



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE VEGETALE

N°...../SNV/2015

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**MEKDOUR Zahra & HARAOUI Samia**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité:**

**GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE ET GÉNOMIQUE DES MICROORGANISMES**

**THÈME**

*Isolement et identification de certaines bactéries  
productrices de protéase provenant de plumes de poulet.*

Soutenue publiquement le ...../06/2017

DEVANT LE JURY

<i>Président</i>	: Mr. NEBBACHE S.	Grade U. Mostaganem
<i>Encadreur</i>	: Mr. CHIBANI A.	Grade U. Mostaganem
<i>Examineurs</i>	: Mr. BOUZNEB A.	Grade U. Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire de microbiologie*

# Remerciements

Avant toute chose, nous remercions « الله » qui nous a donné la patience, le courage et la volonté pour réaliser ce mémoire

Nous tenons aussi à présenter nos sincères remerciements

à notre encadreur le *Dr. CHIBANI A.* pour la confiance qu'il nous a accordée en

Acceptant cet encadrement

Pour sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce mémoire, pour son aide,

Ses critiques et ses suggestions, et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

Nous remercions Mr *NEBBACHE S.* d'avoir accepté la présidence du jury de la soutenance.

Nous remercions Mr *BOUZNEJ A.* qui a accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous tenons aussi à remercier *Dr. HIBA CHIBANI*

Nous voudrions remercier aussi les techniciens du laboratoire de microbiologie *Djillali, Mohamed,* et particulièrement *Hafida* pour sa patience, son aide précieuse et ses valeureux conseils.

Finalement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire .

Avous tous, un grand Merci

*M. Zahra*

*H. Samia*

# Dédicace

*Je dédie ce travail à mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU les bénisse.*

*À mes chères sœurs Khaira, Aïcha, et Hassiba*

*À mes chers frères frère Abd el ghani et Charef À tous mes amis*

*À tous mes amis surtout Chahrazed et Nacera ; elles sont le meilleur ami qui existe, je te souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.*

*À toute ma famille en entier Haraoui*

*À mon encadreur Dr. CHIBANI, Je remercie pour votre disponibilité et vos précieux conseils.*

*À tous mes collègues de promotion*

*À tous ceux que j'aime.*

SAMAI

## *Dédicace*

*C'est grâce a dieu, le tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que je dédie :*

*A mon très chères papa et ma très chère maman pour leurs sacrifices, soutien moral, tendresse, et encouragements tout au long de mes études et durant ce mémoire, ils m'ont offert tout pour que je réussisse, je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils m'ont fait, j'espère qu'ils sont fiers de moi.*

*A ma très chère sœur yamina, et a mes chères frères bouyakoub, morktar, abd errahmane, hamid, marwen, mehammed et leurs épouses qui m'ont donné, l'amour et le courage de surmonter toutes les épreuves.*

*A toutes ma famille en entière (mekdour et otman cherif).*

*A toutes mes amies à l'université pour leurs encouragements (fadila, amina, hanane, samiha, mariem, fatiha ,nadira, hadia) et je les remercie infiniment pour leur soutien.*

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : les six classes d'enzymes .....	02
<b>Tableau 02</b> : spécificités des protéases .....	04
<b>Tableau 03</b> : classification des protéases .....	07
<b>Tableau 04</b> : quelques protéases microbiennes .....	14
<b>Tableau 05</b> : exemples de protéases commerciales .....	17
<b>Tableau 06</b> : Screening primaires des isolats bactériens producteur de protéase Extracellulaire (caséines) par la méthode de repiquage sur un milieu solide LAE.....	32
<b>Tableau 07</b> : L'étude macroscopique a permis d'isoler 04 colonies distinctes par les caractéristiques regroupées .....	35
<b>Tableau 08</b> : Résultats de l'étude microscopique des souches isolées.....	38
<b>Tableau 09</b> : Les tests biochimiques effectués pour l'identification biochimique du S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> , S <sub>4</sub> et leurs résultantes.....	40
<b>Tableau 10</b> : Les densités optiques accordées aux différentes conditions de croissance des souches obtenues.....	50

## Liste des Figures

<b>Figure01</b> : distribution des ventes des enzymes.....	03
<b>Figure02</b> : Structure tridimensionnelle d'un métallo enzyme.....	08
<b>Figure03</b> : Structure de la chymotrypsine.....	11
<b>Figure04</b> : la structure cristalline de la papaïne.....	13
<b>Figure05</b> : diagrammes d'identification des coques à Gram positif.....	25
<b>Figure06</b> : protocoles d'identification des <i>Bacillus</i> spp.....	26
<b>Figure07</b> : galeries API 20 E témoin.....	30
<b>Figure08</b> : l'activité protéolytique (caséinolytique) des isolats sur le milieu sélectif LEA.....	33
<b>Figure09</b> : dénombrement de souche avec dilution $10^{-5}$ sur le milieu sélectif LEA.....	34
<b>Figure 10</b> : morphologie les colonies des isolats S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> , S <sub>4</sub> sur le milieu GN.....	36
<b>Figure11</b> : les endospores de l'isolat S <sub>1</sub> et S <sub>3</sub> sous le microscope photonique (100X).....	37
<b>Figure12</b> : réactions des S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> , S <sub>4</sub> à la coloration de Gram sous le microscope photonique, (100X).....	39
<b>Figure13</b> : aspect macroscopique des souches S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> , S <sub>4</sub> après le test catalase.....	42
<b>Figure14</b> : résultat de test mannitol mobilité des souches S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> et S <sub>4</sub> .....	42
<b>Figure 15</b> : résultat de test de glucose des souches S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> et S <sub>4</sub> .....	43
<b>Figure 16</b> : résultats de test de l'hydrolyse de l'amidon des souches S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> et S <sub>4</sub> .....	43
<b>Figure17</b> : résultat de test nitrate réductase pour les S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> , S <sub>4</sub> .....	44
<b>Figure18</b> : résultat de test de croissance de l'isolat S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> et S <sub>4</sub> sur 6,5% NaCl.....	44

<b>Figure19</b> : résultat du test VP pour les souches S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> etS <sub>4</sub> .....	45
<b>Figure20</b> : résultats de test de lécithinase pour les souches S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> etS <sub>4</sub> .....	46
<b>Figure21</b> : résultats de test de gélatinase pour les souches S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> etS <sub>4</sub> .....	47
<b>Figure 22</b> : résultats de test de Citrate pour la souche S <sub>1</sub> .....	48
<b>Figure23</b> : résultats pour la souche S <sub>2</sub> Sur milieu champ main.....	48
<b>Figure 25</b> : résultats de test arabinose pour la souche S <sub>2</sub> .....	49

## Liste des abréviations

**ml:** millilitre

**LEA :** lait écrémé-agar

**BN :** bouillons nutritive

**ARA :** Arabinose

**VP :** Vosges-Proskauer

**NIT :** nitrate

**UFC :** unité format colonie

**nm:** nanomètre

**E.C.** Enzyme Commission

**Ph :** potentiel d'Hydrogène

**GRAS:** Generally Regarded As Safe

**g :** gramme.

**h :** heure.

**% :** Pourcentage.

**°C :** Degré Celsius



## Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste d'abréviation

Résumé

Abstract

المخلص

Introduction

### Chapitre I : les protéases

1. Généralités sur les enzymes.....	1
1.1. Définition.....	1
1.2. Classification des enzymes.....	1
1.3. Origine des enzymes industrielles.....	3
1.4. Marché des enzymes.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2. Les protéases.....	4
2.1. Définition.....	4
2.2. Historiques.....	4
2.3. Classification des protéases.....	5
2.3.1. Les protéases à sérine.....	7
2.3.2. Les métalloprotéases.....	8
2.3.3. Les protéases à cystéine (E.C.3.4.22.).....	9
2.3.4. Les protéases acides ou aspartiques (E.C.3.4.23).....	10

### Chapitre II : Sources et les applications des protéases

1. sources des protéases.....	11
1.1. Protéases animales.....	11
1.3. Protéases microbiennes.....	13
1.3.1. Protéases bactérienne.....	15
1.3.2. Protéases mycètes.....	15
1.3.3. Protéases virales.....	16

2. Les Applications des protéases.....	16
2.1. Industrie alimentaire.....	17
2.2. Domaine pharmaceutique et médical.....	19
2.3. Détergents.....	19
2.4. Tanneries.....	19
2.5Autres applications.....	20
• Objectifs du travail	

### **Chapitre III : Matériels et méthodes**

1. Matériels.....	21
1.1. Matériel biologique.....	21
1.2. Milieux de culture.....	21
2. Méthodes.....	21
2.1. Isolement de bactéries productrices de protéase .....	21
2.2. Dénombrement des bactéries.....	22
2.3. Purification et conservation des isolats protéolytiques.....	22
2.4. Capacité des isolats protéolytiques d’hydrolyser d’autres substrats protéiques.....	22
2.5. L’identification de souches purifiées.....	22
2.5.1. Le Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology.....	23
2.5.2. Caractérisation phénotypique.....	23
2.5.3. Coloration des spores par le vert de malachite.....	24
2.5.4. Etude biochimiques (les tests d’orientation).....	27
2.6. Détermination des conditions optimales de croissance des isolats sélectionnés.....	31

### **Résultats et discussion**

1. L’isolement des bactéries productrices de protéases.....	32
2. Dénombrement (concentration des cellules bactérienne).....	34
3. Identification des quatre isolats protéolytiques prometteur.....	35
3.1. Examen macroscopique.....	35
3.2. Examens microscopiques.....	37
4. L’identification biochimique.....	40
6. Condition optimales de croissance de souches sélectionnées (S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub> et S <sub>4</sub> ).....	50

**Discussion**

**Conclusion et perspective**

**Références bibliographiques**

**Annexes**

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL**

Objectif de ce travail ont été :

- ❖ D'isoler des bactéries qui ont la capacité de produire des protéines protéases à partir de plume de poulet.
- ❖ De sélectionner les bactéries les plus performantes pour leur pouvoir protéolytique.
- ❖ D'identifier les isolats bactériens producteurs de protéase extracellulaire déjà sélectionnés en utilisant les tests biochimiques.
- ❖ De les caractériser en étudiant l'effet du pH et de la température sur leurs croissances.

# **Isolement et identification de certaines bactéries productrices de protéase provenant de plumes de poulet.**

## **Résumé**

Le but de ce travail était d'isoler et identifier des isolats bactériens, productrices des protéases à partir de plumes de poulet. Ainsi, 04 isolats bactériens ont été isolés et identifiés (S1, S2, S3, et S4) aux laboratoires de microbiologie de l'université de Mostaganem. Les isolats ayant une forte activité protéolytique (caséinolytique) du fait de la dégradation de la caséine. L'identification de ces quatre isolats protéolytiques, était basée sur les caractères morphologiques (étude macroscopique et microscopique) et sur les différents tests biochimiques disponibles au laboratoire. Ces tests nous ont permis de classer les quatre isolats trois genres différents. Les quatre isolats obtenus étaient : S1 (*Bacillus lichentiformis*), S2 (*Staphylococcus aureus*), S3 (*Bacillus macerans*), S4 (*Enterococcus spp*).

La température et pH optimaux pour la croissance de l'isolat S<sub>1</sub> (*B. lichoniformis* ) étaient 45°C et 9 respectivement. Le pH 7 était le pH optimal pour la croissance des isolats *Staphylococcus aureus* (S2) et *Enterococcus spp* (S4). Cependant la température optimale de croissance était de 30°C pour *B.Macerans* (S3), enfin *Enterococcus spp* atteint une croissance optimale à 55°C et pH de 5.

**Mots clés :** Bactéries protéolytique, activité caséinolytique, *Bacillus. Lichoniformis*, *Bacillus Macerans*, *staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp*, pH, température.

# Isolation and identification of some protease producing bacteria from chicken feathers.

## Abstract

The aim of this work was to isolate and identify protease-producing bacterial isolates from chicken feathers. Thus, 04 bacterial isolates were isolated and identified (S1, S2, S3, and S4) to the microbiology laboratories of the University of Mostaganem. Isolates having a high proteolytic (caseinolytic) activity due to the degradation of casein. The identification of these four proteolytic isolates was based on the morphological characteristics (macroscopic and microscopic) and on the various biochemical tests available in the laboratory. These tests allowed us to classify the four isolates in three different genera. The four isolates obtained were: S1 (*Bacillus lichentiformis*), S2 (*Staphylococcus aureus*), S3 (*Bacillus Macerans*), S4 (*Enterococcus* spp).

The optimum temperature and pH for the growth of isolate S1 (*B. lichoniformis*) was 45 ° C and 9 respectively. PH 7 was the optimum pH for the growth of *Staphylococcus aureus* (S2) and *Enterococcus* spp (S4) isolates. However, the optimum growth temperature was 30 ° C for *B.Macerans* (S3), and finally *Enterococcus* spp reached optimal growth at 55 ° C and pH of 5.

**Key words:** Proteolytic bacteria, caseinolytic activity, *Bacillus Lichoniformis*, *Bacillus Macerans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. PH, temperature.

# عزل والتعرف على بعض أنواع البكتيريا المحللة للبروتين من ريش الدجاج

## المخلص

كان الهدف من هذا العمل هو عزل وتحديد عزلات بكتيرية لها القدرة على إنتاج إنزيم البروتياز من ريش الدجاج. وهكذا، تم عزل 04 عزلات بكتيرية وحددت بالرموز (S1 ، S2 ، S3 ، S4) في مختبر علم الأحياء الدقيقة في جامعة مستغانم. تبين أن العزلات تتميز بنشاط محلل للبروتين بدرجة عالية (Caseinolytic) عن طريق مراقبة تحليل الكازين. تم التعرف على هذه العزلات المحللة للبروتين على أساس الصفات المورفولوجية (دراسة العيانية والمجهريّة) والعديد من الاختبارات البيوكيميائية المتوفرة في المختبر. وقد سمحت لنا هذه الاختبارات لتصنيف العزلات الأربعة إلى ثلاثة أجناس مختلفة. والعزلات الأربع هي S1 (*Bacillus lichentiformis*), S2 (*Staphylococcus aureus*), S3 (*Bacillus Macerans*), S4 (*Enterococcus spp*).

كانت درجة الحرارة ودرجة الحموضة المثلى للنمو S1 (*B.lichoniformis*)  $45^{\circ}C$  و  $9$  على التوالي. كان pH الرقم الهيدروجيني الأمثل لنمو (*Staphylococcus aureus*) (S2) و (*Enterococcus spp*) (S4). ومع ذلك، كانت درجة الحرارة المثلى للنمو 30 درجة مئوية لمدة (*B.Macerans*) (S3)، وصلت المعوية النياية أخيرا النمو الأمثل في  $55^{\circ}C$  ودرجة الحموضة 5.

**كلمات البحث:** البكتيريا المحللة للبروتين، والنشاط Caseinolytic ، *Bacillus linchoniformi s* ، *Bacillus Macerans*، *Staphylococcus aureus*، *Enterococcus spp* ودرجة الحموضة، ودرجة الحرارة.

### Introduction

Au cours des dernières décennies, les enzymes sont devenues une star des paillasses en Biotechnologies. Il convient de souligner que la forte présence de ces biocatalyseurs résulte de l'intérêt économique qu'elles présentent dans les différents secteurs de bioindustries.

Aujourd'hui, près de 4000 enzymes sont caractérisées, et parmi celles-ci presque 200 sont commercialisées pour usage industriel. Jusqu'aux années 60 du siècle dernier, le marché global des enzymes a été seulement de 6.30 Billion USD by 2022.

Avec un volume de chiffre d'affaires global de plus de 200 milliards d'euros dans le monde, depuis, le marché a connu une croissance spectaculaire et le taux de croissance annuel du marché mondial des enzymes et a été estimé en 2011 à 7,6 %, qui est une valeur de 6 milliards US\$.

Parmi les enzymes industrielles, les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes, soit environ 60%, avec un marché estimé à plus de 350 millions US\$ annuellement. Les enzymes utilisées dans l'industrie ont différentes origines mais les enzymes microbiennes sont souvent préférées aux enzymes provenant de plantes ou d'animaux en raison de la grande variété d'activités catalytiques potentiellement disponibles, des rendements de production élevés de la facilité de la manipulation génétique, l'approvisionnement régulier en raison de l'absence de fluctuations saisonnières et la croissance rapide de microorganismes sur des substrats peu coûteux.

A l'heure actuelle, seulement quelques 2% environ des microorganismes dans le monde ont été testés comme sources d'enzymes et des taux de manipulation génétique ou environnementales sont continuellement menés avec les souches microbiennes déjà répertoriées et classées GRAS (Generally Reconized As Safe) afin d'augmenter le rendement des cellules ou la qualité des enzymes produites. Cependant, le monde microbien regorge de potentialités catalytique et les travaux de criblage (screening) de nouvelles activités n'en demeure pas moins une alternative valable, et certainement plus accessible, de recherche de nouvelles enzymes, en particulier au niveau de niches écologiques exotiques et de souches microbiennes non encore explorées.

A cet effet, on a tenté à isoler et identifier des bactéries ; à partir de plumes de poulet, exerçant une activité protéolytique élevée vis-à-vis de protéines à savoir la protéase (caséine).



## Les protéases

### 1. Généralités sur les enzymes

#### 1.1. Définition

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa) 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 (**Bergmeyer *et al.*, 1979; Pelmont, 1995; Drouin, 2005**). En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (**Patel *et al.*, 2005**) ; la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (**Leisola *et al.*, 2001**). Les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés (**Sandhya *et al.*, 2005a**).

#### 1.2. Classification des enzymes

Depuis 1961, l'union internationale de Biochimie a codifié la nomenclature et la classification des enzymes sous une nomenclature dite officielle (**Bergmeyer, 1979**).

Toutes les enzymes actuellement connues sont répertoriées sous un numéro portant 04 nombres séparés par des points et précédés de EC (Enzyme Commission) soit (EC x1.x2.x3.x4). La signification des nombres est la suivante :

- X1 : Le premier nombre pouvant varier de 1 à 6 indique le type de réactions.
- X2 : le deuxième désigne la sous-classe de l'enzyme qui est définie suivant son mécanisme d'action.
- X3 : le troisième nombre désigne la nature de la molécule qui sert d'accepteur, lorsqu'il s'agit d'un transfert d'électrons.
- X4 : le quatrième nombre est un numéro d'ordre dans le groupe et dans le sous-groupe.

Lorsqu'une enzyme se termine par 99, cela signifie qu'elle est incomplètement caractérisée. Selon cette classification, les enzymes se répartissent en six classes (tableau 1). Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases (**Rao *et al.*, Assamoi *et al.*, 2009**).

**Tableau 1. Les six classes d'enzymes (Bergmeyer, 1979)**

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

### 1.3. Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles proviennent de source végétale, animale ou microbienne. L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. En effet, les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (Scriban, 1993).

### 1.4. Marché des enzymes

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

Parmi les enzymes industrielles, les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes, soit environ 60% (García-Gómez *et al.*, 2009; Rai et Mukherjee, 2010) (figure.1). Les ventes industrielles des protéases sont estimées à plus de 350 millions US\$ annuellement (Kumar *et al.*, 2008a).

