à se multiplier, ils entrent alors en phase de croissance exponentielle. A ce moment, la vitesse de croissance atteint sa valeur maximale après 20 heures pour la souche incubée à 37 °C et 18 heures pour la souche incubée à 30 °C. Pendant cette période la population est homogène et chaque cellule possède les mêmes propriétés chimiques et physiologiques.

La phase stationnaire est de 20 à 44 heures pour la souche incubée à 37 °C et de 18 à 44 heures pour la souche incubée à 30 °C. Elle commence au moment où les nutriments du milieu s'épuisent, la population deviens alors stable, les déchets métaboliques produit par les cellules commencent à s'accumuler dans le milieu. En suite, la phase de déclin commence à partir de 44 heures pour les deux souches. On observe par la suite une diminution significative de la croissance qui se traduit par la mortalité des cellules due à l'accumulation des déchets métaboliques inhibiteurs et l'épuisement des nutriments essentiels.

A cause des conditions opératoires limitées une seule souche bactérienne a été retenue pour la poursuite de ce travail ; il s'agit de « *Bacillus* ».

4.5. Dosage de l'activité protéolytique :

L'ensemencement des bactéries sur GNL est un test qualitatif et non pas quantitatif. Dans le but de quantifier les protéases sécrétées, des cultures ont été réalisées sur un milieu liquide (bouillon a pH=10), dont les activités protéolytiques ont été mesurées suivant la méthode de Kembhavi dans les surnageantde culture. Les résultats trouvés sont représentés dans la figure 4.9.

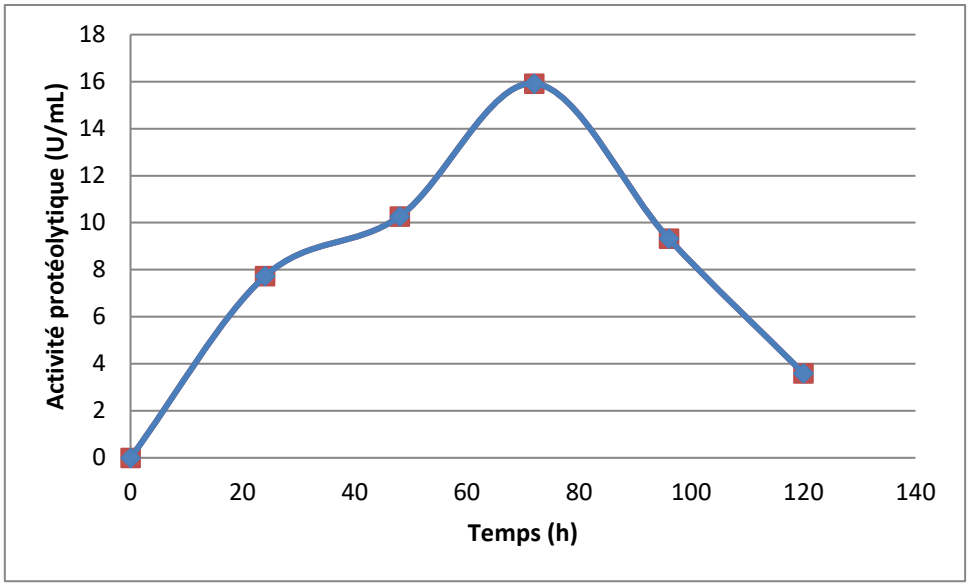


Figure 4.9 : Dosage de l'activité protéolytique

Les résultats illustrés dans la figure 4.9 montrent que la souche « *Bacillus* » présente le meilleur taux de production (15.92 U/mL). La production de protéase atteint son maximum après 72 h, au-delà elle commence àdiminuer. Cette diminution est probablement due à plusieurs paramètres, entre autre :

- Epuisement du milieu de culture ;
- Dégradation des protéases par les enzymes endogènes libérées suite à la lyse cellulaire ou à une protéolyse ;
- Inhibition par excès de production d'enzyme.

