
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
CENTRE UNIVERSITAIRE BELHADJ BOUCHAIB D'AIN-TEMOUCHENT



Faculté des sciences

Département de Science de la Nature et de la Vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliquée

Présenté par :

M^{elle}. MEHTAR TANI Ranya

M^{elle}. KEHLOUL Aicha Kaouter

INITIATION A LA RECHERCHE ET A LA CARACTERISATION DE
PROTEASES A INTERET INDUSTRIEL CHEZ DES ISOLATS BACTERIENS

Encadrant :

M. Sofiane Mourad BENYAMINA

Maitre de Conférences « B » au C.U.B.B.A.T

Soutenu le 16/06/ 2019

Devant le jury composé de :

Président : Dr. Mahfoud BAKLI (MCB)	CUBBAT
Examinatrice : Dr. Meriem ZERRIOUH (MCB)	CUBBAT
Examinatrice : Dr. Meriem LACHACHI (MCB)	CUBBAT
Encadrant : Dr. Sofiane Mourad BENYAMINA (MCB)	CUBBAT

Remerciement

En préambule, on remercie Dieu le plus puissant, le miséricordieux, de nous avoir donné la santé, le courage et la persistance pour pouvoir finaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Notre plus grande gratitude va à notre encadrant M. Sofiane Mourad BENYAMINA pour l'orientation, pour la confiance qui nous a accordé et le temps qu'il a consacré pour bien nous former, ses exigences nous ont grandement stimulées.

Nos remerciements s'étendent également à Mr. Mahfoud BAKLI qui nous a fait l'honneur de présider le jury, ainsi qu'à Mme. Meriem ZERIOUH et Mme. Meriem LACHACHI qui ont accepté d'examiner notre texte, pour leur lecture attentive du mémoire et pour les remarques qu'ils nous adresseront afin d'améliorer notre travail.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participés de près ou de loin à la réalisation de ce travail et les professeurs qui nous ont enseignés au Centre Universitaire Belhadj Bouchaib Ain Temouchent.

Avec toute notre reconnaissance

Mehtar Tani Ranya

Kehloul Aicha Kaouter

Remerciement

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....01

Synthèse bibliographique

1. Les enzymes 02

2. hydrolases03

3. Les protéases.....04

3.1. Classification des protéases.....04

3.1.1. Selon la nature chimique de leurs sites actifs05

3.1.1.1. Les protéases à Serine (EC. 3.4.21)05

3.1.1.2. Les protéases à Cystéine (EC 3.4.22)05

3.1.1.3. Les protéases aspartiques (EC 3.4.23)05

3.1.1.4. Les métalloprotéases (EC 3.4.24)05

3.1.2. Selon leurs sites d'action06

3.1.2.1. Les exopeptidases06

3.1.2.2. Les endopeptidases06

3.2. Importance des protéases.....07

3.2.1. Au niveau cellulaire.....07

3.2.2. Au niveau industriel.....07

3.3. Les sources différentes sources des protéases.....08

3.3.1. Les protéases d'origines végétales.....08

3.3.2. Les protéases d'origines animales.....08

3.3.3. Les protéases d'origines microbiennes.....	09
3.3.3.1. Les champignons.....	09
3.3.3.2. Les Bactéries.....	10

Matériels et méthodes

1. Préparation de milieux de cultures.....	12
1.1. Préparation de la gélose nutritive.....	12
1.2. Préparation du bouillon nutritif.....	12
2. Isolement, purification et sélection des isolats bactériens producteurs des protéases extracellulaires.....	12
2.1. Isolement et purification.....	12
2.1.1. Isolement des bactéries à partir du sol vierge et de la rhizosphère.....	12
2.1.2. Isolement des bactéries à partir du yaourt	13
2.1.3. Isolement des bactéries à partir de l'œuf	12
2.1.4. Isolement des bactéries à partir de la cavité buccale.....	14
3. Vérification de la pureté des isolats	14
3.1. Observation macroscopique	14
3.2. Observation microscopique.....	14
4. Criblage des isolats à protéases extracellulaires positives (gélatinase positive)	14
5. Récupération de l'extrait brut bactérien pour test de l'activité protéases +.....	15
6. Dosage des protéines dans l'extrait brut des isolats à protéases +.....	16
7. Caractérisation de l'activité protéolytique de l'extrait brut des isolats	16
7.1. Influence du temps d'incubation sur l'activité protéolytique.....	17
7.2. Influence de la température sur l'activité protéolytique.	17

7.3. Influence du pH sur la croissance bactérienne et sur l'activité protéolytique	18
7.4. Influence du CaCl ₂ sur l'activité protéolytique.....	18
8. Effet de différents traitements, thermique, pH et CaCl ₂ sur la stabilité de l'enzyme.....	19
8.1. Effet du traitement thermique sur la stabilité de l'enzyme.....	19
8.2. Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme.....	19
8.3. Effet du CaCl ₂ sur la stabilité de l'enzyme.....	19