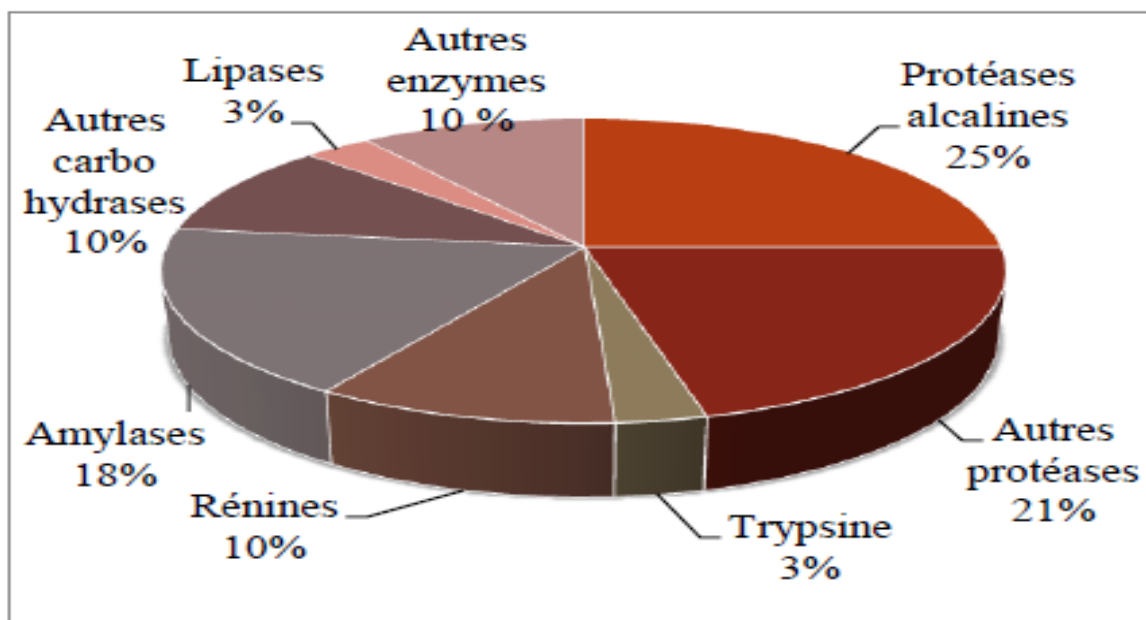


Figure. 1. Distribution des ventes des enzymes (Rao *et al.*, 1998).

## 2. Les protéases

### 2.1. Définition

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique (**Tableau 2**) et sont produites extracellulairement comme intracellulairement (**Kumar et al., 2008b**). Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux (**Pelmont, 1995**). Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulatrices plus spécifiques (**Kumar et al., 2008a**).

**Tableau 2. Spécificité des protéases (Rao et al., 1998).**

Enzyme	Liaison peptidique à clivée
Trypsine	-Lys (ou Arg)↓-----
Chymotrypsine, subtilisine	-Trp (ou Try ,Phe, Leu)↓ -----
Staphylococcus V8 protéase	-Asp (ou Glu) ↓-----
Papaïne	-Phe (ou Val, Leu)↓ -----
Thermolysine	-----↓ Leu (ou Phe) -----
Pepsine	-Phe (ou Tyr, Leu)↓Trp (ou Phe, Tyr)

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

### 2.2. Historiques

Les hydrolases qui clivent des liaisons peptidiques sont généralement connues sous le nom de protéases, peptidases, protéinases ou enzymes protéolytiques. Historiquement, les études basées sur ces enzymes ont été visées sur celles qui sont directement impliquées dans la digestion des protéines alimentaires, telles que la trypsine et la chymotrypsine, qui sont complètement caractérisées. Les protéases sont parmi les protéines les plus étudiées. C'est

grâce à la caractérisation détaillée de la structure et la fonction de plusieurs protéases qu'elles sont également utilisées comme modèles pour expliquer les bases de la fonction enzymatique. Depuis lors, d'autres protéases avec des fonctions diverses, en particulier celles relatives à la régulation des processus physiologiques ont été étudiées.

L'activité protéolytique a été impliqué dans entre autres, le traitement et la réglementation des enzymes et des hormones, réactions en cascade dans fécondation, le processus de coagulation du sang et le développement de l'embryon. Les protéases se trouvent dans toutes les formes d'organismes, quelques exemples incluent les protéases végétales : papaïne, de la papaye et bromélaïne d'ananas, la trypsine, la chymotrypsine, rénine et la pepsine des protéases digestives animales (**Rao et al., 1998**).

Les protéases bactériennes, fongiques et virales sont de plus en plus étudiées en raison de son importance dans l'application ultérieure dans l'industrie et la biotechnologie. Telle que l'application des protéases bactériennes neutres et alcalines de la souche de *Bacillus sp.*

Dans l'industrie alimentaire, spécifiquement, la de fromage. L'application commerciale de protéases microbiennes est attrayante en raison de la commodité relative de la production à grande échelle par rapport aux protéases végétales et animales. Les protéases microbiennes ont été étudiées pour leur rôle dans le développement et la manifestation de maladies comme le VIH, le cancer et les infections systémiques chroniques (**Pelmont, 1995**).

Ces enzymes sont majoritairement extracellulaires. Elles peuvent être classées en multiples groupes en fonction du résidu catalytique essentiel de leur site actif. Les groupes majeurs sont : les protéases à sérine, protéases à cystéine, protéases à aspartate et les métalloprotéases.

### 2.3. Classification des protéases

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

**Les endoprotéases (EC 3.4.21-25)**

Elles clivent les liaisons peptidiques au sein de la protéine et retirent les acides aminés séquentiellement à partir de N-terminal ou C-terminal, respectivement. Le terme protéinase est également utilisé comme un synonyme d'endopeptidase. Quatre classes d'endoprotéases sont reconnues par l'IUBMB (**International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1984**), (Tableau 3).

**Tableau 3. Classification des protéases (Rao *et al.*, 1998)**

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

**Les exoprotéases (EC3.4.11-19)**

Les exoprotéases agir uniquement à proximité des extrémités de chaînes polypeptidiques à l'extrémité C-terminal ou N-terminal. Ceux qui agissent à une extrémité libre N libèrent un seul acide aminé résiduel (Aminopeptidases), un peptide (Dipeptidyle-peptidases) ou un tripeptide (Tripeptidyle-peptidases). Les exoprotéases agissant à un carbone terminal libre libèrent un seul acide aminé (Carboxyle peptidases) ou un dipeptide (peptidyl-dipeptidases). Certaines exoprotéases sont spécifiques à des dipeptidases ou enlever les résidus terminaux

qui sont substitués, cyclisés ou liés par des liaisons isopeptidiques (**Adinarayana et al., 2004**).

Dans la nomenclature internationale officielle des enzymes, les protéases représentent la catégorie EC 3.4 ou le 3 fait référence aux hydrolases et le 4 aux peptidases. Selon la classification de référence, disponible dans la base de données électronique Merops (**Rawlings et al., 2006**), les protéases sont réparties en 6 groupes selon la structure de leur site actif et le mécanisme catalytique qui en découle (**Tableau 3**). C'est ainsi qu'on reconnaît les protéases acides ou aspartiques, les métalloprotéases, les protéases à sérine, protéases à cystéine, les protéases à thréonine et les protéases glutamiques, en plus de celles dont le mécanisme catalytique est inconnu. Les principales classes des protéases à savoir sont :

### 2.3.1. Les protéases à sérine

Les membres de ce groupe présentent un site actif déterminé par trois résidus, comprenant de la sérine, un aspartate et une histidine. Les endoprotéases à sérine (EC3.4.21) contiennent de nombreuses protéases de mammifères, comme la chymotrypsine, la trypsine, la thrombine, l'élastase pancréatique, ou encore les granzymes des cellules cytotoxiques. Celles-ci appartiennent à la famille S1, l'une des deux plus importantes parmi les protéases à sérine. La seconde est la famille S8, formée en majorité par les endoprotéases à sérine de type subtilisine (subtilisin-like) ou subtilase, et que certains auteurs considèrent comme un clan constitué de 6 familles (**Siezen et Leunissen, 1997**).

Parmi elles, les subtilisines proprement dites, produites par des bactéries du genre *Bacillus*, sont les plus anciennes à avoir été caractérisées. Certaines d'entre elles, et notamment leur représentant-type, la subtilisine Carlsberg de *Bacillus licheniformis* (EC 3.4.21.62), entrent dans la formulation des détergents industriels. Des protéases provenant de toute une série d'autres bactéries et d'organismes eucaryotes se retrouvent toutefois dans cette famille.

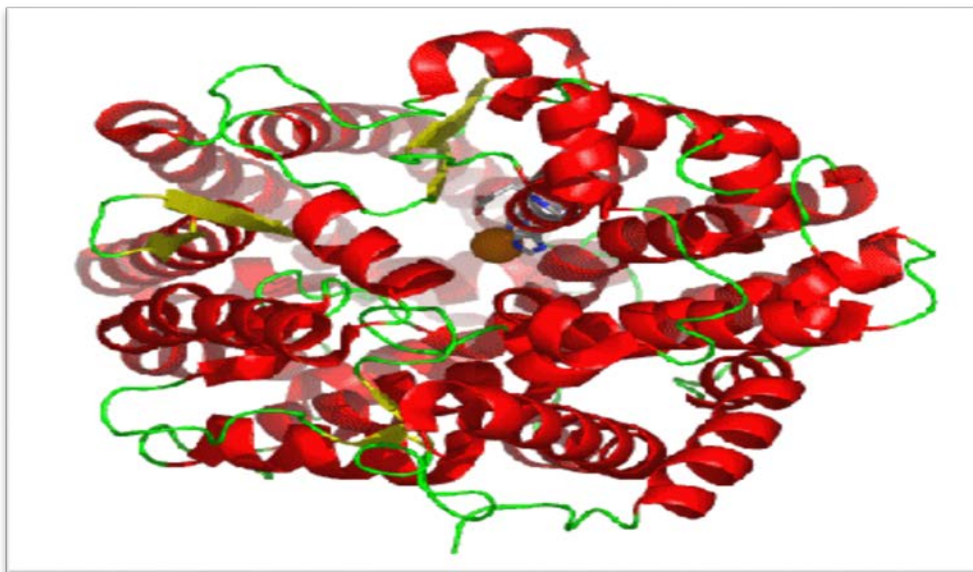
Chez les bactéries et champignons, beaucoup de subtilases sont des enzymes extracellulaires impliqués dans des fonctions de nutrition ou dans la défense vis-à-vis de facteurs d'environnement. Par exemple, la peptidase C5a des streptocoques pathogènes clive le composant C5a du complément, lui faisant perdre sa fonction de chémokine (**Cleary et al., 2004**). Des peptidases de la famille S8 produites par *Dichelobacter nodosus* interviennent

également dans la pathogénèse du piétain chez le mouton (**Kortt et Stewart, 1998**). La majorité des subtilases sont synthétisées sous forme de préproenzymes, qui sont libérés dans le milieu extérieur suite au clivage de leur peptide signal et activés par celui de leur propeptide. En général, les subtilases ne possèdent pas de ponts disulfures.

### 2.3.2. Les métalloprotéases

L'activité protéolytique de ces enzymes dépend d'un ion métallique, souvent le zinc. L'ion zinc en question est lié à deux résidus histidine, ainsi qu'à un résidu glutamate. On retrouve notamment parmi les métalloprotéases à zinc le facteur LF (lethal factor) de *Bacillus anthracis*, qui clive des enzymes de la famille des MAPK kinases (Mitogen Activated Protein Kinases), impliquées dans la transduction de nombreux signaux générés par la stimulation de récepteurs extracellulaires (**Agrawal et Pulendran, 2004**).

Les neurotoxines de *Clostridium tetani* et *Clostridium botulinum* en font elles aussi partie, et agissent sur des protéines associées aux vésicules synaptiques et impliquées dans la neurotransmission (**Hase et Finkelstein, 1993**).



**Figure 02** : Structure tridimensionnelle d'un métallo enzyme.  
(Source: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Peptidase12b.html>)



### 2.3.3. Les protéases à cystéine (E.C.3.4.22.)

Sont largement représentées tant dans le monde animal que végétale ainsi que chez les microorganismes ou elles sont impliquées dans de nombreux processus protéolytiques intra et extracellulaires. On distingue actuellement au minimum vingt six familles distinctes de protéases à cystéine (**Barret, 1987**), dont la plus grande et la plus connue est sans doute celle de la papaïne.

La triade catalytique est dans ce cas formée de trois résidus (cystéine, histidine et asparagine), le résidu cystéine constituant le groupement nucléophile. La papaïne, protéase à cystéine caractéristique, possède un site actif composé de sept acides aminés (S1-S4-S1'-S3')<sup>3</sup> dont chacun est capable d'interagir avec un acide aminé du substrat (P1-P4- et P1'-P3') situé respectivement de part et d'autre des cotés N-terminaux et C-terminaux du site de coupure. L'hydrolyse de la liaison peptidique intervient après un résidu arginine (P1) précédé de préférence d'un résidu non polaire (P2).

### 2.3.4. Les protéases acides ou aspartiques (E.C.3.4.23)

Les protéases d'acide aspartique, généralement connues sous le nom de protéases acides, sont les endopeptidases qui dépendent des résidus d'acide aspartique pour leur activité catalytique. Des protéases acides ont été groupées dans trois familles, à savoir, la pepsine (A1), le retropepsine (A2), et les enzymes des paras rétrovirus (A3) et placées dans le clan aa (**Barett, A.J. 1995**). Les membres des familles A1 et A2 sont connus pour être liés entre eux, alors que ceux de l'exposition de la famille A3 de la parenté à A1 et A2. La plupart des protéases aspartiques montrent l'activité maximale à PH faible (le PH<sub>3</sub> à 4) et ont les points isoélectriques dans la gamme du PH<sub>3</sub> à 4.5. Leurs masses moléculaires sont dans la gamme du kDa 30 à 45. Les membres de la famille de pepsine ont une structure bilobal avec la fissure d'actif-active-site située entre les lobes (**Sielecki et al., 1991**) le résidu d'acide aspartique d'actif-active-site est située dans le motif Asp-Xaa-Gly-Xaa-Gly, dans lequel Xaa peut être Serine ou thréonine. Les protéases aspartiques sont empêchées par le pepstatin (**Fitzgerald,P.M.D.et al., 1990**). Elles sont également sensibles aux composés de diazoketone tels que l'ester diazoacetyl-diazoacetyl-DL-norleucine méthylique (DAN) et le propane de 1.2 epoxy-3- (p-nitrophenoxy) (EPNP) en présence des ions de cuivre (**Suguna et al., 1987**). Les protéases acides microbiennes montrent la spécificité contre les résidus aromatiques ou encombrants d'acide aminé des deux cotés du lien de peptide, qui est semblable à la pepsine,

mais leur action est moins rigoureuse que celle de la pepsine. Des protéases aspartiques microbiennes peuvent être largement divisées en deux groupes :

- (i) pepsine-pepsin-like des enzymes produites par *Aspergillus*, *penicillium*, *rhizopus*, et *neurospora*.
- (ii) Présure-rennin-like des enzymes produites par des espèces d'*Endothia* et de *mucor*.

Les protéases peuvent être aussi classées selon la gamme du PH dans laquelle leur activité est optimal, en protéases acides neutres et alcalines (**Kumar *et al.*, 2008**).

## Sources et les applications des protéases

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

### 1. sources des protéases

#### 1.1. Protéases animales

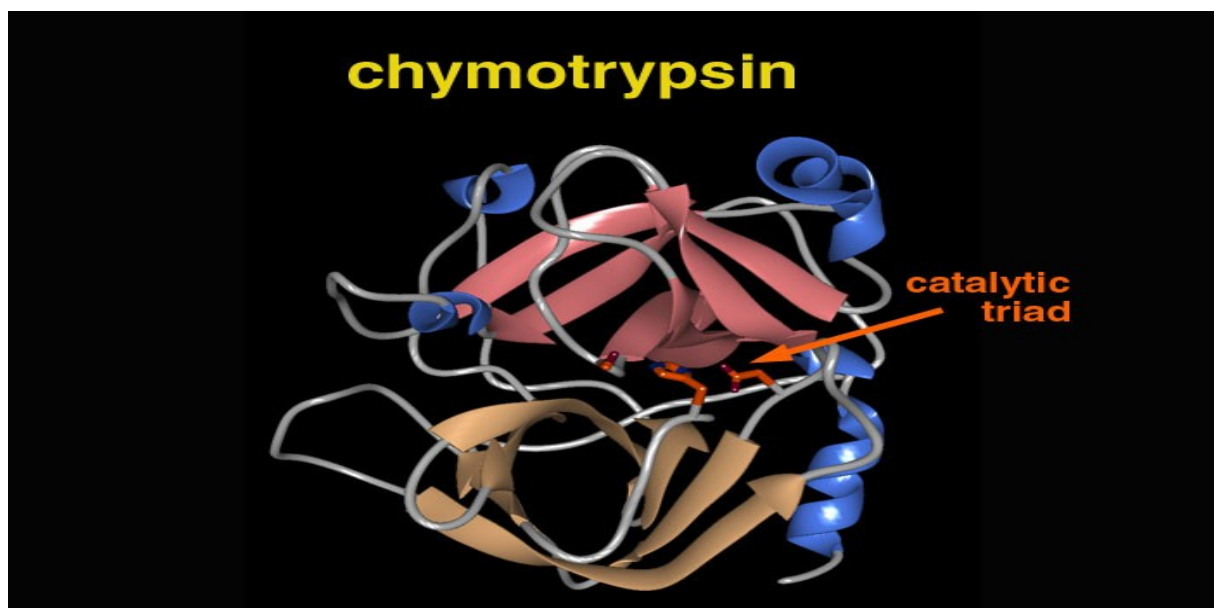
La plupart des protéases d'origine animales sont pancréatiques. En effet, elles ont la propriété de dégrader les protéines alimentaires. Elles sont toutes synthétisées sous forme d'un précurseur qui peut s'activer de façon autocatalytique dans des conditions bien déterminés (Rao *et al.*, 1998).

#### La pepsine ( $M_r$ 34,5 kDa)

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

#### La chymotrypsine ( $M_r$ 23,8 kDa)

La chymotrypsine pure est très coûteuse et elle est utilisée uniquement pour les applications de diagnostic et d'analyse (Rao *et al.*, 1998), (Figure 03).