Le niveau de production de protéase sur milieu liquide dépend des exigences de la souche, de la composition du milieu, des concentrations et des conditions de culture (pH, température et vitesse d'agitation).

4.6. Optimisation du milieu de production des protéases :

A fin d'améliorer la production de protéases sécrétées par « *Bacillus* », différentes cultures ont été réalisées dans différents milieux.

4.6.1. Effet de la nature de la source de carbone sur la production des protéases :

Pour évaluer l'effet de la nature de la source de carbone sur la production des protéases, nous avons inoculé le bouillon (pH = 10) additionné de différentes sources de

carbone : Glucose, Lactose, Gélatine et Fructose à raison de 10 g/L. La croissance, l'activité protéolytique et le pH ont été déterminés et illustrés sur les figures 4.10 et le tableau 4.3.

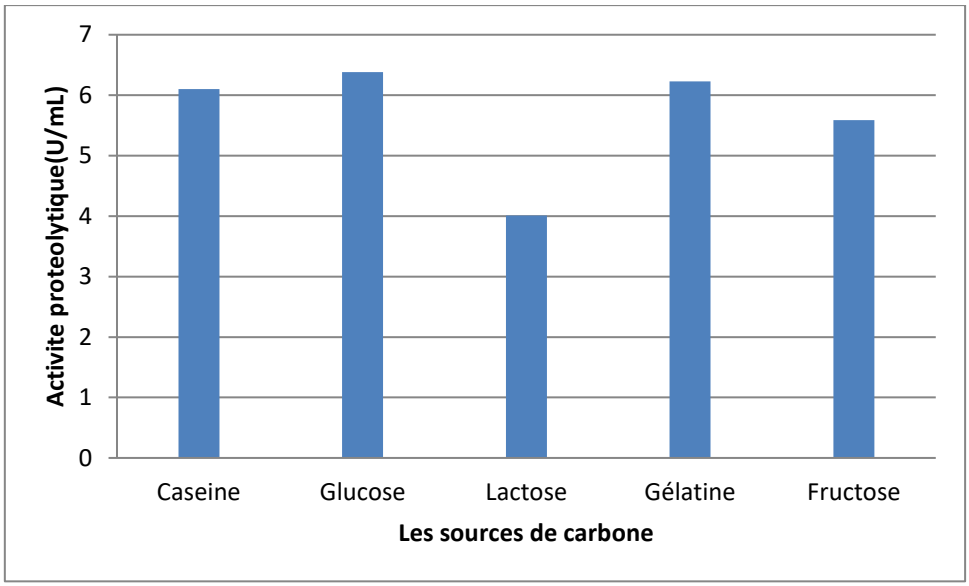


Figure 4.10 : Optimisation de la source de carbone

D'après la figure 4.10, on remarque que le glucose, la caséine et la gélatine constituent la meilleure source de carbone pour la production des protéases par notre souche.

Tableau 4.3 : pH et DO (600 nm) des différentes sources de carbone

Source de carbone	Caséine	Glucose	Lactose	Gélatine	Fructose
pH	8.93	8.26	8.53	8.67	8.03
DO (600nm)	2.531	2.312	1.583	2.186	2.160

Le tableau ci-dessus montre que le pH de tous les milieux à légèrement diminué et une croissance significative est observée sur les milieux à base de caséine et glucose (2.531 et 2.312). Par conséquent, la caséine représente la source de carbone la plus adéquate pour la production de protéases et la croissance de notre bactérie.

4.6.2. Effet de la concentration de la source de carbone sur la production des protéases :

Afin de déterminer la concentration optimale en caséine comme source de carbone, nous avons varié la concentration de cette dernière de 0 à 30 g/L. les résultats de cette optimisation sont représentés graphiquement sur la figure 4.11.