Résultats et discussion

1. Isolement des bactéries à partir des échantillons.....	20
2. Vérification de la pureté des souches.....	20
3. Criblage des isolats à protéases extracellulaires positives (gélatinase positive)	20
4. Etude de l'activité protéolytique des extraits bruts.....	22
4.1. Influence de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique.....	22
4.2. Influence de la température sur l'activité protéolytique.....	24
4.3. Influence du pH sur la croissance bactérienne et sur l'activité protéolytique.....	25
4.4. Influence du CaCl ₂ sur l'activité protéolytique.	28
5. Etude de la stabilité des protéases des extraits bruts.....	29
5.1. Effet du traitement thermique sur la stabilité de l'enzyme.....	29
5.2. Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme.....	20
5.3. Effet du CaCl ₂ sur la stabilité de l'enzyme.....	33
6. Discussion générale.....	34
Conclusion générale et perspectives.....	38
Références bibliographiques.....	40

Abstract

LISTE DES ABREVIATIONS

CaCl₂ : Chlorure de calcium

DO : Densité Optique

E.coli : *Escherichia coli*

E.D.T.A : acide éthylène-diamine-tétra
acétique

g : Gramme

h : heure

ICB : Isolat cavité buccale

IOE : Isolat œuf

IRS : Isolat rhizosphère

IS : Isolat sol

IYT : Isolat yaourt

l : Litre

M : Molaire

Mg : Milligramme

min : Minute

mL : Millilitre

NaCl:chlorure de sodium

nm : Nanomètre

pH : Potentiel d'Hydrogène

P.M.S.F : Phénylméthanesulfonyl fluoride

rpm : Rotation Par Minute

TCA : TriChloroacetic Acid

uv : ultra violet

µl : Microlitre

% : pourcentage

°C : Degré Celsius

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales entreprises productrices de protéases (Rao et al., 1998).....	08
Tableau2 : Milieu réactionnel pour dosage des protéines.....	16
Tableau 3 : Résultats de l'observation macroscopique et microscopique des isolats possédant une activité gélatinase positive.....	21
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des résultats de la caractérisation des protéases chez les différents isolats.....	37

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Distribution de ventes d'enzymes, la portion colorée indique le total de ventes des protéases (selon Rao <i>et al.</i> , 1998).....	03
Figure 2 : nombre d'isolat récupéré à partir de chaque échantillon.....	20
Figure 3 : Exemple de résultat gélatinase positive (Souche de référence <i>E.coli</i>).....	21
Figure 4 : Cinétique de l'hydrolyse de la caséine par les différents extraits bruts.....	23
Figure 5 : Effet de la température sur l'hydrolyse de la caséine par les différents extraits bruts.....	24
Figure 6 : Influence du pH sur la croissance bactérienne et sur l'activité protéolytique.....	27
Figure 7 : Effet du CaCl ₂ sur l'hydrolyse de la caséine par les différents extraits bruts.....	28
Figure 8 : Effet du traitement thermique sur la stabilité de l'enzyme.....	29
Figure 9 : Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme.....	31
Figure 10 : Effet du CaCl ₂ sur la stabilité de l'enzyme.....	33

***I**ntroduction générale*

L'Homme a toujours utilisé, et parfois sans le savoir, des réactions enzymatiques pour transformer des molécules. Les enzymes sont des protéines fonctionnelles dotées de propriétés catalytiques capables de transformer un substrat en un produit.

Les cellules animales, végétales et microbiennes contiennent des milliers de molécules enzymatiques différentes. Ces molécules peuvent être utilisées dans différents domaines industriels tels que les industries du cosmétique, de l'alimentaire, du pharmaceutique..etc.

Parmi ces enzymes, les protéases représentent un des plus larges groupes avec environ 50% à 60% du marché total des enzymes industrielles (Zeikus *et al.*, 1998 ; Rao *et al.*, 1998 ; Singh *et al.*, 2001; Nascimento et Martins, 2004).

Les protéases sont omniprésentes chez les différentes formes de vie (Rao *et al* 1998 ; Hamza, 2017), mais celles des microorganismes, et en particulier des bactéries, sont les plus significatives comparées aux protéases des animaux, des plantes et des autres microorganismes (Ward, 1985 ; Rao *et al.*, 1998; Bull *et al.*, 2000 ; Adsul *et al.*, 2007; Das et Prasad, 2010 ; Padmapriya *et al.*, 2012). En effet, ces enzymes bactériennes présentent une large spécificité de substrats, sont stables et résistantes aux conditions extrêmes nécessaires aux différents procédés industriels (Banerjee et Ray, 2017).