**Figure03** : Structure de la chymotrypsine  
(Branden et Tooze ,1996).

**La rénine** (*Mr* 30,7 kDa)

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

**La trypsine** (*Mr* 23,3 kDa)

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

**1.2. Protéases végétales**

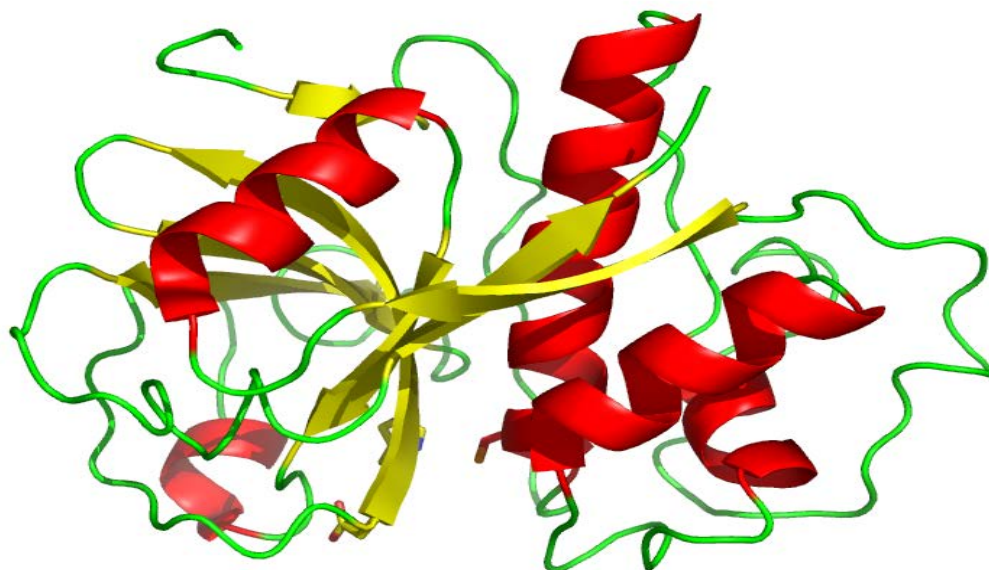
Les enzymes d'origine végétale et spécialement les protéases sont par ordre décroissante en technologie. La papaïne, la bromélaïne, la kératinases et la ficine représentent quelques-unes des protéases bien connues d'origine végétale (**Rao et al., 1998**).

**Les kératinases**

Sont produites par certains groupes botaniques des plantes pour dégrader les cheveux et la laine. Cette digestion est importante pour la production d'acides aminés essentiels tels que la lysine et pour la prévention du colmatage des systèmes de traitement des eaux usées (**Rao et al., 1998**).

**La papaïne** (25 kDa)

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



**Figure 04 :** La structure cristalline de la papaïne

(Source : <http://en.wikipedia.org/wiki/papaïne>)

### La bromelaïne

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

### La ficine

Est issue de la figue (*Ficus glabrata*) (Scriban, 1993).

## 1.3. Protéases microbiennes

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (Sandhya *et al.*, 2005b). Elles sont produites par une grande variété de bactéries dont, les actinomycètes, de moisissures et de levures (Devi *et al.*, 2008). Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial (Sandhya *et al.*, 2005b). Le grand succès des protéases microbiennes dans les systèmes biotechnologiques est attribué à la diversité biochimique très large, à la faisabilité de la culture de masse et la facilité des manipulations génétiques (Ferrero, 2000; Wu *et al.*, 2006). Quelques exemples de microorganismes producteurs de protéases sont présentés dans le tableau 04.

Une large proportion des protéases commerciales disponibles, principalement les protéases neutres et alcalines sont dérivées de bactéries, particulièrement de souches de *Bacillus* (Joo et Chang, 2005; Laxman et Al., 2005; Srinubabu et al., 2007). Leurs propriétés sont adaptées à l'usage dans industrie de détergents (Rao et al., 1998). Des protéinases à partir *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus subtilis* sont commercialement utilisées (Sinsuwan et al., 2008).

**Tableau 04 : Quelques protéases microbiennes.**

Sources	Espèces	Références
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Moisissures</li> </ul>	<i>Aspergillus Oryzae</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Bauveria felina</i> <i>Aspergillus clavatus ESI</i>	Garcia-gomez et al., 2009 Sathya et al., 2009 Laxman et al., 2005 Germano et al., 2003 Wu et al., 2006 Agrawal et al., 2005 Hajji et al., 2007
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Levures</li> </ul>	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida lypolytica</i>	Chi et al., 2007 Tobe et al., 1976
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bactéries</li> </ul>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Virgibacillus sp.SK33</i> <i>Synergistes sp.</i>	Ferrero et al., 1996 George et al., 1995 Soares et al., 2005 Fellehi et al 2016 Patel et al., 2005 Sinsuwan et al., 2008 Kumer et al., 2008a
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Actinomycètes</li> </ul>	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Nocardiosis alkaliphila sp.</i>	Mehta et al., 2006 Hozzein et al., 2004

D'autre part, une large variété de protéases sont également élaborées par les moisissures (Rao et al., 1998; Wu et al., 2006). Les enzymes d'origine fongiques sont des enzymes extracellulaires, ce qui permet une séparation du mycélium du milieu de fermentation par une simple filtration (Sandhya et al., 2005b; Devi et al., 2008). En outre, ces moisissures sont des souches GRAS et peuvent se développer sur des substrats moins chers (Devi et al., 2008).

### 1.3.1. Protéases bactériennes

La plupart des protéases commerciales, principalement neutres et alcalines, sont produites par des organisations appartenant au genre bacille. Les protéases neutres bactériennes sont en activité dans une gamme étroite de pH et ont une thermo tolérance relativement basse.

En raison de leur taux intermédiaire de réaction, les protéases neutres produisent de moins d'amertume en protéines hydrolysées de nourriture que font les protéinases animales et par conséquent sont valeur pour l'usage dans l'industrie alimentaire. Neutrase, est une protéase neutre, peu sensible aux inhibiteurs normaux de protéinase d'usine et est donc utile dans le secteur de la brasserie. Les protéases neutres bactériennes sont caractérisées par leur affinité élevée pour des paires hydrophobes d'acide aminé. Leur basse thermo tolérance est avantageux pour commander leur réactivité pendant la production des hydrolysats de nourriture avec un bas degré d'hydrolyse. Certaines des protéases neutres appartiennent au type de metalloprotéase et exigent les ions bivalents en métal pour leur activité, alors que d'autres sont des protéinases de sérine, qui ne sont pas affectées par les agents de chélation. (Mala *et al.*, 1998). Des protéases alcalines bactériennes sont caractérisées par leur forte activité à pH alcalin, par exemple, pH 10, et leur large spécificité de substrat. Leur température optimale est autour de 60°C Ceux-ci les propriétés des protéases alcalines bactériennes les rendent appropriées pour l'usage dans l'industrie détergente. (Mala *et al.*, 1998).

### 1.3.2. Protéases mycètes

Les mycètes élaborent une plus grande variété d'enzyme que font les bactéries. Par exemple, l'*oryzae d'aspergille* produit l'acide, le neutre, et les protéases alcalines. Les protéases fongique sont en activité sur un grand choix de pH et montrent la large spécificité de substrat. Cependant, elles ont un taux inférieur de réaction et une plus mauvaise tolérance de chaleur que font les enzymes bactériennes. Des enzymes fongiques peuvent être commodément produites dans un procédé de fermentation à semi-conducteur. Les protéases acides fongiques ont un pH optimal entre 4 et 4,5 et sont stables entre pH 2,5 et 6,0. Elles sont particulièrement utiles dans l'industrie de fabrication du fromage due à leurs spécificités étroites de pH et de température. Les protéases neutres fongiques sont des metalloprotéases qui sont en activité à pH 7,0 et sont empêchés par les agents de chélation. En raison de l'activité d'accompagnement de peptidase et de leur fonction spécifique en hydrolysant les

liens hydrophobes d'acide aminé, les protéases neutres fongiques complètent l'action de la plante, de l'animal, et des protéases bactériennes en réduisant l'amertume des hydrolysats de protéine de nourriture. Des protéases alcalines fongiques sont également employées dans la modification de protéine de nourriture. (Mala *et al.*, 1998).

### 1.3.3. Protéases virales

Protéases virales ont gagné l'importance due à leur participation fonctionnelle dans le traitement des protéines des virus qui causent certaines maladies mortelles telles que les SIDA et le cancer. Des peptidases de sérine, aspartiques, et de cystéine sont trouvées dans divers virus. Toutes les peptidases virus-virus-encodé sont des endopeptidases, il n'y a aucun metallopeptidases. Les protéases d'aspartyl de Rétroviral qui sont exigées pour l'assemblée et la réplique virales sont des homodimers et sont exprimées comme partie du précurseur de poly protéine. La protéase mûre est libérée par l'autolyse du précurseur. Une littérature étendue est disponible sur l'expression, la purification, et l'analyse enzymatique de la protéase aspartique rétroviral et de ses mutants. La recherche étendue s'est concentrée sur la structure tridimensionnelle des protéases virales et de leur interaction avec les inhibiteurs synthétiques en vue de concevoir les inhibiteurs efficaces qui peuvent combattre implacablement la propagation et épidémie de dévaster du SIDA. . (Mala *et al.*, 1998).

Ainsi, bien que les protéases soient répandues en nature, les microbes servent de source préférable de ces enzymes en raison de leur croissance rapide, de l'espace limité exigé pour leur culture, et de la facilité avec laquelle ils peuvent être génétiquement manœuvrés pour produire de nouvelles enzymes avec les propriétés changées qui sont souhaitables pour leurs diverses applications. (Mala *et al.*, 1998).

## 2. Les Applications des protéases

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. (Le **Tableau 05**) présente quelques exemples de protéases produites commercialement. Les principaux secteurs industriels employant des protéases sont :



**Tableau 05** : Exemples de protéases commerciales.

Nom Commercial	Firmes Productrices	Souches microbiennes	Références
Kojizyme™ Flavourzyme™	Novozymes, Denmark Novozymes, Denmark	<i>A. oryzae</i> <i>A. oryzae</i>	Sumantha et al. (2006)
Alcalase® Savinase® Esperase®	Novozymes, Denmark Novozymes, Denmark Novozymes, Denmark	<i>B. licheniformis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. licheniformis</i>	Kumar et al. (2008b)
Chymosine recombinante Purafect® Maxatase BLAPS Bioprase	Genencor International, USA Genencor International, USA Gist-Brocades, Hollande Henkel, Allemand Nagase Biochemicals, Japon	<i>A. niger</i> , <i>A. awamori</i> <i>B. lentus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. lentus</i> <i>B. subtilis</i>	Rao et al. (1998) Kumar et al. (2008b) Rao et al. (1998) Kumar et al. (2008b)
Dispase Aspergillo-pepsin I	Invitrogen Corp, USA ; BD Biosciences, USA ; etc. Kikkoman Corp, Japon	<i>B. polymyxa</i> <i>A. saitoi</i>	Sumantha et al. (2006)

## 2.1. Industrie alimentaire

Mis à part le cas de la protéase alcaline dans les détergents, les industries alimentaires constituent aujourd'hui encore le principal domaine d'application des technologies enzymatiques, qui à partir d'un nombre limité de types de réactions catalysées donnent lieu à une grande diversité d'application (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Les principales industries alimentaires utilisant les protéases sont :

### i Boulangeries

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

## ii. Fromageries

L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages (**Rao et al., 1998**). La présure a été l'enzyme utilisée à cette fin depuis longtemps. Cependant, les fluctuations du prix de caillette et leur pénurie épisodique fait qu'elle est de moins en moins utilisée et tend à être remplacée par des protéases microbiennes (**Avion-Violet et al., 1982**). Les protéases utilisées à cette fin sont produites par des microorganismes GRAS tels que *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* et *Endothia parasitica*. Les protéases fongiques acides, alcalines et neutres produites par *A. oryzae* ont également été utilisées en industrie laitière (**Aguilar et al., 2008**).

## iii. Synthèse de l'aspartam

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

## iiii. Préparation de produits à base de soja

Des protéases neutres et alcalines sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce soja ainsi que d'autres produits à base de soja.

Les modifications des protéines du soja par les protéases aident à augmenter leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, le traitement de ces protéines par la protéase alcaline 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 (**Rao et al., 1998**).

## 2.2. Domaine pharmaceutique et médical

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

## 2.3. Détergents

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

## 2.4. Tanneries

Les protéases sont utilisées en tannerie depuis le début du siècle dernier pour leurs capacités à libérer les poils et la laine (Laxman *et al.*, 2005). Les trois traitements de la peau à tanner (le reverdissage, le délainage et le confitage) sont susceptibles de solutions enzymatiques de protéases produites par *B. licheniformis*, *A. oryzae*, *B. amyloliquefasciens*. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002).

### 2.5 Autres applications

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines (**Dalev, 1994; Ichida *et al.*, 2001**). La protéase neutre de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (**Aviron-Violet *et al.*, 1982**). Une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir les films photographiques par hydrolyse de la gélatine (**Sumantha *et al.*, 2006**).

## 1. Matériels

Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, (Algérie).

### 1.1. Matériel biologique :

Les plumes de poulet ont été rapportées de l'abattoir de Ouled Boughalem

### 1.2. Milieux de culture

Les milieux utilisés au cours de ce travail (GN et LEA, **annexe 03**) étaient soit des milieux liquides, soit des milieux solides (1% agar p/v). La stérilisation des milieux est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 min à l'exception de la solution du lait qui est stérilisée séparément pendant 10 min pour éviter la caramélisation. La composition et le mode de préparation des milieux qui ont servi à notre étude sont rapportés en détail dans l'annexe.

## 2. Méthodes

### 2.1. Isolement de bactéries productrices de protéase :

En premier temps une plume de 38 mg a été placée dans un tube qui contenait 10 ml de milieu liquide bouillon nutritive (BN) (**voir annexe 03**) et incubé à 37°C pendant 30 min. Après agitation sur le vortex pour libérer les microorganismes retenus dans la plume on prend 1ml de BN et le met dans un tube contenant 9 ml de l'eau physiologique, 1 ml a été étalé sur le milieu LEA solide et incubées à 37° C durant 7jours. (**Wigler, 1977**).

Ensuite, les colonies bactériennes obtenues à partir de la suspension précédente sont repiquées séparément sur le milieu solide au lait écrémé (LEA) à l'aide des cures –dent stériles pour tester leur activité protéolytique (**Wigler, 1977**). Le milieu solide au lait écrémé est un milieu sélectif utilisé communément pour l'isolement des bactéries productrices de protéase extracellulaire. La formation d'une zone claire autour des colonies est le résultat de l'hydrolyse du substrat protéique : la caséine (du lait) incorporée dans le milieu, est considérée comme une preuve de l'activité protéolytique. Le pouvoir caséinolytique ou protéolytique est défini par le rapport entre le diamètre (x) mesuré en mm de la zone de lyse 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.

### 2.2. Dénombrement des bactéries :

Le dénombrement des cellules bactériennes dans une suspension est réalisé par des dilutions décimale de chaque échantillon jusqu'à  $10^{-5}$ . Puis en prend 0,5 ml de chaque dilution est l'ensemencée sur un milieu sélectif LEA. Et incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures. Le comptage des colonies formées dans chaque boite a été effectué.

### 2.3. Purification et conservation des isolats protéolytiques

La purification des colonies bactériennes retenues comme protéolytiques (celles qui dégradent la protéine) est effectuée par ensemencement en stries sur le milieu solide LEA. L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une colonie pure de chaque isolat.

Pour la conservation de courte durée les souches protéolytiques ainsi purifiées sont conservées sur milieu GN solide inclinée en tubes à essai, après incubation à 37°C pendant 24h au réfrigérateur à 4°C, pour quelques semaines (**Font de Valdez, 2002**). Pour la conservation de longue durée, les souches sont mise en culture dans le milieu LB liquide. la suspension cellulaire est mélangée avec du glycérol stérile à une concentration finale de 15% elle est répartie dans des tubes Eppendorfs puis conservée à -20°C.

### 2.4. Capacité des isolats protéolytiques d'hydrolyser d'autres substrats protéiques

Les isolats bactériens protéolytiques issus du premier screening ont ensuite été testé pour pouvoir dégrader un autre substrat de nature protéinique. Le milieu utilisé était un milieu de la même composition que LEA à l'exception du lait qui est substitué par la gélatine. Tous les isolats protéolytiques ont été ensemencés sur le milieu solide à la gélatine par des cure-dents stériles et incubés à 37°C. Les colonies gélatinase-positives ont été entourées par une auréole transparente de lyse, résultant de l'hydrolyse du substrat protéique : la gélatine incorporée dans le milieu.

### 2.5. L'identification de souches purifiées

L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques (**Lamouliatte *et al.*, 1992**). Sur chacune des boites servant aux dénombrements, nous avons classé les colonies en plusieurs catégories selon leur aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, une colonie a été choisie aléatoirement pour réaliser les premiers tests

d'orientation. Chaque colonie sélectionnée est purifiée sur milieu gélosé nutritive. Pour une identification préliminaire de ces bactéries, nous sommes basés sur des études :

Morphologique (les formes caractéristiques des colonies, leurs arrangement, la présence ou non de spores et leur coloration de Gram, coloration des spores).

Etude biochimiques (test de mobilité, test de catalase, test de type respiratoire et recherche d'amylase .....

### **2.5.1. Le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**

En 1923, David Bergey, professeur de Bactériologie à l'université de Pennsylvanie, a publié une classification des bactéries qui pouvait être utilisée pour l'identification des espèces bactériennes, le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, qui en est actuellement à sa 9<sup>ème</sup> édition ([http://www. Bergeys. Org /](http://www.Bergeys.Org/)). Puis est apparu un ouvrage beaucoup plus détaillé contenant les descriptions de toutes les espèces bactériennes identifiées, le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ce livre de référence des taxonomistes bactériens reposait jusqu'à récemment sur la classification phénotypique des bactéries c'est-à-dire sur leur caractères apparents et ne fournissait aucun détail sur l'évolution naturelle des bactéries les unes par rapport aux autres.

Ce manuel, divisé en quatre volumes et 33 sections, regroupait des bactéries ayant en commun quelques caractères facilement déterminables (forme, morphologie, coloration de Gram présence d'endospores, mobilité,...). Les réponses à la coloration de Gram jouaient un rôle important dans cette classification principalement les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

### **2.5.2. Caractérisation phénotypique**

#### **La morphologie des colonies et des cellules**

L'étude macroscopique permet de déterminer la morphologie des colonies obtenues sur des milieux de cultures (taille, la forme des colonies,.....). L'observation microscopique est nécessaire pour définir la forme des cellules bactériennes (coques ou bacilles). La coloration de Gram des isolats après 24 heures de culture sur GN permet de déceler les formes morphologiques de différentes cellules bactériennes. (**carr et al., 2002**).

### Coloration de Gram

Les réponses à la coloration de Gram jouent un rôle primordial dans la classification qui distingue les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif. Une colonie isolée, prélevée sur milieu solide après 24h de culture à 37°C, est étalée dans une gouttelette d'eau sur la lame de verre à l'aide d'une anse bactérienne stérilisée à la flamme du bec. Après séchage de la lame à l'air, le frottis est fixé par la flamme du bec bunsen sur le dos de la lame en verre. Après refroidissement, les micro-organismes sont colorés en violet de gentiane pendant 1 min. après lavage à l'eau, le frottis est mis en contact pendant 1 min avec la solution de lugol. L'iode libéré va fixer le colorant précédent. Le frottis est mis en contact pendant 1 min avec safranine qui agit comme colorant de contraste : les bactéries ayant une réaction négative à la coloration de Gram apparaissent roses, les bactéries ayant une réaction positive à la coloration de Gram qui n'ont pas été décolorées restent violettes. Le frottis est lavé à l'eau distillée et séché soigneusement. L'observation du frottis est réalisée en microscopie optique (objectif à immersion x100).