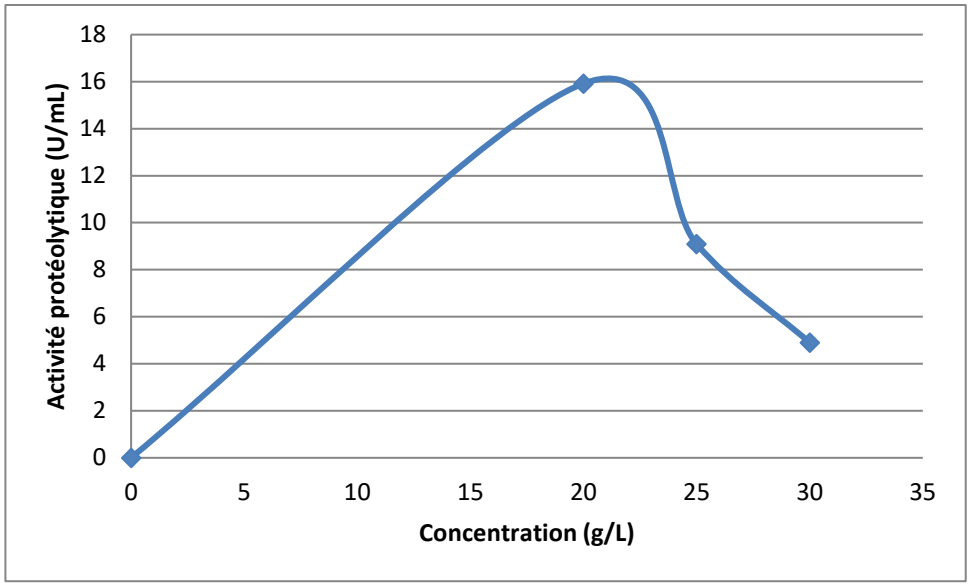


Figure 4.11 : Optimisation de la concentration en caséine.

On remarque que le niveau de production de protéases augmente quand la concentration en caséine est de 20 g/L où le maximum de production est obtenu.

Tableau 4.4 : pH et DO (600 nm) des différentes concentrations en caséine.

Concentration en caséine (g/L)	0	20	25	30
pH	10	8.93	9.06	8.96
DO (600 nm)		2.531	2.684	2.78

Les résultats présentés sur ce tableau montrent que la croissance bactérienne de la souche *« Bacillus »* augmentent avec la concentration en caséine avec une stabilisation de la valeur du pH. En effet, l'augmentation de la production est significative pour des concentrations de 20 g/L. Au delà de 20 g/L, on observe une diminution de la production de protéases.

A partir des résultats obtenus on constate que la caséine est la source de carbone la plus adéquate à 20 g/l.

4.6.3. Effet de la nature de la source d'azote sur la production des protéases :

Chez les microorganismes, l'azote est métabolisé pour produire essentiellement des acides aminés, des acides nucléiques, des protéines et certains composants des parois cellulaires. La production de protéase dépend considérablement de la disponibilité de la

source d'azote dans le milieu de culture. Pour cela, une série de culture à été réalisée sur un milieu contenant de la caséine additionné de différentes sources d'azote : extrait de levure et nitrate de sodium. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 4.12.