Pour cela l'objectif de notre travail est d'isoler des bactéries produisant des protéases avec des propriétés et des tolérances à des conditions extrêmes utilisées dans des processus industriels tels que la température et le pH. Ces tests ont été effectués sur des protéases d'extraits bruts d'une souche de référence *Escherichia coli* (*E.coli*) et de 5 isolats récupérés à partir du yaourt (IYT), de l'œuf (IOE), du sol (IS), de la rhizosphère (IRS) et de la cavité buccale d'un nourissant (ICB).

Les résultats obtenus montrent un fort potentiel d'utilisation industrielle des protéases de certains isolats qui possèdent des propriétés et des tolérances à des conditions utilisées dans des processus industriels.

Synthèse bibliographique

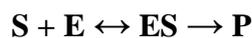
1. Les enzymes

Les enzymes sont des protéines fonctionnelles indispensables à la vie cellulaire. Selon le NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology), les enzymes sont classées en six classes, les Oxydoréductases (EC1), les Transférases (EC2), les Hydrolases (EC3), les Lyases (EC4), les Isomérases (EC5) et les Ligases (EC6).

Les cellules contiennent des milliers d'enzymes différentes qui sont impliquées dans divers processus tels que la régulation génique, la digestion, la transformation de substrat, production de molécules,...etc. (Terra *et al* 1996; Rao *et al*, 1998 ; Wolfenden et Snider, 2001; Boddey *et al.*, 2010).

Les enzymes sont dotées de propriétés catalytiques qui permettent d'augmenter la vitesse des réactions chimiques. En absence de catalyse enzymatique, les réactions biochimiques sont très lentes et nécessitent des conditions de température et de pression extrêmes incompatibles avec la vie cellulaire (Cooper, 2000).

Lors de la réaction catalytique les enzymes doivent se lier à leurs substrats au niveau d'un site spécifique qui se trouve sur l'enzyme appelé site actif ou site catalytique pour former un complexe enzyme-substrat. Ce complexe permet de convertir le substrat en un produit selon la réaction suivante:



Actuellement, les procédés industriels utilisent, préférablement, les méthodes enzymatiques que les méthodes chimiques (Hamza, 2017).

La Figure 1 montre la distribution des ventes des enzymes, on remarque que les hydrolases représentent la plus grandes part des ventes.

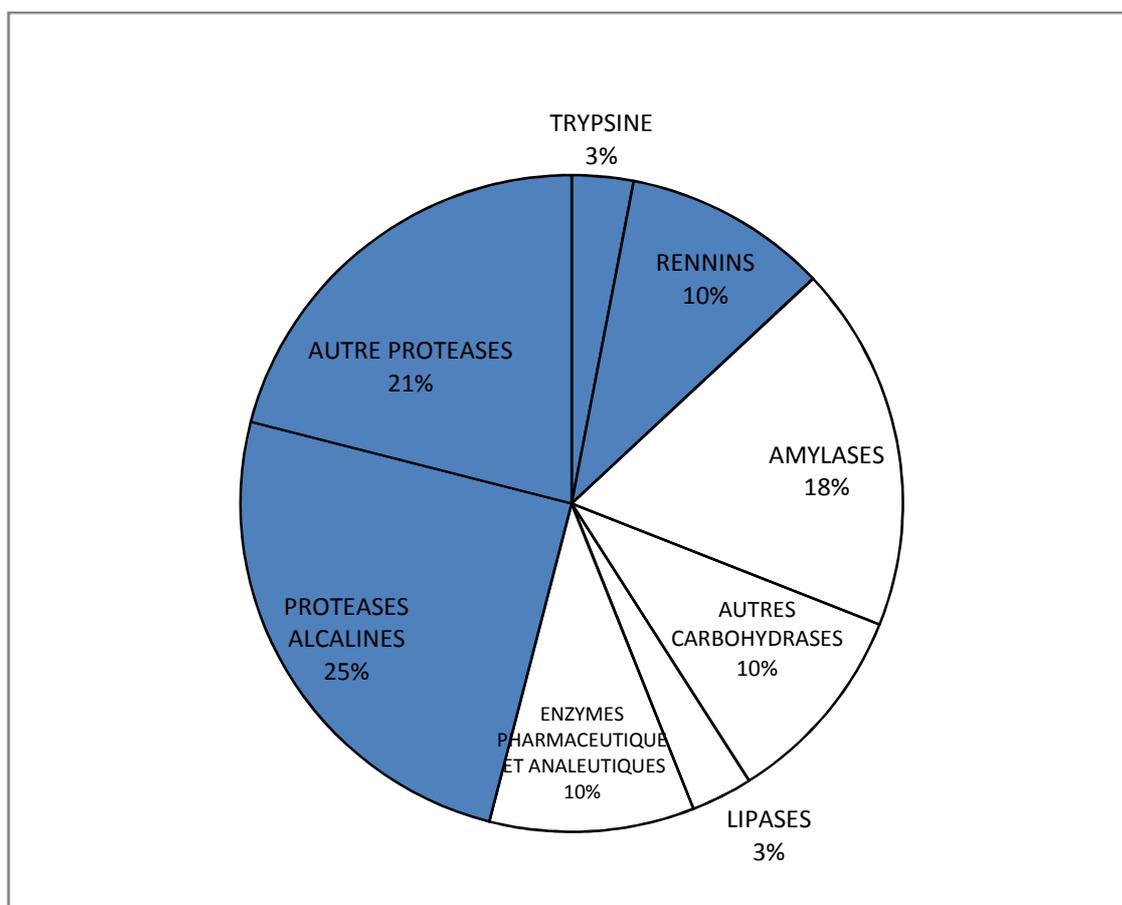
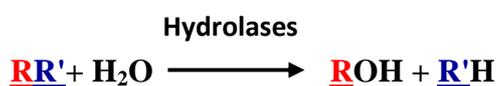