#### 2.5.3. Coloration des spores par le vert de malachite

La spore bactérienne est organe facultatif. On la rencontre seulement chez certaines espèces bactériennes (généralement Gram positif : *Bacillus*). Elle représente une forme de résistance de la bactérie aux conditions défavorables de vie (chaleur, dessiccation). La spore bactérienne apparaît réfringente à l'état frais et ne passe pas par les méthodes classiques. Pour mieux la mettre en évidence, on peut la colorer par la méthode au vert de malachite. (**Delarras, 2007**). Cette coloration est effectuée uniquement pour l'isolat à forme bacille et a été positive pour la coloration de Gram.

Après avoir réalisé un frottis bactérien comme précédemment, il est traité avec une solution aqueuse de vert de malachite 5 % et chauffé pendant 10 minutes. Après le lavage à l'eau du frottis, la solution aqueuse de fuchsine basique à 5% est ajoutée et laissée pendant 1 minute. Le frottis est lavé à l'eau distillée et séché soigneusement (**Dorner, 1926**). L'observation du frottis est réalisée en microscopie optique (objectif à immersion x 100). Les spores apparaissent vertes dans des corps bactériens roses. La position dans la cellule, la déformation du bacille et la forme de la spore sont des renseignements taxonomiques intéressants et importants.



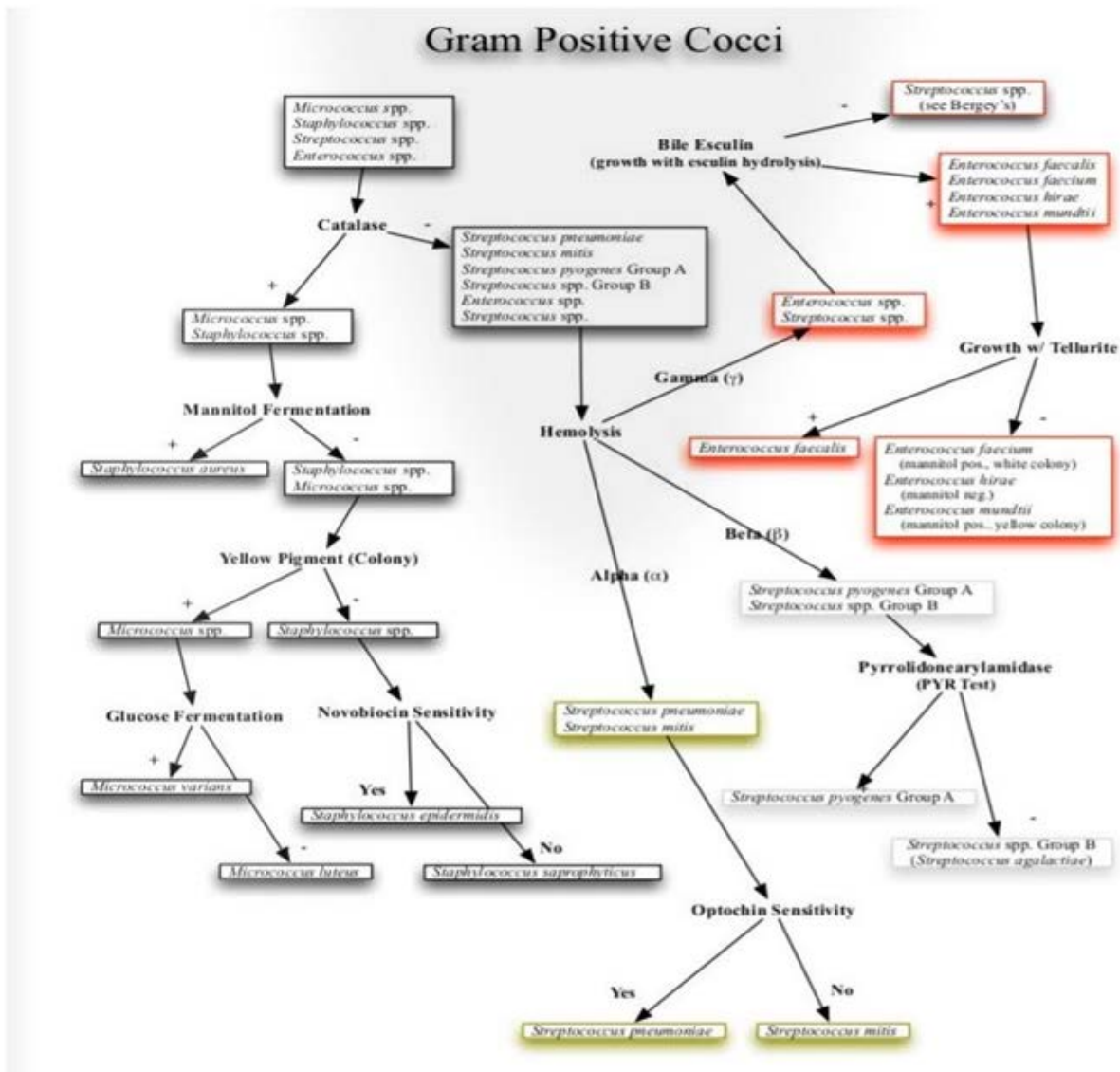


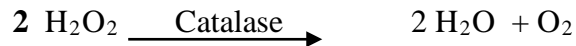
Figure05. Diagramme d'identification des coques à Gram positif



### 2.5.4. Etude biochimiques (les tests d'orientation)

#### Test de catalase

La catalase est une enzyme respiratoire capable de dégrader l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et O<sub>2</sub> selon la réaction suivante :



Sur une lame et à l'aide d'une pipette pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (à 10 volumes). La présence d'une catalase est révélée par l'apparition immédiate de bulle de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (**Tortora et al., 2003**).

#### Test de Mannitol mobilité

La fermentation des sucres est effectuée dans un milieu liquide (oxydation – fermentation : O-F). La croissance des isolats et le virage de l'indicateur coloré traduit la fermentation du sucre. L'acidification du milieu fait changer l'indicateur, le bleu de bromothymol, qui passe du vert au jaune. Après l'ensemencement des tubes O-F + glucose et O-F + mannitol par les isolats S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>, (**Marchal et Bourdon, 1982**). L'incubation de ces tubes était à 37°C et le développement d'une couleur jaune été observée.

#### Recherche de l'amylase

Ce test a été réalisé en cultivant la souche sur une gélose nutritive contenant 1% d'amidon (**voir annexe 03**). Après avoir obtenue une bonne culture bactérienne, la gélose a été recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie, par contre un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (**De Vos et al., 2009**).

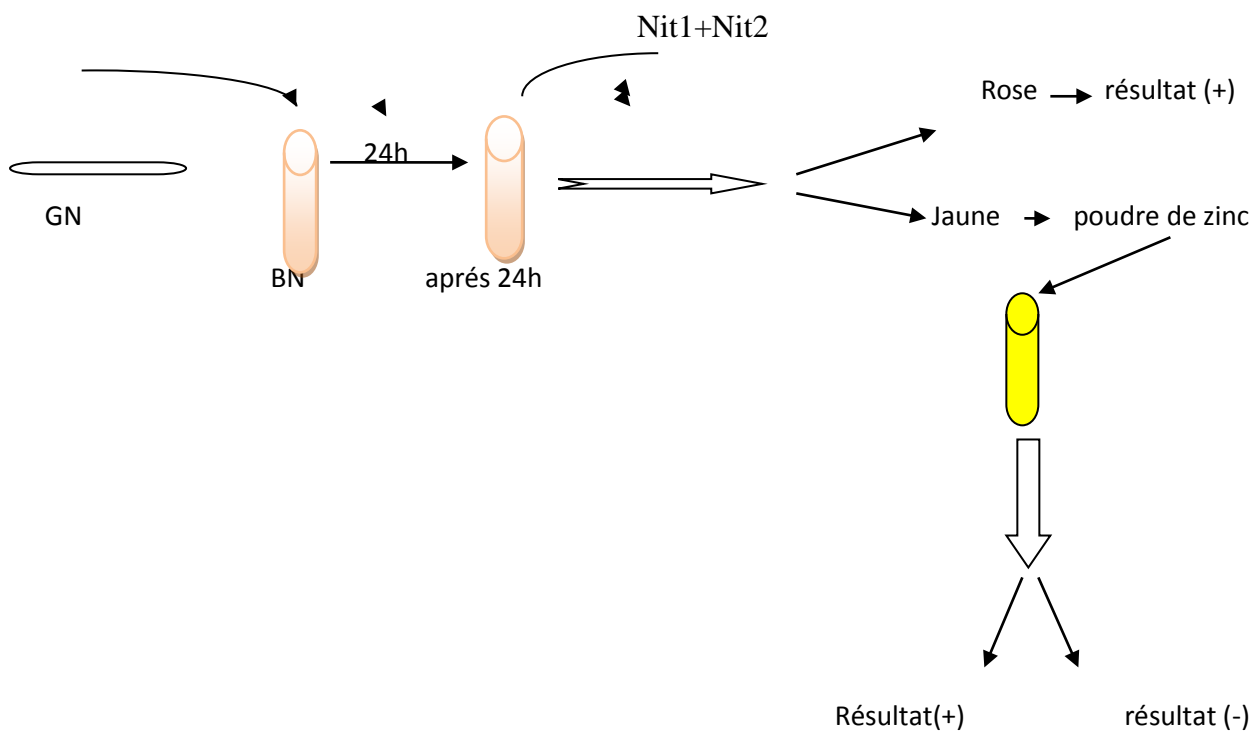
#### Test de nitrate réductase

L'étude de la réduction des nitrates se fait par la mise en évidence des nitrates formés en milieu acétique ou sulfurique, qui donnent une coloration rose. Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade d'azote (N<sub>2</sub>).

Quatre gouttes des réactifs 'nit1' puis 'nit 2' sont ajoutés à une culture de 24 à 48 h d'incubation à 37°C en bouillon nitraté. Après agitation, la lecture est immédiate. Plusieurs cas de figures peuvent se présenter :

- Lorsque la coloration est jaune ou rouge ; les nitrates sont réduites, on parle de nitrate réductase positive (NR+).
  - Lorsque le milieu reste incolore, la poudre de zinc est ajoutée (réducteurs des nitrates), après cinq minutes les tubes sont de nouveau observés :
    - Si le milieu devient rose, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie : nitrate réductase négative (NR-)
    - Si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduits au delà du stade nitrates : nitrate réductase positive (NR+)
- (Tortora *et al.*, 2003).

Ce test se fait selon le protocole suivant :



### Croissance à 6,5% NaCl

Le milieu BN à une concentration de NaCl de 6,5% (**voir annexe 03**) est inoculé par les quatre souches, ensuite incubé à 37°C pendant 24 heures. Suite à l'incubation, la présence d'une croissance bactérienne indique une tolérance aux sels et l'absence de croissance la indique une sensibilité aux sels.

### Production d'Acétoïne (Réaction de Voges-Proskauer, VP)

Elle permet la mise en évidence de l'acétyl méthyl carbinol (AMC) ou de l'acétoïne. Le test Voges-Proskauer (VP) est utilisé pour déterminer si un organisme produit de

l'acétylméthylcarbinol à partir de la fermentation du glucose. Si présent, l'acétylméthylcarbinol est converti en diacétyl en présence d' $\alpha$ -naphthol, d'un alcali fort (40% de KOH) et de l'oxygène atmosphérique. L' $\alpha$ - $\beta$ -naphthol ne faisait pas partie de la procédure initiale, mais il a été considéré comme un intensificateur de couleur par Barritt et doit d'abord être ajouté. Les composés contenant du diacétyl et de la guanidine trouvés dans les peptones du bouillon se condensent alors pour former un polymère rouge rosâtre.

Après 48 heures d'incubation du milieu (Clark et Lubs ) (**voir annexe 03**) placé dans un tube à hémolyse préalablement ensemencé par les isolats S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> de 0,5 ml de réactif à l' $\alpha$  naphthol (**voir annexe 02**) et de 1 ml de soude à 16% sont additionnés. Après agitation et un délai 10 minutes, une coloration rose traduit la formation de l'acétylméthylacrbinol. Cette substance se transforme en acétoïne sous l'action de la soude et se combine avec l' $\alpha$  naphthol en donnant un complexe de couleur rouge.

### Recherche de gélatinase

Ce test à été réalisé par l'ensemencement de la souche sur le milieu a base de gélatine (**voir annexe 03**). Après avoir obtenue une bonne culture bactérienne (24 à 72 heures d'incubation à 37°C), la gélatine a été recouverte d'une solution de test gélatine qui contient le chlorure mercurique, HCl concentré et H<sub>2</sub>O, est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie. (**De Vos et al., 2009**).

### Recherche de lécithinase

Ce test a été réalisé par l'ensemencement des souches un sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (**voir annexe 03**). Après 24 à 72 heures d'incubation à 37°C, l'apparition de zone claire autour de la culture prouve que la souche possède la lécithinase (**De Vos et al.,2009**)

### Recherche De Citrate

Ce test a été réalisé par l'ensemencement des souches dans un milieu en tubes inclinés (**voir annexe 03**). Après 24 à 72 heures d'incubation à 37°C, Cette réaction est indiquée par le changement de couleur de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol qui devient bleu.

### Gélose Chapman

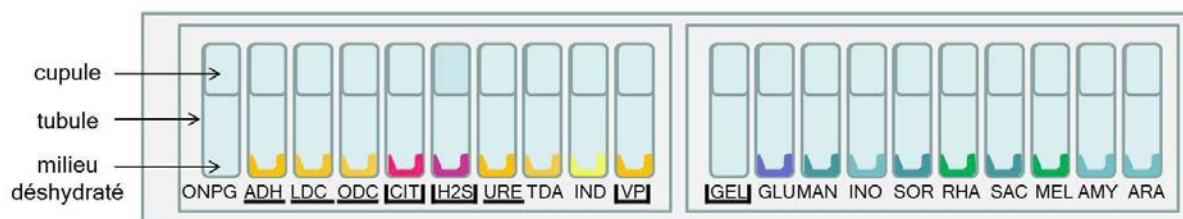
Est le milieu sélectif des bactéries halophiles et plus particulièrement fermentant le mannitol. C'est un milieu semi-synthétique. Il est utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus*. On cultive sur ce milieu les Micrococcaceae et quelques autres (*Bacillus*, *Enterococcus*) et même très rarement des bacilles Gram négatifs.

- Pas de virage (le milieu reste rouge) : les colonies sont mannitol négative car elles ne fermentent pas le mannitol, légère alcalinisation du milieu par l'utilisation de peptones dans leur métabolisme énergétique.
- Virage au jaune du milieu : les colonies sont mannitol positive car elles fermentent le mannitol avec acidification du milieu.

La gélose Chapman est une gélose sélective des *Staphylococcus*. Dans tous les cas, les micro-organismes cultivés sur ce milieu ont mis en évidence leur caractère halophile.

### Test d'arabinose (utilisation des galeries biochimique API 20 E)

La galerie API 20 E (BioMérieux) est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autre bacilles ; elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, et permet aussi la réalisation de tests en anaérobiose (ajout de paraffine). L'utilisation de galeries miniaturisées prêtes à l'emploi ont permis l'identification de bacilles à Gram positif non fermentaires (API 20 NE et API 20 E, bio Mérieux sa).



**Figure 07:** galeries API 20 E témoin

### **2.6. Détermination des conditions optimales de croissance des isolats sélectionnés**

La température optimale de croissance ainsi que le pH optimal sont déterminés pour chacune des souches protéolytiques prometteuses (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>). Les différentes températures étudiées étaient 30, 45 et 55°C. En ce qui concerne le pH, les valeurs étudiées étaient 5, 7 et 9. Pour les cultures de différents pH la température d'incubation est fixée à 37°C et pour les cultures de différentes températures le pH est ajusté à 7. Le milieu utilisé était le milieu liquide LB. Les tubes de cultures de LBensemencés par les quatre souches bactériennes ont été incubé pendant 24 heures sous agitation de 160 tours/ minute.

Pour chaque culture, le pH et la température optimale de la croissance des quartes bactéries protéolytiques ont été déterminés par la mesure des taux de turbidité par spectrophotométrie à une longueur d'onde 420 nm.

## Résultats et discussion

### 1. L'isolement des bactéries productrices de protéases

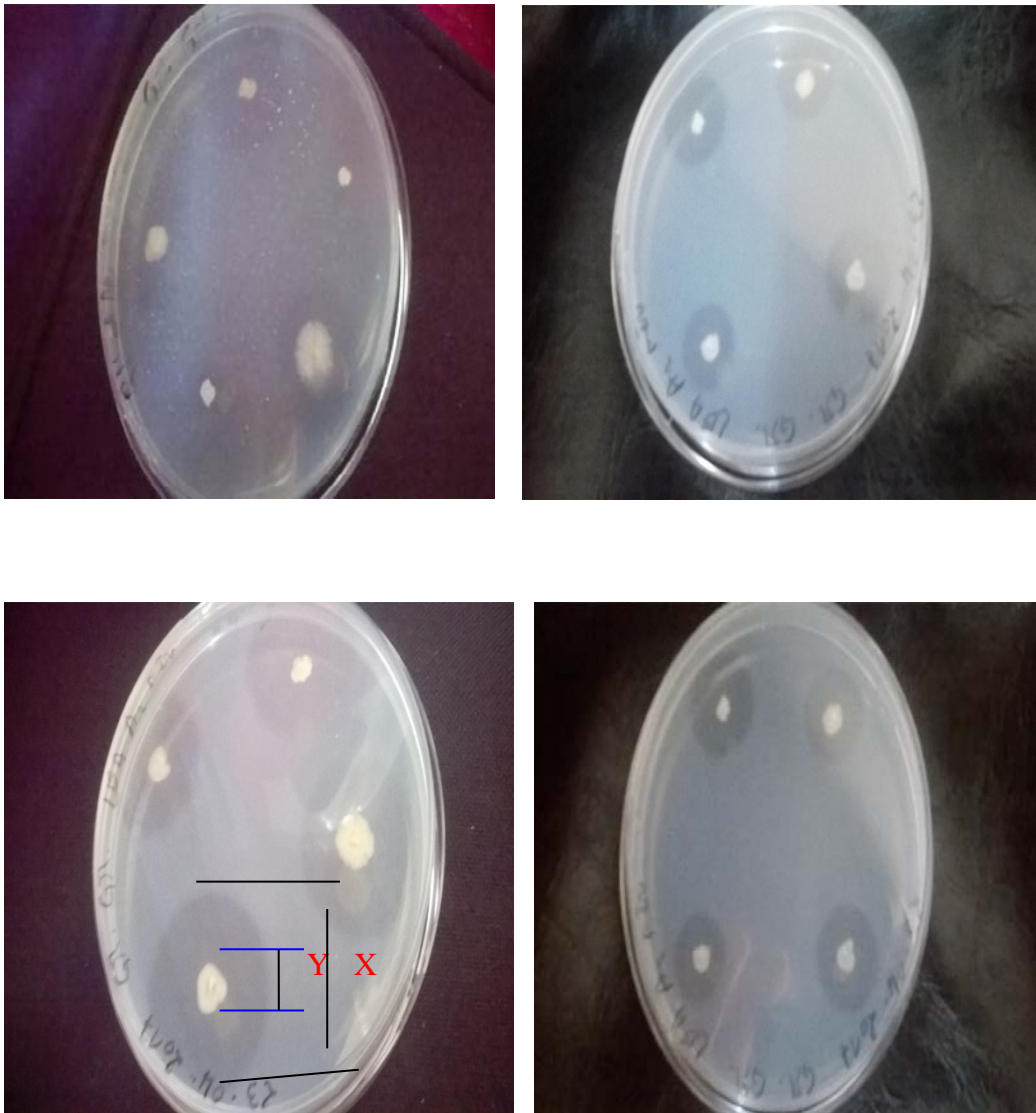
Les résultats expérimentaux de la dégradation de la caséine par les isolats obtenus à partir de plumes de poulet sont représentés dans le tableau 6. On peut voir que neuf isolats bactériens isolés de plumes de poulet ont montré une activité protéolytique (caséinolytique) sur le milieu LEA (1%). Les isolats bactériens S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> présentent une activité protéolytique forte, avec un potentiel de lyse de 3,80, 5,2, 3,28, et 3,66 respectivement. Les autres isolats ont une activité caséinolytique réduite.