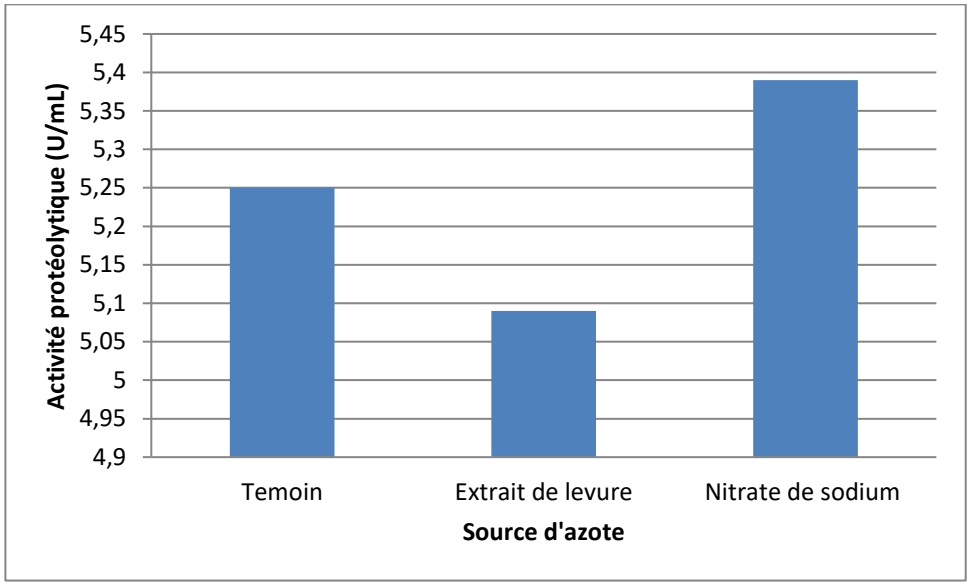


Figure 4.12 : Optimisation de la source d'azote.

Tableau 4.5 : pH et DO (600 nm) des différentes sources d'azote

Source de carbone	Témoin	Extrait de levure	Nitrate de sodium
pH	9.02	9.24	9.20
DO (600 nm)	1.391	2.221	2.659

La figure 4.12 et le tableau 4.5 montrent que le nitrate de sodium s'avère être le meilleur substrat azoté pour la production des protéases et la croissance. Cependant, une négligeable variation de pH est observée.

Conclusion Générale

Actuellement, les protéases microbiennes, en particulier celles sécrétées par le genre « *Bacillus* » dominent le marché mondial des enzymes. Ces biocatalyseurs sont d'un grand intérêt industriel et d'une grande importance économique.

La recherche de nouvelles protéases microbiennes pourrait conduire à de nouvelles applications biotechnologiques ou à l'amélioration des performances des enzymes existants.

C'est dans cet objectif que notre travail a été proposé, il s'articule sur la recherche de nouvelles souches bactériennes productrices de protéases alcalines à fin de les introduire dans une application industrielle.

Notre travail est basé sur les axes suivants ;

- ✓ L'isolement de souches bactériennes possédant une activité protéolytique à partir des rejets d'abattoir sur un milieu approprie (GNL) dont deux bactéries ont été retenues pour notre étude ;
- ✓ Les bactéries retenues présentent les meilleurs taux de production de protéases et ont été identifiéen utilisant les principales techniques d'identification (morphologie et physiologie), il s'agit d'une bactérie du genre *Bacillus* et une autre du genre *Staphylococus*
- ✓ Ensuite, on a optimisé le milieu de croissance et de production de protéases alcaline pour les *Bacillus* nouvellement isolées.

En constate que, la composition du milieu de culture ainsi que les paramètres physico-chimique influent sur la croissance bactérienne et la production d'enzymes. Donc pour avoir une enzyme à forte potentiel protéolytique, le milieu de développement doit répondre aux conditions optimales (la nature de la source et sa concentration).

En guise de perspective, nous envisageons de poursuivre ce travail dans le but d'identifier la bactérie isolée, optimiser son milieu de culture et l'introduire dans une application industrielle.

Références Bibliographiques

[1] Nobel,E-M. Nobel Prize. Eduard Buchner, 2004.

[2] VanBehen. J. B et Li.Z. Enzyme technology: an overview. Cuitent Opinion in Biotechnology, (2002), 13:338-344.

[3] Mukhtar. H, et Haq. I. Évaluation comparative des sous-produits agro-industrielspourlaproduction de protéase alcaline par des souches sauvages et mutantes de *Bacillus subtilis* enfermentation submergée et à l'état solide. Sciences Monde Journale, (2013), 1–6.

[4] Kuddus. M. Enzymes dans la biotechnologie alimentaire : production, applications etperspectives d'avenir. Academic Press, New York, (2019), p. 909.