Figure 1 : Distribution de ventes d’enzymes, la portion colorée indique le total de ventes des protéases (selon Rao *et al.*, 1998).

2. Les hydrolases

Selon le NC-IUBMB, les hydrolases sont classées dans la troisième classe (EC3) des enzymes. Ces hydrolases, en présence d’une molécule d’eau, clivent les liaisons chimiques de différents substrats tels que les protéines, les lipides, les sucres, les esters (Gaber, 2012), selon la réaction générales suivante :



Ces hydrolases occupent une position pivot par rapport à leurs importances biologiques et industrielles (Rao *et al.*, 1998.) En effet, les hydrolases remplissent une grande variété de fonctions chez les différents organismes vivants telles que la croissance cellulaire, l’hydrolyse des substrats, la digestion, etc. (Rao *et al.*, 1998).

De plus, les hydrolases représentent 75% des enzymes industrielles (Rao *et al.*, 1998; Leisola *et al.* , 2001), ces hydrolases retrouvent leurs applications dans diverses industries

telles que les industries du cosmétique, de l'alimentaire, du pharmaceutique, du textile, du détergents... etc. (Maugard, 2003; Houde *et al.*, 2004 ; Balogh, 2004; Ribitscha *et al.*, 2010).

Parmi les hydrolases on peut citer les amylases, les galactosidases, les lipases et les protéases (Tokiwa et Suzuki, 1977 ; Santos *et al.*, 1998 ; Tester *et al.*, 2006 ; Tavano, 2013).

3. Les protéases

Les protéases, protéinases, peptidases ou enzymes protéolytiques sont des enzymes qui représentent un groupe très important des hydrolases.

Les enzymes protéolytiques appartiennent à la classe des hydrolases (EC3) et la sous classe des peptidases (EC3.4) (Souza *et al.*, 2014).

Ces enzymes catalysent le clivage des protéines par hydrolyse des liaisons peptidiques ce qui conduit à la production des acides aminés et des peptides (voir réaction suivante) (Rao *et al.*, 1998 ; Nascimento et Martins, 2004 ; Mitchell *et al.*, 2007 ; Oyeleke *et al.*, 2010 ; Fulzele *et al.* 2011 ; Ali et Ghulam Muhammad, 2017).



Chez les différents organismes vivants, les protéases jouent un rôle très important dans divers processus biologiques tels que la digestion, le catabolisme, la nutrition,...etc. (Rao *et al.*, 1998 ; Sikandar et Yasmeen, 2017). Chez l'être humain plus de 500 de ces enzymes ont été identifiées (Puente *et al.*, 2003 ; Hamza, 2017).

Au plan industriel les protéases représentent environ 50% à 60% du marché total des enzymes (Zeikus *et al.*, 1998 ; Rao *et al.*, 1998 ; Singh *et al.*, 2001; Nascimento et Martins, 2004) et elles sont utilisées dans diverses industries (voir partie importance des protéases).

3.1. Classification des protéases

Les protéases peuvent être classées, entre autres, selon la nature chimique de leurs sites actifs et selon leur site d'action (Rawling et Barrett, 1994; Kumar *et al.* , 1999 ; Nascimento, 2003).

3.1.1. Selon la nature chimique de leurs sites actifs

En fonction du groupement fonctionnel du site actif, les protéases sont classées en quatre groupes (Hartley, 1960 ; Souza et Martins, 2001 ; Nascimento et Martins, 2004).

3.1.1.1. Les protéases à Serine (EC. 3.4.21)

Ces protéases sont caractérisées par la présence d'un groupement serine au niveau de leur site actif, elles sont ubiquitaires et indispensables pour différents organismes. Chez l'être humain par exemple elles sont impliquées dans la digestion des aliments, la coagulation du sang, elles combattent les infections et aident les spermatozoïdes à pénétrer l'ovule. Elles aident aussi les bactéries à digérer les matériaux et les virus à infecter les cellules (ex : hépatite C) (Stroud, 1974 ; Rao *et al.*, 1998 ; Krem *et al.*, 2000 ; Ekici *et al.*, 2008).