A partir de ces résultats, les quatre isolats bactériens les plus performants, S<sub>1</sub> (A2), S<sub>2</sub> (C1), S<sub>3</sub> (C2), S<sub>4</sub> (C3) isolés de plumes de poulet, sont sélectionnés et retenus pour leur identification, (figure 08).

**Tableau 06 : Screening primaires des isolats bactériens producteur de protéase extracellulaire par la méthode de repiquage sur un milieu solide LAE après 48h.**

Source et région d'isolement	Code d'isolats	Diamètre de zone de lyse (mm)X	Diamètre la colonie (mm)Y	Rapport X /Y
<b>Plumes de poulet (Mostaganem)</b>	A1	16	05	3,20
	A2(S1)	19	05	<b>3,80</b>
	A3	14	05	2,80
	B1	17	07	2,42
	B2	09	03	3,00
	B3	08	04	2,00
	C1(S2)	26	05	<b>5,20</b>
	C2(S3)	23	07	<b>3,28</b>
	C3(S4)	22	06	<b>3,66</b>





**Figure 08 : l'activité protéolytique (caséinolytique) des isolats sur le milieu sélectif LEA. X, étant le diamètre de la zone de lyse et Y étant le diamètre de la colonie.**

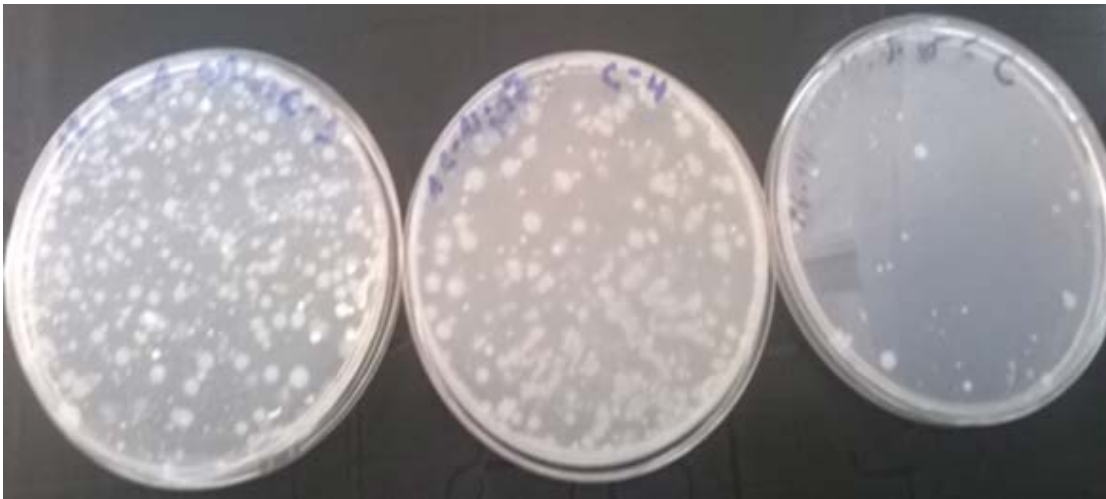
## Résultats et discussion

### 2. Dénombrement (concentration des cellules bactérienne)

38 mg de plume de poulet ont été placés dans un tube contenant 10 ml de milieu liquide. Après une agitation vigoureuse en utilisant un vortex, le tube a été incubé pendant 24 heures à 37 ° C. Une dilution en série (jusqu'à  $10^{-5}$ ) a été effectuée sur la culture bactérienne résultante. 0,5 ml de la dernière dilution était étalé sur la surface d'un milieu gélosé, et les boîtes sont ensuite incubées pendant une durée de 24h à 37°C.

On a pu compter **52** colonies visibles sur la boîte de la dilution  $10^{-5}$ . On peut donc calculer la concentration des cellules bactériennes dans la suspension mère :

$$52 \times 10^5 \times 2 = 10,4 \times 10^6 \text{ UFC/ml.}$$



**Figure 09 : dénombrement de souche avec dilution  $10^{-5}$  sur le milieu sélectif LEA.**

## Résultats et discussion

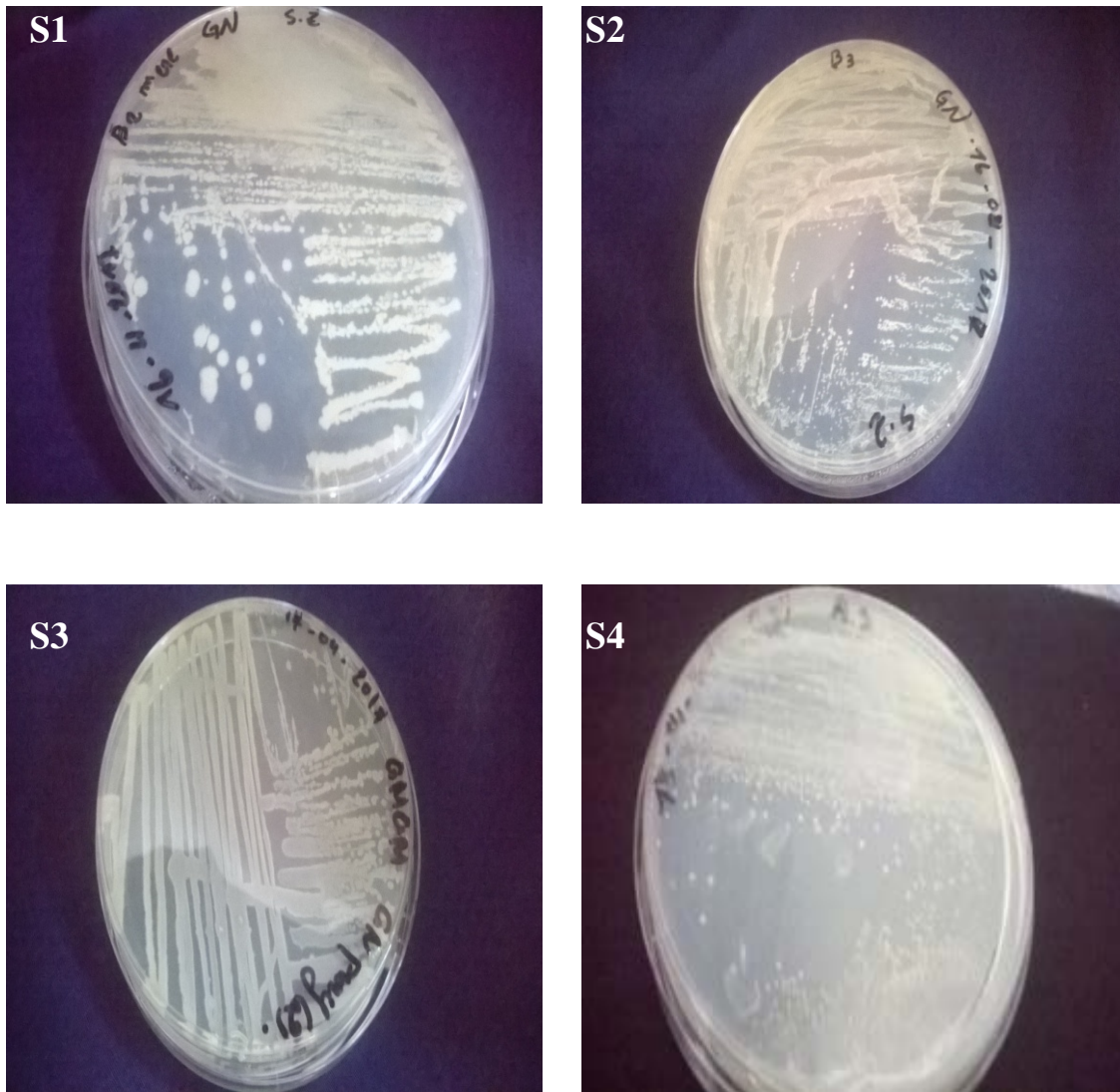
### 3. Identification des quatre isolats protéolytiques prometteurs

#### 3.1. Examen macroscopique

L'étude macroscopique des isolats protéolytiques, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> inclut les différents caractères d'une colonie bactérienne tel que le diamètre, la couleur, la forme.... Les résultats sont regroupés dans le tableau 7 et illustré dans la figure 10.

**Tableau 07** : l'étude macroscopique des quatre isolats, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>.

Souches	S1	S2	S3	S4
<b>Caractéristiques</b>				
<b>Diamètre</b>	6 mm	2 mm	2 mm	1 mm
<b>Couleur</b>	Gris	doré	Piège crème	
<b>Forme</b>	Point centrale	grappes de raisin	Circulaire	Circulaire (En chaînettes)
<b>Elévation</b>	Plane	Convexe	Plane	Bombé
<b>Contour</b>	ondulé	En amas	Ondulé	Régulier
<b>Opacité</b>	Opaques	Opaques	Opaques	
<b>Surface</b>	réguise	Lisse brillante	Brillante réguise	
<b>Consistance</b>		Muqueuses	Muqueuses	Muqueuses

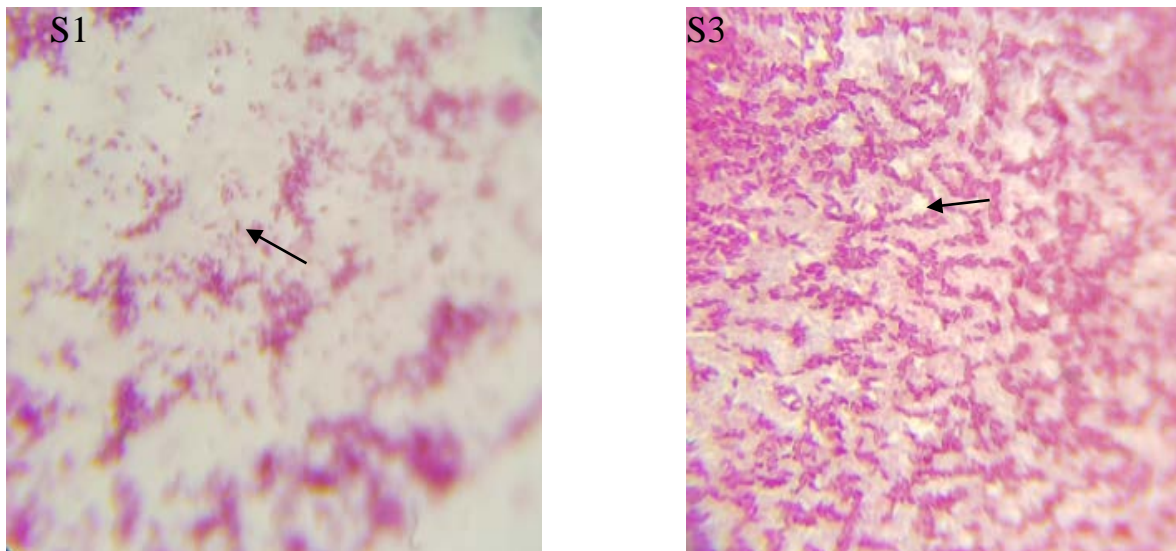


**Figure 10 : Morphologie des colonies des isolats S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> sur le milieu GN.**

### 3.2. Examens microscopiques

Les observations microscopiques ont été réalisées suivant les étapes : observation coloration de Gram et coloration des spores (**figure 11**), les résultats sont rassemblés dans le Tableau 08.

#### L'identification des isolats S1, S2, S3, et S4



**Figure 11: les endospores de l'isolat S<sub>1</sub> et S<sub>3</sub> sous le microscope photonique (100X). Les flèches indiquent la position des spores.**

➤ Les endospores de l'isolats bactériens S<sub>1</sub> et S<sub>3</sub> :

**On observe par le microscope photonique que :**

**S<sub>1</sub> :** sont des petites bâtonnets à spores centrales déformantes.

**S<sub>3</sub> :** sont des bâtonnets court abordé carré à spore centrale non déformantes. Ces résultats permettent de rapproché les deux isolats au genre *Bacillus*. Les résultats de l'étude microscopique sont résumés dans le tableau 08.

## Résultats et discussion

**Tableau 08 : Résultats de l'étude microscopique des souches isolées.**

Code d'isolats	Présence de spores	Forme des cellules	Gram
<b>S1</b>	(+)	<b>Bacille</b>	(+)
<b>S2</b>	(-)	<b>Coques</b>	(+)
<b>S3</b>	(+)	<b>Bacille</b>	(+)
<b>S4</b>	(-)	<b>Coques</b>	(+)

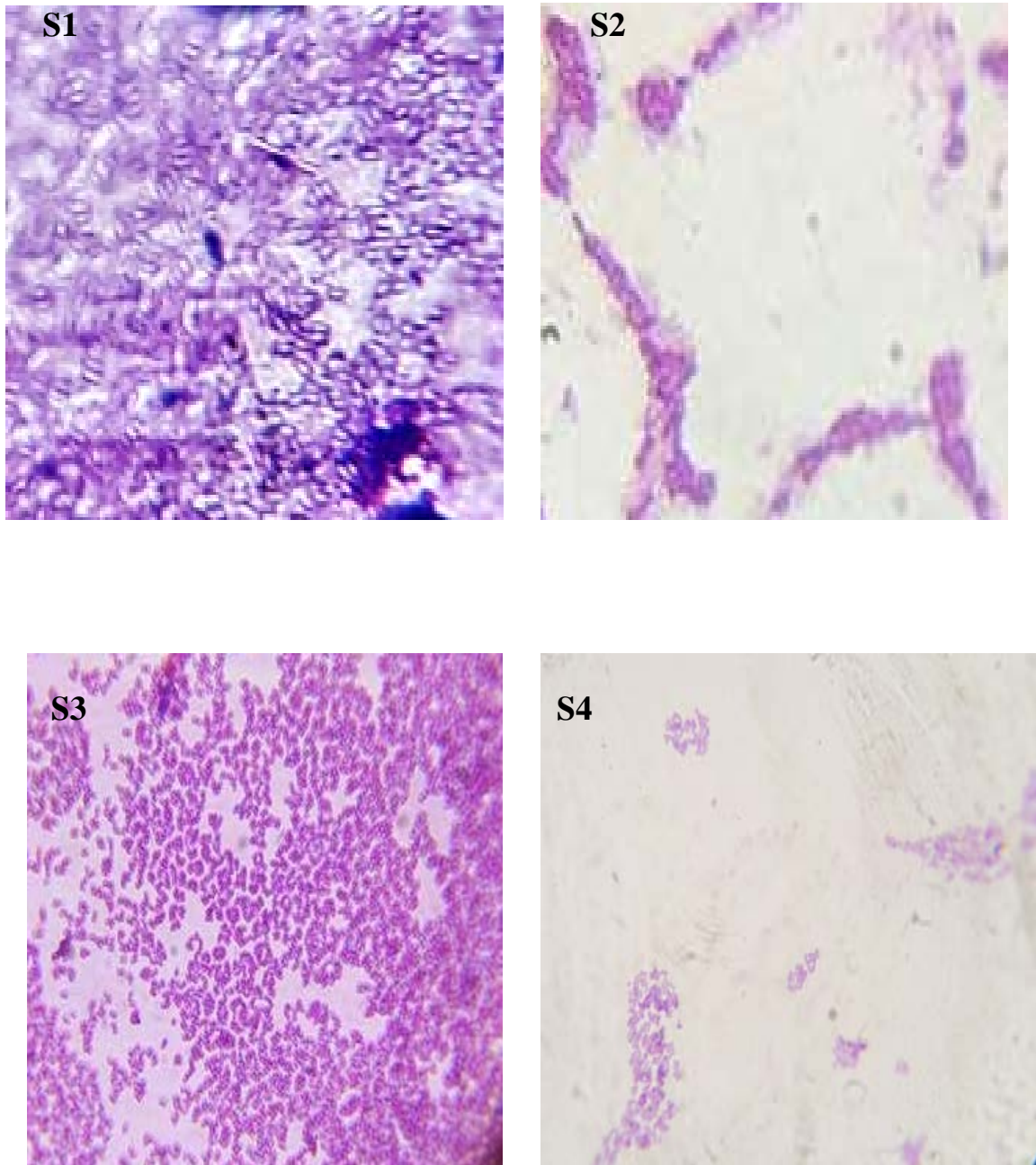
### ➤ Coloration de Gram

Les quatre isolats bactériens (S1, S2, S3, et S4), ont été identifiés selon les recommandations de *Bergey's Manual of systemic Bacteriology* 1986. L'observation microscopique (100X) de ces quatre bactéries a révélé que les isolats (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, et S<sub>4</sub>), sont tous Gram positif (**tableau 08**). Les examens microscopiques ont montré également deux formes de cellules (Coques et Bâtonnets). Les bâtonnets observés sont représentés par les isolats S<sub>1</sub> et S<sub>3</sub>, et les Coques sont représentés par les isolats S<sub>2</sub> et S<sub>4</sub>.

Les bacilles de S<sub>1</sub> et S<sub>3</sub> son disposées en amas. Les cocci de S<sub>2</sub> sont observées en amas et en craps et S<sub>4</sub> sont arrangées en petites chainettes, (**figure 12**).

**Gram +** : son des cellules bactériennes à paroi de peptidoglycane épais qui permet la rétention du Violet de Crystal qui apparaissent en violet sous le microscope.