[5] Rao. M, Tanksale .A, Ghatge. M, et Deshpande.V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. American Society for Microbiology, Division of BiochemicalSciences, National Chemical Laboratory, Pune India, 62 (3), (1998), p: 597-635.

[6] Gupta. A et Khare.S.K. Amélioration de la production et de la caractérisation d'uneprotéase stable aux solvants à partir de *Pseudomonas aeruginosa* tolérant aux solvants. Enzyme. Technologie microbienne. 42, (2007), 11-16.

[7] Delia. P.M, Susana. L.G, Balatti. A.ÿ. Production de protéases à l'aide de *Bacillussubtilis* 3411 et d'un milieu de farine de graines d'amarante à différentes Ca2+133 tauxd'aération. Brazilian Journal of Microbiology. 32, (2001), 6–9.

[8] Robinson. E, Mason .H, Iqbal. S, Garrod .A, Evans. G.S, Elms. J. Exposition auxenzymes dans l'industrie britannique de la boulangerie. Annule Occupation et Hygiène 50,(2006), 379–384.

[9] Ravel. H. et Banerjee. S.E. Effet des prétraitements enzymatiques et chimiques sur lespropriétés de la soie. Journal of Texte and Association. 64, (2003), 65–69.

[10] Shankar. S., More. S.V, Seeta. L.R. Récupération de l'argent à partir de déchets defilms radiographiques par la protéase alcaline de *conidioboluscoronatuskathman*du.Universal Journal of Science and IngestiveTechnology. 6, (2010), 60–69.

[11] Feroz. K. Nouvelles protéases microbiennes dans les industries du cuir et desdétergents. Innovation et Résources Chimique 1, (2013) ,1–6.

[12] Oxenboll. K.M, Pontoppidan .K, Nji .F.F. L'utilisation d'une protéase dans

l'alimentation des volailles offre des avantages environnementaux prometteurs. International Journal of Poultion and Science 10, (2011), 842–848.

[13] Gopinath. S. C., Anbu. P., Lakshmipriya T., Tang. T. H., Chen Y., Hashim. U., Ruslinda. A. R., Arshad. M.,Biotechnological aspects and perspective of microbialkeratinase production. BioMedresearch international, (2015).

[14] Bergmeyer. H.H, Gawekn.. K.,et al. Principe de l'analyse enzymatique. Tech. Et Doc. Lavoisier. Parie, (1979), P : 17,

[15] Pelmont. J. Enzymes : catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. P : 7 ; 621, (1995) 652–654.

[16] Drouin. M. Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître en sciences(M. Sc.). Canada, (2005).

[17] Patel. R., Dodia M., Singh. S.P. Extracellular alkaline protease from a newly isolated

Haloalkaliphilic Bacillus sp : Production and optimization. Proc. Biochem, 40 ;(2005), 3569–3575.

[18] Leisola. M., Jokela. J., Pastinen. O.et Turunen. O. Industrial use of enzymes. Laboratory Bioproc. Eng, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMSReserch, MD Geleen, The Netherlnds,(2001).

[19] Sandhya. C., Nampoothiri. K.M etPandey. A. Microbial proteases. Methods Biotechnol, 17 ; (2005), 165–179.

[20] Vincent. M. Blood glucose: Its measurement and clinical importance. ClinicaChimica, (1996).

[21] Raoet al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol.Mol. Biol. Rev., 62; (1998) 597-635.

[22] Bornscheuer. T. Microbialcarboxylesterases. classification, properties, andapplication in biocatalysis. FEMS Microbiology Reviews, (2002),P : 73-81.

[23] Meziani. A., et Mahcene.H. Activités hydrolases des souchesfongiques. Production par fermentation de cellulase et d'α-amylase par *Penicillium. Sp*sur substrat solide, (2017).

[24] Nabors. M. Biologie végétale. Paris : Pearson Education, (2008), p : 614.