3.1.1.2. Les protéases à Cystéine (EC 3.4.22)

Appelées aussi protéases à thiol, elles sont caractérisées par la présence d'un groupement cystéine au niveau de leur site actif, on les retrouve aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes.

Les protéases à Cystéine sont impliquées dans différentes réactions protéolytiques, comme par exemple celles impliquées dans les deux processus métaboliques (anabolisme et catabolisme), elles jouent également un rôle essentiel dans le développement et la maturation des plantes, et peuvent intervenir dans la signalisation et dans les réponses des plantes aux facteurs biotiques et abiotiques (Miller, 1997 ; Grudkowska et Zagdańska, 2004).

3.1.1.3. Les protéases aspartiques (EC 3.4.23)

Appelées aussi protéases acides, elles sont caractérisées par la présence d'un acide aspartique au niveau de leur site actif, elles sont ubiquitaires et peuvent être utilisées en industrie. Par exemple, protéase aspartique des espèces de champignons comme *Mucor pusillus* et *Mucor miehei*, possède la possibilité de coaguler le lait, ce qui permet de l'utiliser dans l'industrie du fromage (Andrade *et al.*, 2002).

3.1.1.4. Les métalloprotéases (EC 3.4.24)

Ces protéases sont caractérisées par leur besoin d'un ion métallique divalent pour leur activité (Rao *et al.*, 1998). Elles incluent diverses protéases provenant de différents organismes telles que les collagénases des organismes supérieurs, les toxines hémorragiques

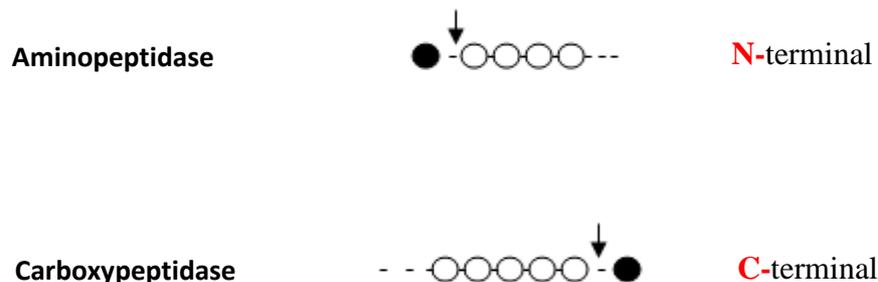
des venins de serpents et la thermolysine des bactéries (Weaver *et al.*, 1977 ; Okada *et al.*, 1986 ; Wilhelm *et al.*, 1987 ; Shannon *et al.*, 1989 ; Barrett, 1995).

3.1.2. Selon leurs sites d'action

Selon leurs sites d'action, les protéases peuvent être subdivisées en deux groupes principaux : les exopeptidases (EC 3.4.21-99) et les endopeptidases (EC 3.4.11-19) (Lopez et Bond, 2008 ; Mótyán *et al.*, 2013 ; Souza *et al.*, 2014).

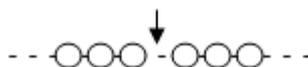
3.1.2.1. Les exopeptidases

Sont des peptidases qui clivent seulement les liaisons peptidiques se trouvant à proximité des extrémités amino-terminal (N-terminal) ou carboxyle-terminal (C-terminal) de la chaîne polypeptidique ou de la protéine (Hartley, 1960 ; Rao *et al.*, 1998). Basés sur leurs sites d'action N-terminal ou C-terminal, ces exopeptidases sont classées, respectivement, en Aminopeptidases et Carboxypeptidase (Rao *et al.*, 1998).



3.1.2.2. Les endopeptidases

Sont des peptidases qui clivent les liaisons peptidiques se trouvant à l'intérieur de la chaîne polypeptidique ou de la protéine (Hartley, 1960 ; Rao *et al.*, 1998).



Ces différents groupes de protéases se trouvent soit sous forme intracellulaire ou une forme extracellulaire (Völkel *et al.*, 1996). La forme intracellulaire jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme et hydrolyse les protéines qui se trouvent à l'intérieur des cellules (Rao *et al.*, 1998 ; Kumar *et al.*, 1999). La forme extracellulaire hydrolyse les grandes

molécules protéiques, à l'extérieur de la cellule, en molécules plus petites pour permettre ensuite leur absorption et leur utilisation par la cellule (Rao *et al.*, 1998 ; Kumar *et al.*, 1999).

3.2. Importance des protéases

Les protéases occupent une position pivot par rapport à leurs importances aussi bien au niveau cellulaire qu'au niveau industriel (Rao *et al.*, 1998).