**Figure 12: réaction des S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, et S<sub>4</sub> à la coloration de Gram sous le microscope photonique, (100X).**

## Résultats et discussion

### 4. L'identification biochimique

Les tests biochimiques effectués pour l'identification des isolats S1, S2, S3, S4 et leurs résultats sont résumés dans le tableau 09

Isolats		S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
<b>Tests biochimiques</b>					
<b>Amylase (Lugol)</b>		+	-	+	-
<b>Catalase</b>		+	-	+	+
<b>Nitrate réductase</b>		+	+	+	+
<b>Croissance à 6 ,5% NaCl</b>		+	+	+	+
<b>VP (Réaction de Voges-Proskauer)</b>		+	+	-	-
<b>Recherche de gélatinase</b>		+	+	+	+
<b>Test de Mannitol mobilité</b>		-	+	+	+
<b>Recherche de lécithines</b>		+	+	+	+
<b>Recherche de citrate</b>		+	-	-	-
<b>Chapman</b>		-	+	-	-
<b>Fermentation d'arabinose</b>		-	+	-	-
<b>Fermentation du glucose</b>	<b>P</b>	+	+	-	-
	<b>A</b>	+	+	+	+

P : présence d'huile (anaérobie)

(+) : réaction positive

A : absence d'huile (aérobie)

(-) : réaction négative

### 5. Caractérisations biochimiques et physiologiques :

➤ L'isolat S<sub>1</sub> a la forme bacillaire, avec de grandes colonies (6mm) circulaires de couleur grise, réguise (**Figure 10**). à Gram positive (**Figure 12**), oxydase négative en présence d'huile et positive en son absence (**Figure 15**).

Cette souche a une capacité à hydrolyser l'amidon (**Figure 16**) et a dégradé le mannitol en absence et présence de l'huile (**Figure 14**). Le test Citrate effectué pour l'identification biochimique du S<sub>1</sub>, indique par le changement de couleur (Vert à bleu), que cet isolat est



## Résultats et discussion

---

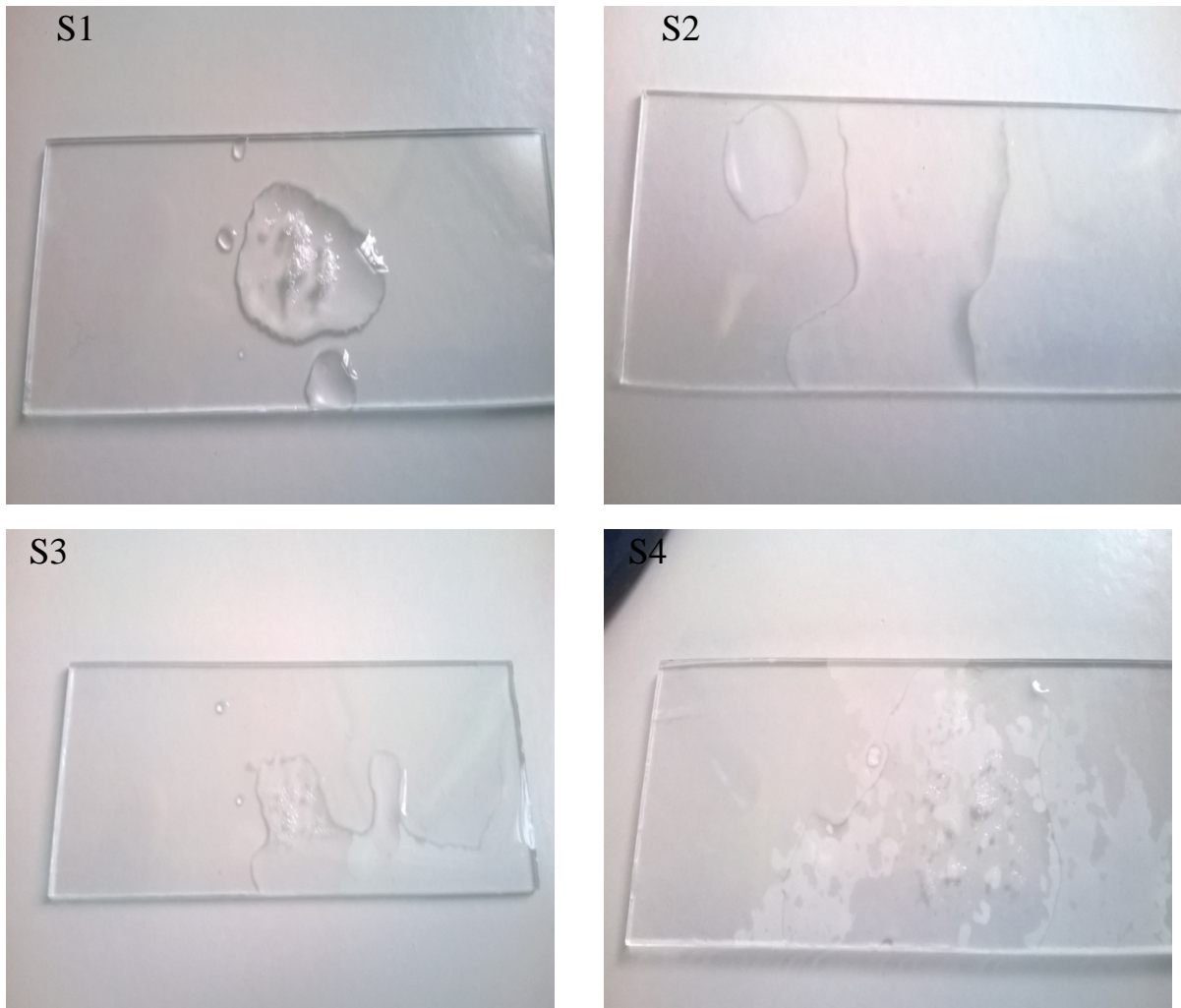
citrate positif (**Figure 22**) (**Tableau 09**). A la fin de ces tests on peut déduire que l'isola S1 se rapproche plus de l'espèce *lichoniformis*.

➤ **L'isolat S<sub>2</sub>** a été rattachée au genre *Staphylococcus*, Celle-ci forme de petites colonies (2mm) en amas de nom courant Staphylocoque doré, lisse et brillante (**Figure 09**). La souche a une forme cocci, à Gram positive (**Figure 12**), oxydase positif en présence et absence d'huile (**Figure 15**). Elle a la capacité à dégrader le mannitol en absence et présence d'huile (**Figure 14**). Par contre elle n'a pas la capacité à hydrolyser l'amidon (**Figure 16**). Le dernier test biochimique réalisé sur milieu gélosé du Chapman on observe une croissance des bactéries autour de la colonie (**Figure 23, Tableau 09**), ce test rapproche la souche à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

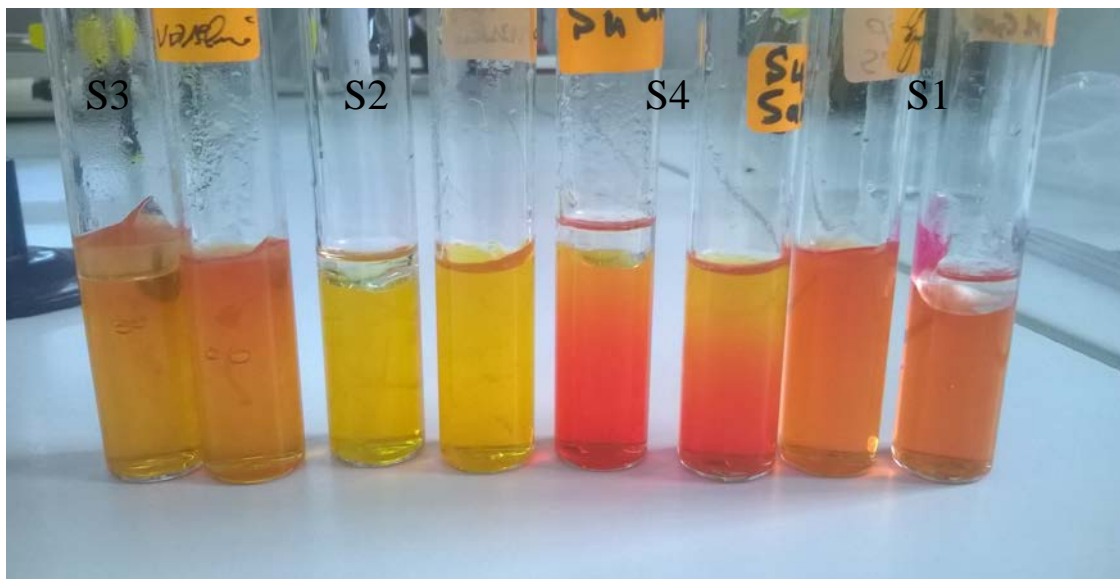
➤ **L'isolat S<sub>3</sub>** a été rattachée au genre *Bacillus*, Celle-ci forme de petites colonies (2mm) circulaires de couleur piège crème, réguise et brillante (**Figure 09**). La souche a une forme bacillaire, à Gram positive (**Figure 12**), oxydase négative en présence d'huile et positive en son absence (**Figure 15**). La capacité de cette souche à hydrolyser l'amidon et à dégrader le mannitol en absence d'huile est positive mais en présence d'huile est négatif (**Figure 16**). Le dernier test biochimique réalisé est le test de la fermentation arabinose qui est positif c'est-à-dire que la souche S3 se rapproche plus de l'espèce : *Bacillus macerans* (**Figure 24, Tableau 09**).

➤ **L'isolat S<sub>4</sub>**, Celle-ci forme des petites colonies (1mm) en chaînettes (**Figure 09**). La souche a la forme cocci, à Gram positive (**Figure 12**), oxydase positif en présence d'huile mais en son absence est négatif (**Figure 15**). La capacité de cette souche à dégrader le mannitol est positive en absence d'huile mais en présence d'huile est négatif (**Figure 14**). Cette souche a l'incapacité à hydrolyser l'amidon (**Figure 16, Tableau 09**). Ces tests biochimiques tendent à montrer que l'isolat bactérien **S<sub>4</sub>** se rapproche plus à l'espèce *Enterococcus spp.*

## Résultats et discussion



**Figure 13: Résultat après le test catalase des les souches S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, et S<sub>4</sub>.**



**Figure 14 : résultat de test mannitol mobilité des souches S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>.**

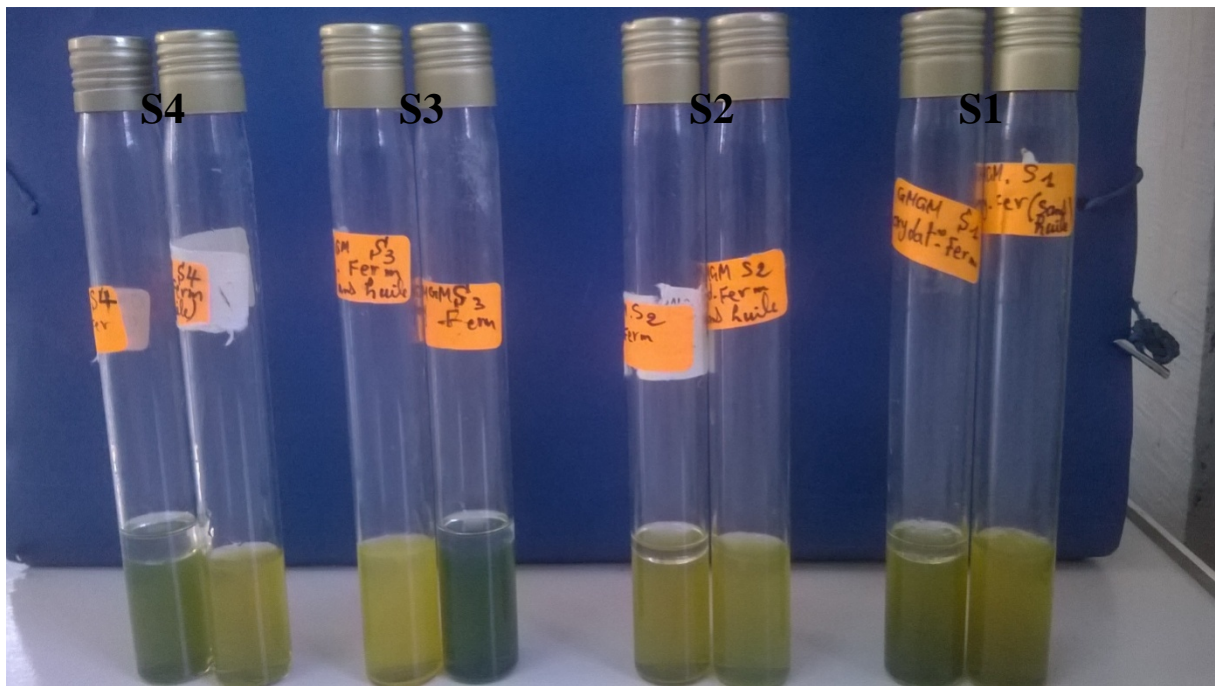


Figure 15 : résultat du test de glucose des isolats S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>.

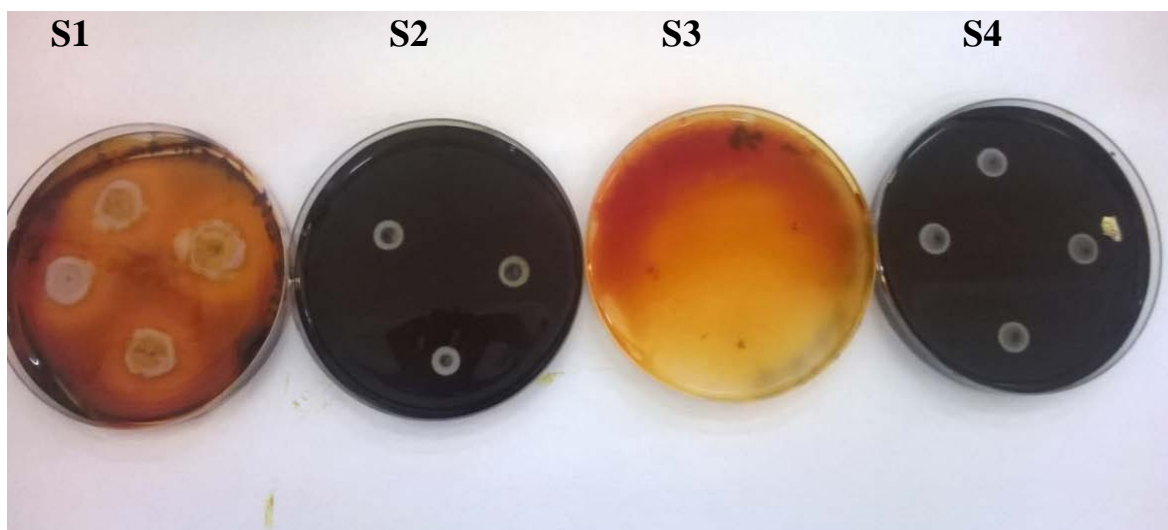
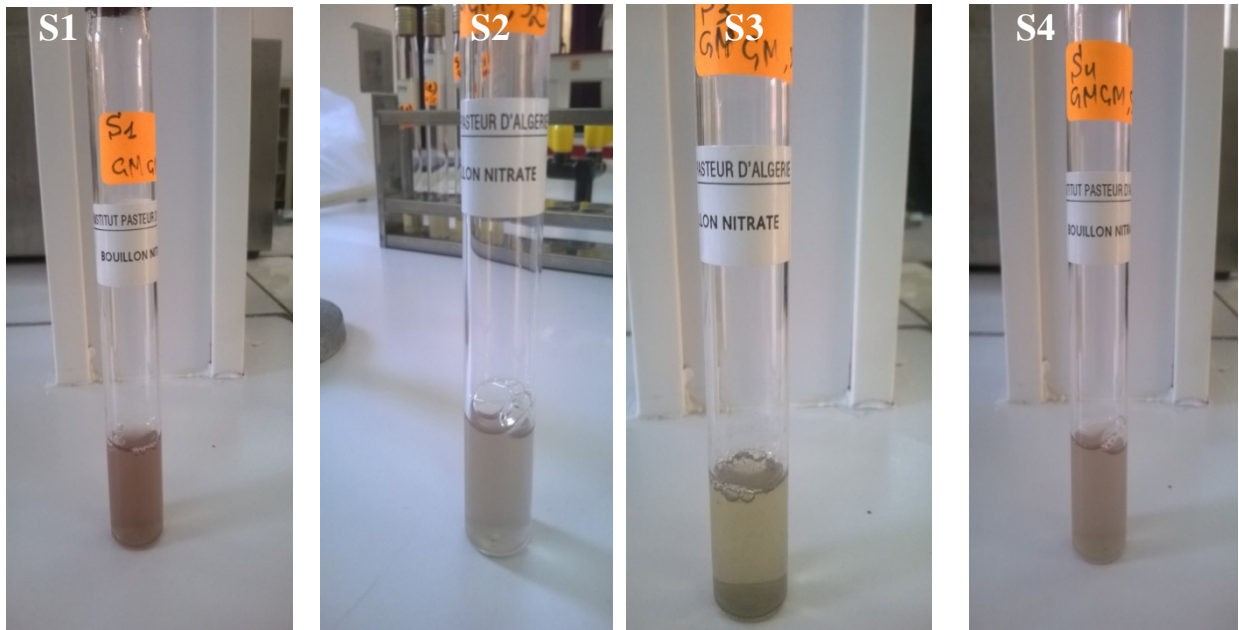


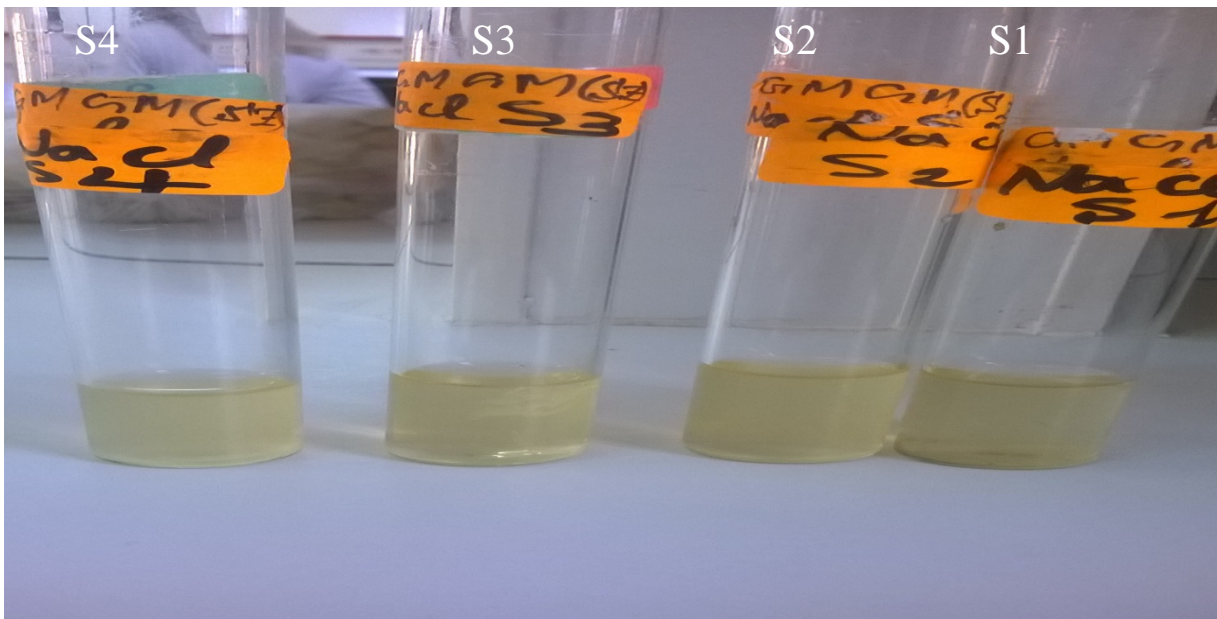
Figure 16: résultat de test de l'hydrolyse de l'amidon des isolats S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>.