[25] MichaelIbba. et Dieter Söll, « Aminoacyl-tRNAsynthesis », AnnualReviews Biochemistry, vol. 69,(juillet 2000), p : 617.

[26] Marina. V. Rodnina. et Wolfgang Wintermeyer, « Fidelity of aminoacyl-tRNAselection on The ribosome: kinetic and structural mechanisms », Annual Reviews Biochemistry, vol. 70,(Juillet 2001), p: 415.

[27] Sethi. B. K., Jana. A., K. Nanda. P., Mohapatra.P. K., & L. Sahoo. S. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10using chickling vetch peels. Journal of Taibah University for Science, 13 (novembre 2016).

[28] Kumar. D, Savitri Thakur, N., Verma. R., & Bhalla. T.C. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. Research Journal of Microbiology, (2008), 661-672.

[29] SajoMienda. B, Yahya. A, Galadima. I et Shamsir.M.S. An Overview of Microbial Proteases for Industrial Applications. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 5 ;(1), (2014), p : 388.

[30] Trehan. N. Microbial proteases : A review. World Journal of Pharmaceutical Research,8 ;(1), (2018), p : 358-373.

[31] ContreraGimenes. N, Silveira. E et Tambourgi. E.B. An Overview of Proteases : Production, Downstream Processes and Industrial Applications, Separation &PurificationReviews, 50(3), (2019), p :223–243.

[32]:https://www.researchgate.net/figure/Simplified-representation-of-the-concept-of-endo-and-exopeptidases-Endopeptidases-cleave_fig1_311750351 12/05/2023.

[33] Pushpam. L.P, Rajesh. T et Gunasekaran. P. A.M.B. Express.1(3), (2011), p :1-10.

[34] Geethanjali. S et Subash. A. Optimization of protease production by *Bacillus subtilis* isolated from mid gut of fresh water fish Labeorohita. World Journl of Fisheries and Marine Sciences ; 3, (2011), p :88-95.

[35] Mamo. J et Assefa. F. The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Foodand Beverage Industries. HindawiJournal of Food Quality, (2018).

[36] Monteiro. P. Biotechnology perspective of fungal proteases. Microbiology., 46 (2),(2015), p: 337-346.

[37] Chander. M. Recent advances in microbial production of proteases. InternationalJournal of Environmental Analytical Chemistry, (2019).

[38] Wang. L. X., & Yu. J. H. Threonine proteases : Recent advances and structural insights. Protein & cell, 9(5), (2018), p: 434-447.)

[39] Kenneth Jensen 1, Peter R Østergaard, Reinhard Wilting, Søren F: Identification and characterization of a bacterial glutamic peptidase ,**Lassen01 December** (2010).

[40]https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-action-of-Endopeptidase-andExopeptidase_fig1_325906130.

[41] Razzaq. A., Shamsi, S., Ali. A., Ali. Q., Sajjad. M., Malik. A., & Ashraf. M. Microbial Proteases Applications. Front. Bioeng. Biotechnol, (2019).

[42] Jisha. V. N., Smitha. R. B., Pradeep. S., Sreedevi. S., Unni. K. N., Sajith. S., Benjamin. S. Versatility of microbial proteases. Advances in Enzyme Research, (2013), p: 39-51.

[43] Aguilar. J. G., & Sato. H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. Food Research International, (2018),p: 253-262.

[44] Nawab. A., Ullah. N., Qasim. M., Rahman. H., Khan. S. N., Sadiq. A., &Adnan,M. Molecular characterization and growth optimization. Springer Japan, 8, (april 2016).

[45] Alavi. F., & Shima. M. Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in. International Dairy Journal, 11, (2020).

[46] Goutam. B., & Kumar. R. Impact of microbial proteases on biotechnologicalindustries. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, (2017).

[47] KUDRYA V.A. et SIMONENKO I.A. Alkaline serine protease and lectin isolation from the culture fluid of Bacillus subtilis. Applied Microbiology and Biotechnology

41, (1994), p : 505-509.