3.2.1. Au niveau cellulaire

Les protéases sont omniprésentes, leur fonction physiologique est nécessaire pour tous les organismes vivants, ces enzymes sont importantes dans plusieurs processus (Rao *et al.* 1998 ; Mótyán *et al.*, 2013) tels que le catabolisme des protéines et la génération de petits peptides et des acides aminés. Elles régulent aussi l'activité de plusieurs protéines, créent de nouvelles molécules bioactives, contribuent aux processus d'information cellulaire, génèrent et amplifient les signaux moléculaire et participent dans la division cellulaire (Neurath et Walsh, 1976 ; Lopez-Otín et Bond, 2008). Comme mentionné précédemment (partie protéases à Serine), ces enzymes protéolytiques prennent place dans les processus anaboliques, jouent un rôle essentiel dans le développement et la maturation des plantes, et interviennent dans le signal et les réponses biotiques et abiotiques (Grudkowska et Zagdańska, 2004).

3.2.2. Au niveau industriel

Les protéases représentent un des plus larges groupes des enzymes industriels, avec environ 60% du total de ces enzymes vendues dans le monde (Rao *et al.*, 1998 ; Gupta *et al.*, 2002 ; Madhavi *et al.*, 2011 ; Hamza, 2017).

Avec les avancés récentes des biotechnologies, l'intérêt et la demande en enzymes avec de nouvelles propriétés ont augmenté en raison de leurs avantages économiques, écologiques et industriels (Banerjee et Ray, 2017). Pour cela, des efforts considérables ont été dirigés vers la sélection d'organismes produisant des enzymes avec de nouvelles propriétés physiologiques et des tolérances à des conditions extrêmes utilisées dans des processus industriels tels que la température, la salinité et le pH (Fulzele *et al.*, 2011 ; Umayaparvathi *et al.*, 2013).

Les protéases sont produites par plusieurs entreprise à travers le monde (Tableau 1) et peuvent trouver leur application dans diverses industries, notamment l'industrie

pharmaceutique et l'industrie des médicaments (Anisworth, 1994 ; Nascimento et Martins, 2004 ; Craik, *et al.*, 2011 ; Ghasemi *et al.*, 2011), dans l'industrie alimentaire, l'industrie des détergents, du textile, de tannerie (Rao *et al.*, 1998 ; Saha *et al.*, 2011 ; Younes *et al.*, 2011) et du traitement des déchets (Pastor *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Principales entreprises productrices de protéases (Rao *et al.*, 1998).

Producteurs (Entreprise)	Pays	Part du marché%
<i>Novo Industries</i>	Danemark	40
<i>Gist-Brocades</i>	Pays-Bas	20
<i>Genencor International</i>	Les Etats Unis	10
<i>Miles Laboratories</i>	Les Etats Unis	10
autres		20

3.3. Les différentes sources des protéases

Comme on l'a vu précédemment, les protéases sont physiologiquement importantes pour la vie des organismes, elles sont présentes dans toutes les formes de vie: plantes, animaux et microorganismes (Rao *et al.*, 1998 ; Hamza, 2017).

3.3.1. Les protéases d'origines végétales

Les protéases végétales les plus connues sont la bromélaïne, la ficine et la papaine extraites respectivement d'*Ananas comosus*, *Ficus carica* et *Carica papaya* (Singh *et al.*, 2016).

Les protéases des plantes sont utilisées dans diverses industries telle que l'industrie alimentaires et l'industrie pharmaceutique (Singh *et al.*, 2016).

Par contre, pour utiliser les plantes comme source de protéases il faut prendre en considération certains facteurs comme la disponibilité des terres et l'adéquation des conditions climatiques pour la culture végétale (Rao *et al.*, 1998 ; Singh *et al.*, 2016). De plus, la production des protéases à partir des plantes est un processus qui peut être long (Rao *et al.*, 1998).

3.3.2. Les protéases d'origines animales

Les protéases d'origine animale les plus connues sont la trypsine pancréatique, chymotrypsin, pepsine et chymosine (rennin) (Boyer, 1971 ; Hoffman, 1974 ; Rao *et al.*, 1998 ; Sawant et Nagendran, 2014). La production de protéases animales dépend de la

disponibilité des bétails pour l'abattage. (Devi *et al.*, 2008 ; Divakar *et al.*, 2006). Les protéases animales peuvent être appliquées au secteur médical et alimentaire (Rao *et al.*, 1998 ; Singh *et al.*, 2016).

3.3.3. Les protéases d'origines microbiennes

L'incapacité des protéases animales et végétales de répondre aux fortes demandes mondiales a augmenté l'intérêt porté aux protéases d'origine microbiennes (Rao *et al.*, 1998).