## Résultats et discussion



**Figure 17: résultat de test du nitrate réductase pour les isolats S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>.**



**Figure 18 : résultats du test de croissance des isolats S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> sur 6,5%NaCl**

## Résultats et discussion

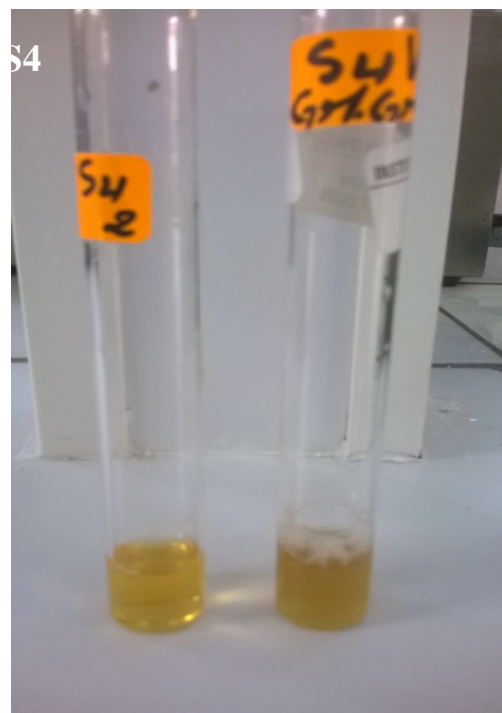
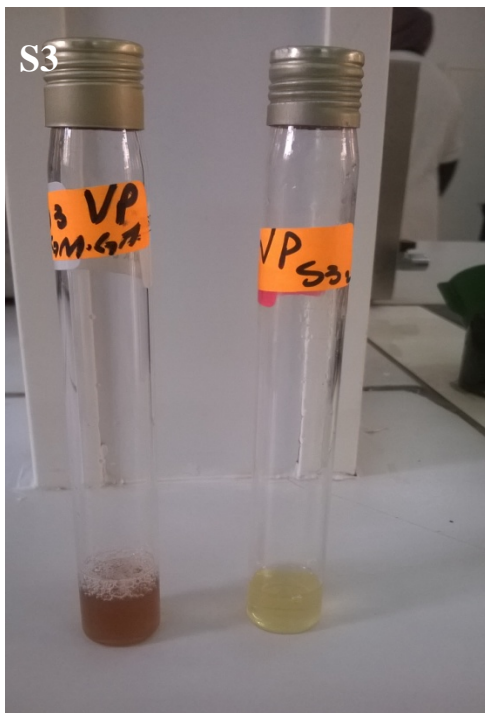
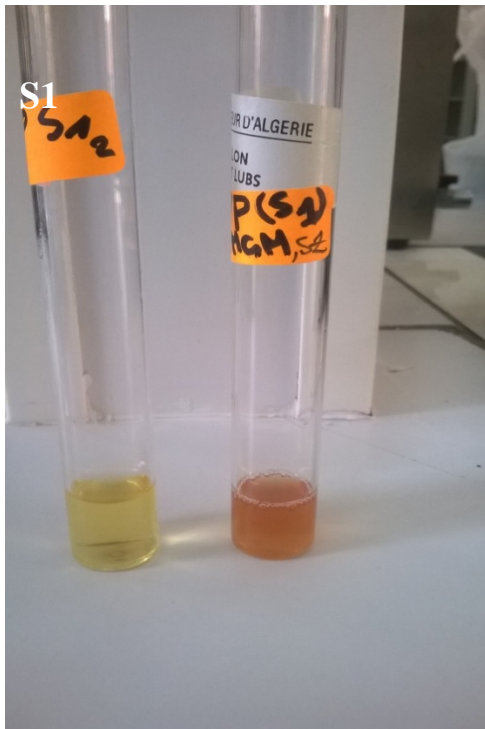
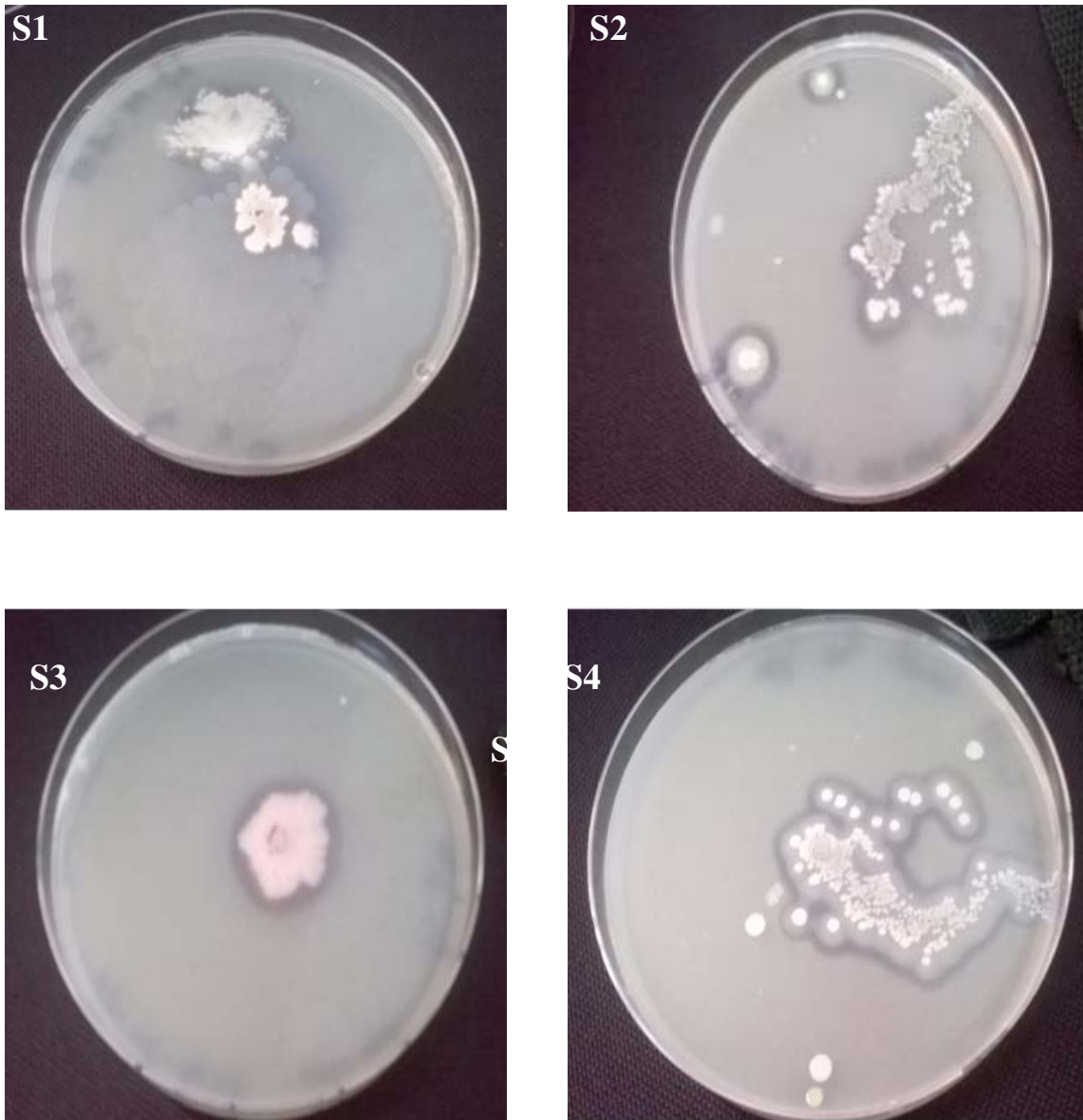


Figure 19: résultats du test VP pour les isolats S1, S2, S3 et S4



**Figure 20: résultats du test de lécithinase pour les souches S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>.**

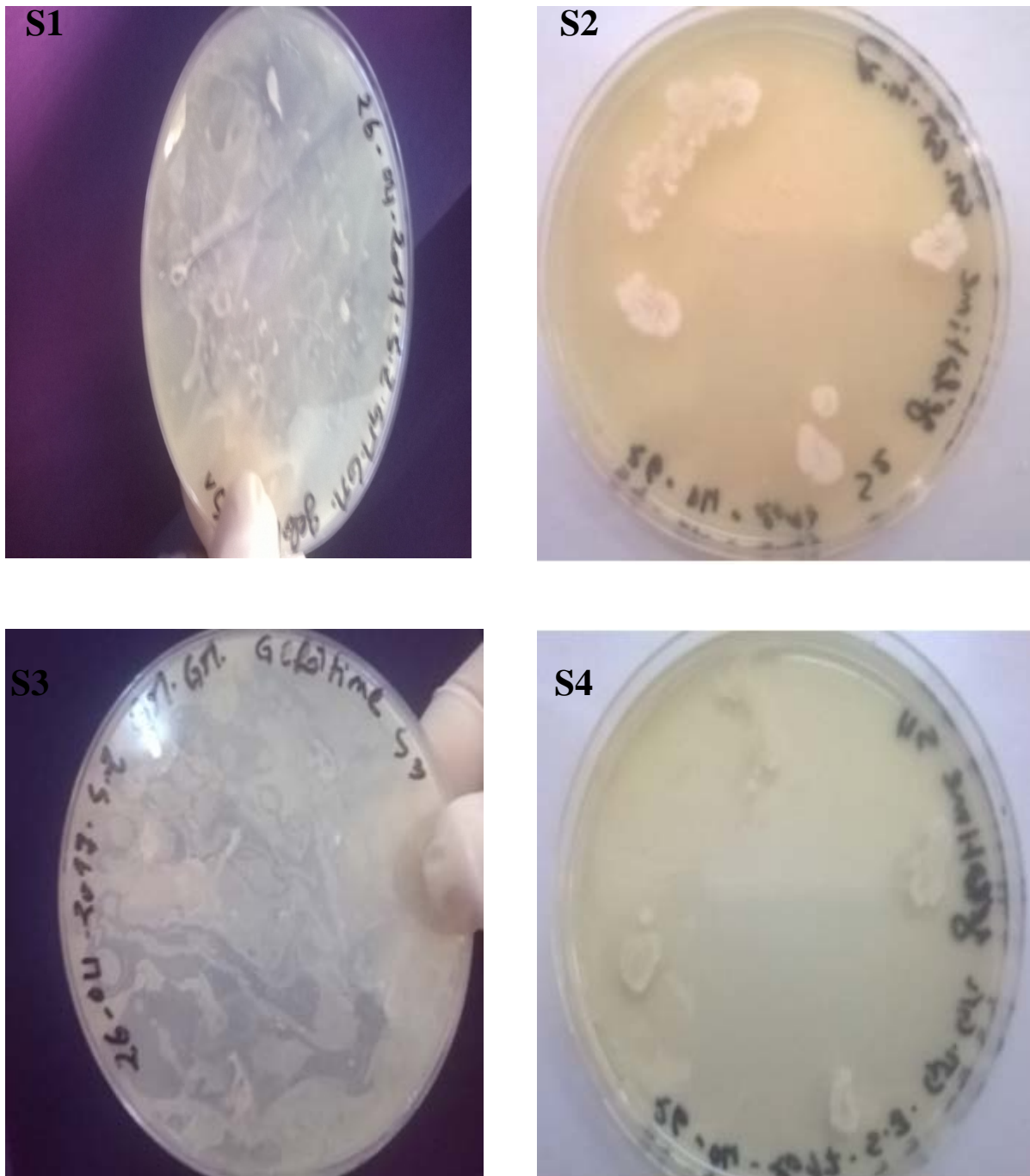
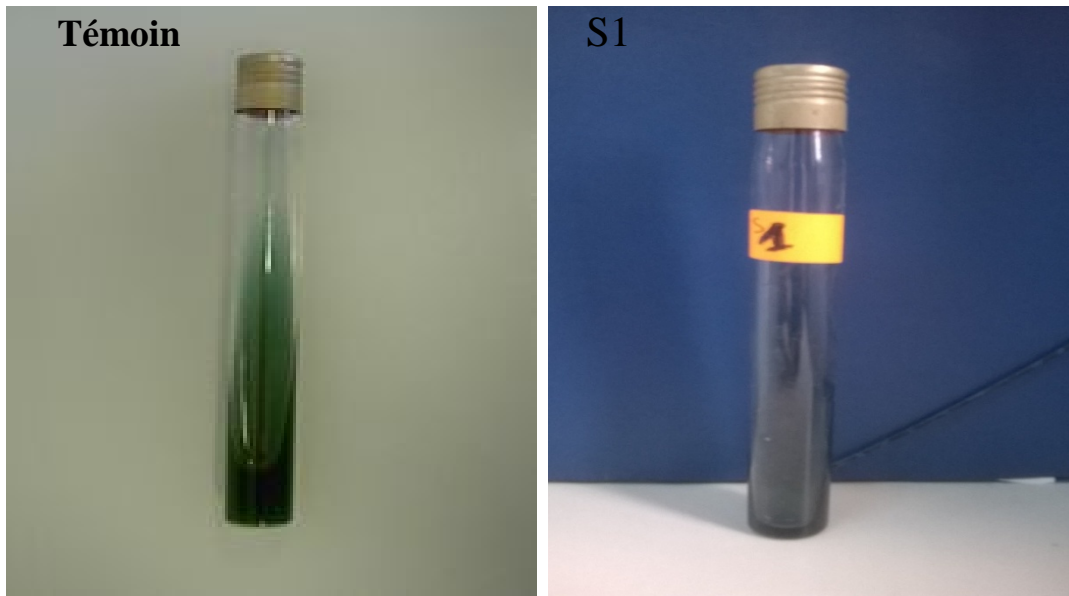
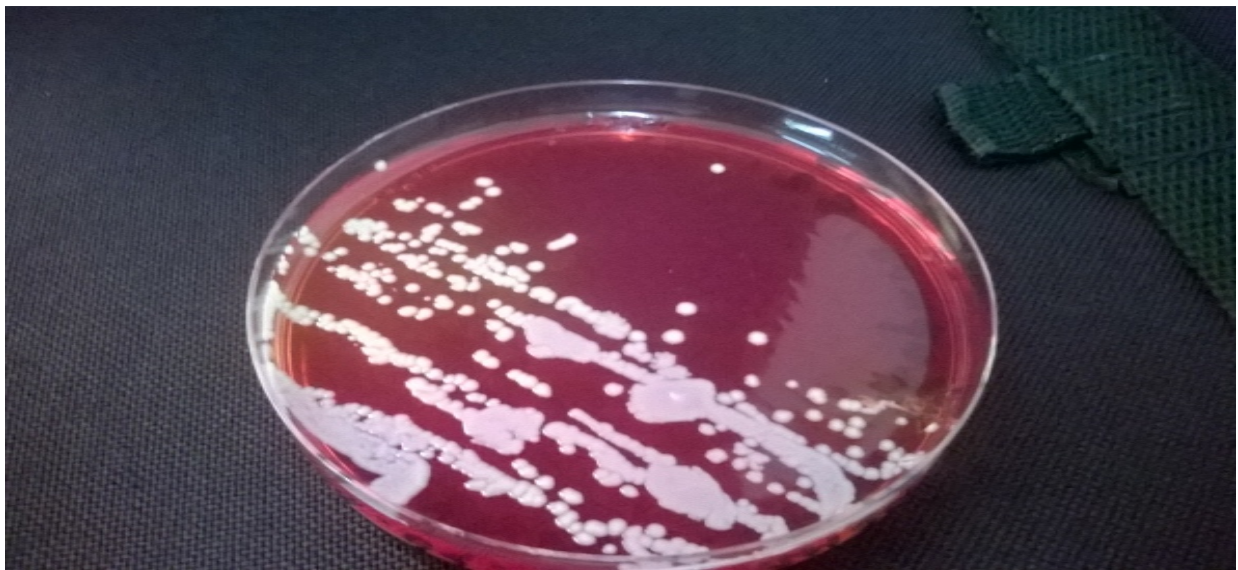


Figure 21 : résultats de test de gélatinase pour les souches S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>.





**Figure 22: résultats de test de Citrate pour la souche S<sub>1</sub>**



**Figure 23 : croissance de la souche S<sub>2</sub> Sur le milieu Chapman**





**Figure 24 : résultats de test arabinose pour la souche S<sub>2</sub>.**

Pour d'autres tests biochimiques, les résultats des quatre souches sont positifs pour :

- **Test de la Catalase**

En ajoutant une goutte de l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) sur une lame sur laquelle on a mis une colonie. Les trois réactions des isolats S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, et S<sub>4</sub> sont positives à cause de l'apparition des bulles abondantes par contre l'isolat S<sub>2</sub> était catalase négative (aucune réaction), (Figure 13, Tableau 09).

- **Recherche de la gélatinase**

Après 24h d'incubation à 37° C, le résultat de la gélatinase des quatre isolats S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> sont mis en évidence par l'apparition des zones claires autour de la colonie. (Figure 21, Tableau 09).

- **Recherche de la lécithinase**

Après 24h d'incubation à 37° C, on observe la croissance des quatre isolats S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> dans le milieu gélosé de jaune d'œuf qui signifie que ces souches possèdent la lécithinase (Figure 20, Tableau 09).

## Résultats et discussion

- **Le test nitrate réductase et vp**

Après 24h d'incubation à 37° C, les quatre tubes de bouillon de nitrate qui contient l'une des souches bactériennes S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>, on observe la croissance des isolats (**Figure 18**). Les résultats de test vp, montrent que les souches S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, sont positive et pour les souches S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> sont négatif (**Figure 19, Tableau 09**).

### 6. Condition optimales de croissance de souches sélectionnées (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>)

L'effet du pH et température sur la croissance des quatre souches protéolytiques est présenté dans **Tableau 10**.

La souche S<sub>1</sub>, a un pH optimal de 9, S<sub>2</sub> et S<sub>4</sub> ont un pH optimum de 7 tant di que .la souche S<sub>3</sub> la croissance était optimal à un pH de 5. La souche S<sub>2</sub> se développe d'une façon optimale à une température de 30°C et presque ne pousse pas à 55°C. Pour les souches S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> la croissance s'établit sur un intervalle de 45°C à 55°C avec un optimum de 55°C pour S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> et de 45°C pour la souche S<sub>1</sub>. Les souches S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> sont des bactéries thermophiles.