[48] GUPTA. R., BEG. Q.K. et LORENZ.P. Bacterial alkaline protéases: molecular approaches andindustrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology 59, (2002 a), p : 15-32.

[49] Singh. R., Mittal. A., Kumar. M., & Mehta. P. K. Microbial Proteases in CommercialApplications. Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological, (2016), p: 365-374.

[50] Banerjee. G., & Ray. A.k. Impact of microbial protéases on biotechnologicalindustries. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, (2017).

[51] Kumar. C.G., & Takagi. H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial iew point. Biotechnology Advances, (17), (1999), p: 561-594.

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

[53] Laxman. R.S., Sonawane. A.P., More. S.V., Rao. B.S., Rele. M.V., Jogdand. V.V., Deshpande. V.V et Rao. M.B. Optimization and scale up of production of alkaline protease from Conidioboluscoronatus. Process Biochemistry, 40, (2005), p : 3152-3158.

[54] Aviron-Violet. P., Baret. J.L., Bertrand. C., Blazy. B., & Bouvier. F. Lesenzymes : Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. 23(123), (1982), p : 140– 153.

[55] Boulahbal. F. Microbiologie S1 clinique. Office des publications universitaires, place centrale-Ben AKNOUN. Alger, (1986), p : 173.

[56] Flandrois. P. j,Court. R, Lemeland. F.J, Ramuz. M, Sirot. J, Soussy. C.J;Bactériologie Médicale. Presses universitaires de lyon. Français, (1997), 309.

[57] Philippon. A et Prots.L. Cours de Bactériologie Générale, Faculté de médecine COCHIN-PORT-ROYAL, Paris, (2002), p: 7-9.

[58] Darguère. J.M. Les antibiotiques. Intérêts, limites, alternatives naturelles, paru le 09/01/2003 : Dangles, (2003), p : 1-2.

[59] Rougier. A. Cour de bactériologie, 1TSBioT, PARIS, (2010), p : 1-3.

[60]https://www.universalis.fr/encyclopedie/bacteries/3-la-replication-et-la-division-de-la-cellule-bacterienne/15/05/2023

[61] Davidson. M. W. Bacteriacell structure. Florida State University, (2015, novembre 13).

[62] Singleton. Traduit de l'anglais par Dusart.J., bactériologie pour la médecine, la éme biologie et la biotechnologie, 6 édition, Dunod, Paris, (2005), P14-33.

[63] https://krobspro.ch/microbes/bacteries-gramplus/15/05/2023

[64] https://www.aquaportail.com/definition-2138-bacterie-a-gram-positif.htm15/05/2023

[65] Eddleman. H..Disknet : Optimum Temperature for Growth of Bacteria [enligne]. Disponible sur : http://www.disknet.com/indiana_biolab/b062.htm. [Consulté le 08/11/15], 1998.

[66] Lee. B., H. Fundamentals of Food Biotechnology, Second Edition. Wiley-Blackwell, (2014), p: 18-19.

[67] Todar. K. Todar's Online Textbook of Bacteriology: Nutrition and Growth of Bacteria [enligne]. Disponible sur : http://textbookofbacteriology.net/nutgro_4.html. [Consulté le : 08/11/2015].

[68] Marchandin. H. - Physiologie bactérienne. Faculté de Médecine Montpelli : Bactériologie. 5, (2007, B2), p : 1-2.

[69] Euzéby. J. : Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale, à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

[70] http://www.imedecin.com/Category1-All.htm.20/05/2023

[71] www.med.univmontp1.fr/.../modbase/MB7_Bio_Med/Ressources_locales/BACTERIO/B2-Physiologie_bacterienne.pdf 20/05/2023

[72] Freney. J., Renaud. F., Hansen. W. et Bollet. C. Précis de bactériologie clinique. Coordinateurs : Editions ESKA, (2000).

[73]Bosgiaud. C. Microbiologie générale et Santé, Coordinateur, Editions ESKA, (2003).