D'une façon générale, les microorganismes sont considérées comme une excellente source d'enzymes grâce à leur croissance rapide et grâce à leur capacité à être cultivés et manipulés génétiquement au laboratoire (Rao *et al.*, 1998).

Les protéases sont considérées comme l'une des enzymes les plus recherchées chez les microorganismes (Souza *et al.*, 2014). Ces protéases microbiennes ont trouvées leurs applications dans diverses industries telles que l'industrie des détergents, l'industrie du textile, l'industrie pharmaceutique et l'industrie boulangerie (Kumar et Takagi, 1999 ; Benmradi *et al.*, 2016).

Grâce à l'intérêt porté à ces protéases, des efforts considérables ont été effectués dans le but de rechercher et de trouver de nouveaux microorganismes producteurs de protéases appliquées au secteur industriel (Hamza., 2017).

3.3.3.1. Les champignons

Chez ces microorganismes producteurs de protéases, un nombre considérable d'espèces de champignons sont utilisées comme source de protéases alcaline, acide et neutre (Singh *et al.*, 2016). Parmi les genres de champignons utilisés pour produire les protéases on peut citer *Aspergillus*, *Humicola*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Thermomyces* (Wu *et al.*, 2006).

Les protéases des champignons retrouvent leurs applications dans divers secteurs tels que la boulangerie, la brasserie, les détergents, l'industrie du cuir et l'agroalimentaires (Haki et Rakshit, 2003; Halaouli *et al.*, 2005 ; Merheb *et al.*, 2007). Côté inconvénient, les protéases des champignons sont généralement intracellulaire et sont produites en quantités insuffisantes (Maheshwari *et al.*, 2000 ; Souza *et al.*, 2014), ce qui peut poser problème lors de leur récupération et purification.

3.3.3.2. Les Bactéries

Parmi les différentes protéases provenant des différents organismes, les protéases des bactéries sont les plus significatives comparées aux protéases des animaux, des plantes et des champignons (Ward, 1985 ; Rao *et al.*, 1998; Bull *et al.*, 2000 ; Adsul *et al.*, 2007; Das et Prasad, 2010 ; Padmapriya *et al.*, 2012).

Plusieurs études ont été effectuées sur des enzymes extracellulaires récupérés des différents organismes, mais celles obtenues à partir des bactéries sont très demandées (Banerjee et Ray, 2017). En effet, ces enzymes sont plus stables et plus actives que les enzymes d'autres organismes (Bull *et al.*, 2000) et possèdent des caractéristiques intéressantes pour des applications industrielles (Bull *et al.*, 2000 ; Umayaparvathi *et al.*, 2013), telle que le maintien d'activité même au froid (Kulakova *et al.*, 1999), la stabilité élevée aux températures extrêmes, au pH, à la salinité, aux solvants organiques, aux détergents et aux composés oxydants (Priest, 1977 ; Jacobs, 1995; Ito *et al.*, 1998; Kumar *et al.* 1998; Yang *et al.*, 2000 ; Contesini et al., 2017). De plus, les bactéries sont considérées comme les principales productrices d'enzymes extracellulaires (Jenssen *et al.*, 1994 ; Wellington et Meire, 2003).

Les protéases des bactéries représentent 40% du total du marché des enzymes (Godfrey et Swest, 1996). Les bactéries sont facilement cultivables et avec un coût réduit, leur croissance est rapide et peuvent être génétiquement manipulées (Adsul *et al.*, 2007; Das et Prasad, 2010 ; Umayaparvathi *et al.*, 2013). Leurs enzymes sont produites en quantité élevée, présentent une large spécificité de substrats, sont stables et résistantes aux conditions extrêmes nécessaires aux différents procédés industriels (Banerjee et Ray, 2017). En effet, les protéases de certaines bactéries possèdent une thermostabilité élevée (Umayaparvathi *et al.*, 2013). Cette thermostabilité est avantageuse dans les applications industrielles qui demandent des températures élevées pour accélérer les réactions (Sonnleitner et Fiechter, 1983 ; Rahman *et al.*, 1994 ; Adams et Kelly, 1998 ; Singh *et al.*, 2001).

Les différentes applications industrielles ont besoin d'une gamme variée de pH. Pour répondre à ce besoin, des protéases de bactéries peuvent être utilisées. En effet, les travaux ont montré que les protéases des bactéries peuvent avoir des optimums (Nascimento et Martins, 2004) d'activité à des pH acides (Zevaco *et al.*, 1974), des pH neutres (Desmazeaud et Hermier, 1968 ; Fulzele *et al.*, 2011) et des pH basiques (Horikoshi, 2014).