**Tableau 10. Les densités optiques accordées aux différentes conditions de croissance des quatre souches.**

Facteur		pH			Température		
		5	7	9	30 °C	45 °C	55 °C
La densité optique à 420 nm	S1	0,455	0,228	<b>0,588</b>	0,146	<b>0,300</b>	0,172
	S2	0,393	<b>0,518</b>	0,012	<b>0,532</b>	0,195	0,143
	S3	<b>0,362</b>	0,111	0,134	0,332	0,164	<b>0,512</b>
	S4	0,219	<b>0,465</b>	0,030	0,299	0,026	<b>0,301</b>

### Discussion

Beaucoup des bactéries à une forte activité protéolytique (caséinolytique) du fait de la dégradation de la caséine par des microorganismes isolées à partir de plume de poulet (**Matikevičienė, et al., 2015**). Comme les résultats de cette étude l'indiquent, des isolats bactériens ont été isolés et identifiés selon leurs aspects morphologiques et biochimiques. Les quatre isolats protéolytiques obtenues étaient : *Bacillus* (S<sub>1</sub>:*B. licheniformis* et S<sub>3</sub> : *B. macerans*), S<sub>2</sub> : *Staphylococcus aureus*, S<sub>4</sub> :*Enterococcus* spp. La température et pH optimaux pour la croissance de la souche S<sub>1</sub> (*B. licheniformis* ) étaient 45°C et 9. Le pH 7 était le pH optimal pour la croissance des souches *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. Cependant la température optimale pour la croissance de *B. macerans* était 30°C et, *Enterococcus* spp était de 55°C et pH 5.

Cependant d'autres résultats obtenues par des chercheurs en utilisant la source d'isolement c'est à dire à partir de plumes de poulets a été identifié comme *Bacillus* sp. C4 (**Fellahi, S et al., 2014**), et le pH du milieu 8.5 et la température optimal de développement de 37°C, *Bacillus* spp (**Suntornsuk, et al., 2003**) de pH optimal de 8,0 et elle peut donner une biomasse à une température de 50°C et un pH, de 9.0. Des résultats similaires étaient rapportés par (**Altalo et Gashe ., (1993) et Cheng et al. (1995)**). Les espèces appartenant au genre *Bacillus* sont typiquement mésophiles et poussent bien dans une température, entre 30-40 ° C (**Sneath et al., 1986**). A l'exception de *B. licheniformis* qui avait une croissance maximale et une production de kératinase à 45-50 °C (**Williams et al., 1990, Cheng et al., 1995**). **Kim et al ., (2001)** ont indiqué que les conditions optimales pour la production de protéase kératinolytique par *B. subtilis* étaient de 40 ° C et de pH 5-9, pour *B.pumilus* 40 ° C et pH 5-6 et pour *B. cereus* 30 ° C et pH 7.0.

# Conclusion

---

## CONCLUSION

Il ya un regain d'intérêt dans l'étude des enzymes protéolytiques, principalement en raison de la reconnaissance du fait que ces enzymes jouent non seulement un rôle important dans les processus cellulaires métaboliques, mais ont également gagné une attention considérable dans la communauté industrielle. La valeur estimée du marché mondiale d'enzyme en 2005 était d'environ US \$2.0x10<sup>9</sup>, et passera à 3,0 x 10<sup>9</sup> d'ici à 2015. Dans ce marché, environ 60% de ces enzymes sont des protéases produites commercialement sont d'origine microbienne et détiennent environ 50% du marché totale de enzyme. Leur utilisation dans la formulation des détergents représente un pourcentage élevé (89%) de leurs ventes totales.

Les bactéries sont le groupe le plus dominant de producteurs de protéase alcaline avec le genre *Bacilles* étant la source la plus importante. Pour tous ces arguments on a essayé à travers cet étude d'isoler quelques bactéries ayant une capacité protéolytique à partir de plumes de poulet.

Dans cette étude, deux principaux sont :

Le premier consiste en l'obtention des isolats protéolytique à partir de plumes de poulet et le second a pour intérêt les identifiées.

On a isolé durant la première étape neuf e souches de bactéries protéolytiques à a partir de plumes de poulet.les isolats **S<sub>1</sub>**, **S<sub>2</sub>**, **S<sub>3</sub>**, et **S<sub>4</sub>** ayant une forte activité protéolytique (caséinolytique) du fait de la dégradation de la caséine, sont sélectionnés pour continuer cette étude.

La deuxième étape consiste à identifier ces quatre isolats de l'étape précédente. L'identification, basé sur les caractères morphologiques et sur les différents métabolismes biochimiques, nous a permis de rapproche ces isolats aux espèces appartenant à trois genres. les espèces obtenues étaient : *bacillus* (**S<sub>1</sub>**: *B. lichoniformis* et **S<sub>3</sub>** : *B.macerans*), **S<sub>2</sub>** : *staphylococcus aureus*, **S<sub>4</sub>** : *Enterococcus* spp.

Au cour de la dernière étape, les facteur températures et pH optimaux pour la croissance de chaque souche des quatre sont déterminés. Les facteurs la température et pH optimaux pour la croissance de la souche **S<sub>1</sub>** (*B. lichoniformis* ) étaient 45°Cet 9. Le pH 7était le pH optimal pour la croissance des souches *staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. Cependant

## Conclusion

---

la température optimale pour le développement de *B.macerans*, *Enterococcus* spp était de 55°C et pH de dernière c'est 5.

A la suite de ce travail, nous envisageons les perspectives suivantes :

- Il serait intéressant de la souche d'utiliser ces souches protéolytiques comme des bioréacteurs pour dépolluer les sites contaminées par les déchets protéiniques surtout par la gélatine. Cela constitue une technique plus propre ou moins polluante et des déchets plus biodégradables.
- Etudier les domaines d'application de l'enzyme et son mécanisme d'action.

## Références

---

1. **Adinarayana, K ; Bapiraju, K et Ellaiah, P.** *Investigation on alkaline protease production with B. Subtilis PE-11 immobilized in calcium alginate gel beads.* Biochemistry, 2004, 39.p. 1331-1339.
2. **Altalo K., Gashe B.A.** (1993). Protease production by a thermophilic *Bacillus* species (P-001A), which degrade various kinds of fibrous protein. *Biotechnol. Lett.*, 15:1151-1156.
3. **Agrawal, A et Pulendran, B.** *Anthrax lethal toxin : a weapon of multisystem destruction.* Cellular and Molecular Life Science, 2004 ; 61. p. 2859-2865.
4. **Aguilar, C.N., Gutiérrez-Sánchez, G., Rado-Barragán, P.A., Rodríguez-Herrera, R., Martínez-Hernandez, J.L et Contreras-Esquivel, J.C.** *Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes.* American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2008, 4(4).p. 354-366.
5. **Assamoi, A.A ; Destain, J et Thonart, P.** *Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo-B-1,4-xylanases de moisissures : le cas de penicillium canescens.* Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 2009, 13(2).p . 281-294.
6. **Aviron-Violet, P., Baret, J.L., Bertrand, C., Blazy, B et Bouvier, F.** *Les enzymes : Production et utilisation industrielles : production et utilisation industrielles.* Paris : Bordas, 1982.p. 140-153.
7. **Barett, A.J.** *Enzymes protéolytiques : aspartique et metallopeptidases.* Methodes in Enzymology, 1995, 248. p. 183.
8. **Barret, A.J.** *The cystatins : a new class of peptidase inhibitors.* Trends in biochemical Sciences, 1987, 12. p. 193-196.
9. **Bergmeyer, H.U.** Principes de l'analyse enzymatique. Lavoisier. Paris : Technique et Documentation, 1979,17. p. 75-80, 240-262.
10. **Branden,a et tooze,j.** *Introduction à la structure des protéines* , Edition . De Boeck universités,1996.p.102-111.
11. **Carr, F.J., Chill, D., et Maida, N. (2002).** The Lactic Acid Bacteria : A Literature Survey. *Critical Rev. Microbiol*, 28 : (4) 281-370.
12. **Chitpintyol S., Crabbe M.J.C.** *Chymosin and aspartic proteinases.* Food Chem, 1998, 61.p. 395-418.
13. **Cheng S.W., Hu H.M., Shen S.W., Takagi H., Asano M., Tsai Y.C.** (1995). Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59(12): 2239-2243.
14. **Cleary, P.P; Matsuka, Y.V ; Huynh, T ; Lam, H et Olmsted, S.B.** *Immunization with C5a peptidase from either group A or B Streptococci enhances clearance of group A Streptococci from intranasally infected mice.* Vaccine, 2004, 22. p. 4332-4341.
15. **Dalev, P.G.** *Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate.* Bioresource Technology, 1994, 48.p. 265–267.
16. **Devi, M.K., Banu, A.R., Gnanaprabhal, G.R., Pradeep, B.V et Palaniswamy, M.** *Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate*

## Références

---

- Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. Indian Journal of Science and Technology, 2008, 1(7).p. 1-6.
17. **De Vos, P ; Garrity, G. M ; Jones, D ; Krieg, N. R ; Ludwig, W ; Rainey, F.A ; Schleifer, K. H ; et Whitman, W. B, 2009.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Volume III, The firmicutes. Springer, New York, USA.
  18. **Dorner, W. (1926).** Un procédé simple pour la coloration des spores. Avec une planche en couleurs. *Le lait*, 6 (51), 8-12.
  19. **Ferrero, M.A.** *Protein hydrolysis: Isolation and characterization of microbial proteases.* Food Microbiology Protocols, 2000, 14.p. 227-232.
  20. **Fellahi, S., Zaghloul, T. I., Feuk-Lagerstedt, E., & Taherzadeh, M. J. (2014).** A bacillus strain able to hydrolyze alpha- and beta-keratin. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 4, 7.
  21. **Fitzgerald, P.M.D ; Mckeever, B.M ; Van Middlesworth, J.F ; Springer, J. ; Heimbach, J.C ; Chih-Chih-Tai, L ; Herber, W.K ; Dixon, R.A.F. et Darke, P.L.** *Analyse cristallographique d'un complexe entre la protéase de type 1 de virus d'immunodéficience et l'acetyl-pepstatin à la résolution 2.0Å.* *J. Biological Chemistry*, 1990, 265.p. 14219.
  22. **Font de Valdez,G (2002).** *Maintenance of lactic acid bacteria.* In food Microbiology protocols. Spencer. D. F. T. ET R agout ET spencer,A.L eds Humana press. Totowa New jersey. Argentine. 163-171.
  23. **García-Gómez, M.J ; Huerta-Ochoa, S ; Loera-Corral, O et Prado-Barragan, L.A.** *Advantages of a proteolytic extract by Aspergillus Oryzae from fish flour over a commercial proteolytic preparation.* *Food Chemistry*, 2009,112. p. 604-608.
  24. **Gupta, R., Beg, Q.K et Lorenz, P.** *Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications.* *Applied Microbiology Biotechnology*, 2002, 59. p. 15-32.
  25. **Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M et Gharsallah, N.** *Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated Aspergillus clavatus ES1.* *Process Biochemistry*, 2007, 42. p. 791-797.
  26. **Hase, C.C et Finkelstein, R.A.** *Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases.* *Microbiology Review*, 1993, 57.p. 823-837.
  27. **Ichida, J.M ; Krizova, L ; Lefebvre, C.A ; Keener, H.M ; Elwell, D.L et Burt J.R, E.H.** *Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost.* *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 47.p. 199-208.
  28. **Joo, H.S et Chang, C.S.** *Production of protease from a new alkalophilic Bacillus sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties.* *Process Biochemistry*, 2005, 40.p. 1263–1270.
  29. **Korkmaz, H ; Hur, H et Dinçer, S.** *Characterization of alkaline protease of Bacillus licheniformis strain HK-1 from poultry waste.* *Annals of Microbiology*, 2004, 54(2), 201-211.
  30. **Kortt, A.A et Stewart, D.J.** *Properties of the extracellular acidic proteases of Dichelobacter nodosus. Stability and specificity of peptide bond cleavage.*

## Références

---

- International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 34. p. 1167-1176.
31. **Kim J.M., Lim W.J., Suh H.J.** (2001). Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process. Biochem.*, 37: 287-291
  32. **Kudrya, V.A et Simonenko, I.A.** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 41. p. 505-509.
  33. **Kumar, A.G., Nagesh, N., Prabhakar, T.G., Sekaran, G.** *Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by Synergistes sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries.* *Bioresource Technology*, 2008b, 99.p. 2364-2372.
  34. **Kumar, D., Savitri., Thakur, N., Verma, R., Bhalla, T.C.** *Microbial proteases and application as laundry detergent additive.* *Research Journal of Microbiology*, 2008a, 3(12).p. 661-672.
  35. **Lamouliatte, H., Mégrand F., et Cayla R., (1992).** *Helicobacter pylori et pathologie gastroduodénale.* *Encyclopédie Médico-chirurgicale.* Editions techniques. EMC.
  36. **Larsen K.S., Auld D.S.** *Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A.* *Biochemistry*, 1991, 30.p. 2613-2618.
  37. **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 *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry*, 2005, 40.p. 3152-3158.
  38. **Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O et Turunen, O., 2001.** *Industrial use of enzymes.* *Laboratory Bioproc. Eng., Helsinki University of Technology, Finland,* and Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.
  39. **Marchal, N ; et Bourdon, J. L ; (1982).** *Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.* Ed. Doin, Paris.
  40. **Mala, B.R ; Aparna, M.T ; Mohini, S.G et Vasanti, V.D.** *Molecular and biotechnological Aspects of Microbial Proteases.* *Microbiology and Molecular Biology Review*, 1998, 62.p. 3597-635.
  41. **Matikevičienė, V., Masiliūnienė, D. and Grigiškis, S.** (2015) Degradation of keratin containing wastes by bacteria with keratinolytic activity. *Environment. Technology. Resources. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference*, pp. 284–289.
  42. **Patel, R ; Dodia, M et Singh, S.P.** *Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic Bacillus sp. : Production and optimization.* *Process Biochemistry*, 2005, 40.p. 3569-3575.
  43. **Pelmont, J.** *Enzymes : catalyseurs du monde vivant.* Grenoble : Presse Universitaire de Grenoble, 1995.p. 7, 621, 652-654.
  44. **Prasad, H. V, G. Kumar, Karthik L, and B. Rao KV.** *Screening of Extracellular Keratinase Producing Bacteria from Feather Processing Areas in Vellore, Tamil Nadu, India J. Sci. Res.,* 2010, 2(3), 559-565.



## Références

---

45. **Rai, S.K et Mukherjee, A.K** Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemistry Engineering Journal*, 2010, 48. p. 173-180.
46. **Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S.,** Deshpande, V.V. *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 1998, 62. p. 597-635.
47. **Rawlings, N.D ; Morton, F.R et Barrett, A.J.** *MEROPS : the peptidase database*. *Nucleic Acids Research*, 2006,34. p. 270-272.
48. **Sandhya, C., Nampoothiri, K.M et Pandey, A.** *Microbial proteases*. *Methods Biotechnology*, 2005a, 17.p. 165-179.
49. **Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G et Pandey, A.** *Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation*. *Process Biochemistry*, 2005b, 40.p. 2689-2694.
50. **Scriban, R.** *Biotechnologie*. 4e édition. Paris : Technique et Documentation, 1993.p. 39, 42, 351-356.
51. **Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.** (1986). In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2, Williams and Wilkin, Baltimore.
52. **Sielecki, A.R ; Fujinaga, M ; Lu, R.J et James, M.N.G.** *Structure de raffinage de pepsinogen porcin à la résolution 1.8Å*. *Journal of Molecular Biology*, 1991, 219.p. 671-692.
53. **Siezen, R.J et Leunissen, J.A.** *Subtilases : the superfamily of subtilisin-like serine protéases*. *Protein Science*, 1997, 6.p. 501-523.
54. **Sinsuwan, S., Rodtong, S et Yongsawatdigul, J.** *Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation*. *Process Biochemistry*, 2008, 43. p. 185-192.
55. **Srinubabu, G ; Lokeswari, N et Jayaraju, K.** *Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus Oryzae**. *E-Journal of Chemistry*, 2007, 4(2). p. 208-215.
56. **Suntornsuk, W., & Suntornsuk, L.** (2003). Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. *Bioresource Technology*, 86, 239–243.
57. **Suguna, K ; Padlan, E.A ; Smith, C.W ; Carlson, W.D et Davies, D.R.** *Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis* : implications for a mechanism of action*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, 84.p. 7009.
58. **Sumantha, A., Larroche, C et Pandey, A.** *Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective*. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, 244. p. 211-220.
59. **Tortora. G..J ; B.R. Funk ; C.L. Case.** (2003). *Introduction à la microbiologie*. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Pp. 945.
60. **Wigler, M.** *Transfer of purified Herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells*. *Cell*, 1977,11 : 223-232.

## Références

---

61. **Williams C.M., Richter C.S., MacKenzie J.M., Smith J.M., Shih J.C.** (1990). Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl. Envi- ron. Microbiol.*, 56: 1509-1515.
  
62. **Wu, T.Y ; Mohammed, A.W ; Jahim, J.Md. et Anuar, N.** *Investigations on protease production by a wild-type Aspergillus terreus strain using diluted retentateof pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate.* *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39. P. 1223-1229.

([http://www. Bergeys. Org](http://www.Bergeys.Org) ).

# Annexe

## Colorant, réactifs et milieux de culture

### Annexe 01 : Colorants

#### Fuschine de ziehl

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

#### Lugol :

- Iode.....1g
- Iodure de potassium .....10g
- Eau distillée .....300l

#### Violet de gentiane

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

### Annexe 02 : Réactifs

- $\alpha$ -naphtol : réactif pour la réaction de vosges –proskauer
- Naphtol .....6g
- Alcool éthylique à 60° .....100ml

-Conserver dans un flacon opaque au réfrigérateur

### Annexe 03 : Milieux de culture

- Les milieux sont préparés dans un litre d'eau distillée :

#### Milieu GN

- Extrait de levure.....2g
- Peptone .....6g
- Extrait de viande .....1g
- NaCl.....5g

- Agar.....20g  
Ph à7.2

### **Milieux LEA :**

- Extrait de la levure .....0.5g
- Lait en poudre .....10g
- Agar.....20g
- Ph à7.2

### **Milieux de bouillons nutritif**

- Extrait de la levure .....2g
- Peptone .....6g
- Extrait de viande .....1g
- NaCl .....5g
- Ph à 7

### **Milieux de l'eau physiologie**

- NaCl.....9g

### **Préparation de jaune d'œuf.**

Dans un flacon stérile, récupérez le jaune d'œuf –après avoir flambée la couille avec de l'alcool pendant 30 secondes- ensuite ajoutez 4fois le volume en eau distillée stérile, mélangez rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C ensuite au réfrigérateur pendant 24 heures.

### **Milieux mossel au jaune d'œuf**

- Milieu mossel de base .....90 ml
- Emulsion de jaune d'œuf .....10ml

### **Milieu de NaCL à 6,5%**

- Peptone .....10g
- Extrait De La Levure.....5g
- NaCL A 6,5%.....65g
- PH A 7,2

### **Milieu pour le test de V-P :**

- Peptone .....5g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....5g

- Glucose à 10%.....50ml
- PH à 7, 6

### Milieu a base de gélatine

- Extrait de levure .....100g
- Gélatine .....10g
- Agar .....20g
- PH à 7, 2

### Milieu d'oxydation-fermentation

- Peptone .....2g
- NaCl.....5g
- $K_2HPO_4$ .....0.3g
- Blue de bromothymol.....0.03g
- PH à 7, 2

### Milieu de citrate

- Citrate de sodium.....1.0g
- Bleu de bromothymol .....0.08g
- Chlorure de sodium.....5.0g
- Sulfate de magnésium.....0.2g
- Hydrogénophosphate de potassium.....1.0g
- Dihydrogénophosphate d'ammonium.....1.0g
- Agar-agar.....15g
- PH à 6.9



## Spectrophotométrie