[74]http://www.microbes-edu.org/etudiant/etudiants.htm 20/05/2023

[75] Bulle. A. des bactéries cultivées pour produire des médicaments Aurélie CoulonPublié vendredi 17 octobre 2014 à 16 :5 Des bactéries bioréacteurs.

[76] Willem ROSKAM. La production industrielle de l'hormone de croissance, par La Recherche n° 188, mai 1987 - p.646.

[77] Capone. K., and Sentongo. T. The ABCs of nutrientdeficiencies and toxicities. Pediatr. Ann. 48, e434–e440. Doi: 10.3928/19382359-(2019)1015-01

[78] Suter. P. M. The B-vitamins. Essential Toxic Trace ElementsVitamins Hum. Health 2020, 217–239 doi : 10.1016/B978-0-12-805378-2.00017-6, (2020)

[79] Yuan. P., Cui. S., Liu. Y., Li. J., and Liu. L. Metabolic engineering for the production of fat-soluble vitamins: advances and perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol. 104, 935–951. Doi : 10.1007/s00253-019-10157-x, (2020).

[80] Séverine. Voyez comment les microorganismes sont nécessaires à notre santé, 5 novembre 2020.

[81] Liu. Y., Liu. S., & Tay. J. H. The effects of aerobic granule size on the sludge granulation process and the degradation of organicpollutants. Water Research, 42(13), 3545-3555. DOI : 10.1016/j.watres.(2008).04.008.

[82] Das. N., & Chandran. P. Microbialdegradation of petroleumhydrocarboncontaminants : An overview. BiotechnologyResearch International, 2011, 941810. Doi : 10.4061/(2011)/941810.

[83] Kundu. C., Kumar. A., & Chattopadhyay. S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates and itscopolymers : A review of recentadvancements. Frontiers in Microbiology, 8, 1621. doi : 10.3389/fmicb. (2017), 01621

[84] Abdesselam. N., Latache. N. E. H.. Identification et caractérisation des bactéries isolées à partir de différents sols, Diplôme de Master En Biologie Option Microbiologie, Université de Tlemcen, (2017), p.18.

[85] Iqbal. J., Haq. I., Javed. M.M., Hameed. U., Khan. A.M., Parveen. N. & Khan. T. S. Isolation of **Aspergillus niger** Strains from Soil and their Screening and Optimization for EnhancedCitric Acid Production Using Cane Molasses as Carbon Source, Journal of Applied Environmental and Biological Sciences., 5(4),(2015), p: 128-137.

[86] Font de Valdez, G. Maintenance of lacticacidbacteria. In food Microbiology protocols. Spencer. D. F. T. ET R agout ET spencer, A. LedsHumanapress.Totowa New jersey. Argentine, (2002),p : 163-171.

[87] Delarras. C. etTrebaol. B. Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : Réglementation -prélèvements - analyses. TEC & DOC, (2003), p.269.

[88] Rejsek F. Analyse des eaux : techniques et aspects réglementaires. Scérèn CRDP Aquataine, (2002), p.358.

[89] Lanotte. P., Isnard. C., Garnier. F. et Mereghetti L. Du prélèvement à la caractérisation des souches In : Bactériologie médicale Techniques usuelles, 3e édition Elsevier Masson SAS, (2016 a), p. 20.

[90] Marchal bourdon. J. L. et richard. C. Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Editeurs, paris,(1982), p.482.

[91] Frenry. J. et Renard. R. P. Précis de bactériologie clinique, 2ème édition, paris, (2007), p.1764.

[92] Flandrois. J. P. et Chomarat. M.L'examen cytobactériologique des urines. in : Bactériologie médical pratique, MEDSI / Mc GRAW-HILL, Paris ; 21, (1988), p.3-11.

[93] Kembhavi. A.A., et al., "The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays". Arch. Biochem. Biophys., (1993).303(2) : p. 208-213.