Certaines protéases présentent aussi une tolérance et une stabilité face aux solvants organiques et aux détergents (Ogino *et al.*, 1995 ; Sareen et Mishra, 2008). De plus, des

Synthèse bibliographique

manipulations génétiques ont été effectuées sur certaines bactéries comme le genre *Bacillus* afin d'obtenir des protéases plus actives, plus stables et mieux sécréter (Priest, 1977 ; Jacobs 1995 ; Ito *et al.*, 1998 ; Kumar *et al.*, 1998 ; Yang *et al.* 2000 ; Contesini , 2017).

***M**atériels et méthodes*

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie du Centre Universitaire Belhadj Bouchaib- Ain Temouchent (CUBBAT) entre le mois de Février et le mois de Mai 2019.

1. Préparation des milieux de culture

1.1. Préparation de la Gélose nutritive

Pour préparer la gélose nutritive (GN), 23g de la poudre de ce milieu (Conda Nutrient Agar) sont dissoutes dans 1L d'eau distillée.

1.2. Préparation du Bouillon nutritif

Pour préparer du Bouillon nutritif (BN), 8g de la poudre de ce milieu (Conda Nutrient Broth) sont dissoutes dans 1L d'eau distillée.

2. Isolement, purification et sélection des isolats bactériens producteurs des protéases extracellulaires

2.1. Isolement et purification

La recherche des isolats producteurs de protéases extracellulaires a été effectuée sur des bactéries isolées sur GN à partir de 5 échantillons : un sol vierge, une rhizosphère, un œuf, un yaourt et une cavité buccale d'un nourissant de 3 mois et d'un adulte. La purification des isolats est effectuée par des repiquages successifs de colonies sur GN.

La souche de référence *E.coli* (ATCC 25922), fournit par le Laboratoire de Chimie du Centre Universitaire Belhadj Bouchaib-Ain Temouchent (CUBBAT), a été aussi testé pour son activité protéolytique. En effet, des activités protéolytiques ont été étudiées et caractérisées chez *E.coli*. (Phizicky et Roberts, 1981 ; Lazdunski, 1989 ; Maurizi, 1992). Des différentes classes de protéases (les protéases à Sérine, les protéases Aspartique et les Métalloprotéases) ont été trouvée chez cette bactérie (Straus et al., 1987 ; Lehnerr et Yarmolinsky , 1995 ; Brunder *et al.*, 1997 ; Lathem et al., 2002).

2.1.1. Isolement des bactéries à partir du sol vierge et de la rhizosphère

Les deux échantillons du sol (sol vierge et rhizosphère) ont été prélevés d'un site situé au niveau du CUBBAT, la récolte de l'échantillon du sol est effectuée à environ 5 cm de profondeur. Les sols recueillis sont, ensuite, placés dans des boîte de Pétri stériles.

Dès l'arrivée au laboratoire, l'isolement des bactéries, est effectué selon la méthode décrite par Rappilly, (1968). Afin de faciliter l'isolement des bactéries, une série de dilution est effectuée à partir d'une solution mère.

Pour préparer la solution mère (dilution 10^0), 1g de chaque échantillon est mélangé avec 9 mL d'eau distillée stérile. Ensuite, une série de dilution allant de 10^{-1} à 10^{-3} est réalisée dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée stérile. 100 μ L de la dilution 10^{-3} sont étalés à la surface de la gélose nutritive.

Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 h. Les colonies obtenues sont ensuite purifiées.

2.1.2. Isolement des bactéries à partir du yaourt

L'isolement des bactéries a été réalisé à partir d'un pot de yaourt nature (la marque Soummam).

Afin de faciliter l'isolement des bactéries, la même technique, dilution-étalement (Kouomegne *et al.*, 1986 ; Gardan et Devaux, 1987), utilisée pour l'isolement à partir du sol a été réalisée.

Une série de dilution est effectuée à partir de la solution mère (dilution 10^0). Pour cela 1mL du yaourt est ajouté aseptiquement à 9 mL d'eau distillée stérile. Ensuite une série de dilution allant de 10^{-1} à 10^{-3} est réalisée dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée stérile. 100 μ L de la dilution 10^{-3} sont étalés à la surface de la gélose nutritive.

Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 h. Les colonies obtenues sont ensuite purifiées.

2.1.3. Isolement des bactéries à partir de l'œuf

Cet isolement est effectué à partir du blanc d'œuf du poulet. Afin de faciliter l'isolement des bactéries, la technique, dilution-étalement (Kouomegne *et al.*, 1986 ; Gardan et Devaux, 1987), a été utilisée pour l'isolement des bactéries à partir du blanc d'œuf du poulet.

1 mL du blanc d'œuf est prélevé aseptiquement par une seringue et mélangé avec 9 mL d'eau distillée stérile. À partir de cette solution mère une série de dilution allant de 10^{-1} à 10^{-3}

est réalisée dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée stérile. 100 µL de la dilution 10^{-3} sont étalés à la surface de la gélose nutritive.

Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 h. Les colonies obtenues sont ensuite purifiées.

2.1.4. Isolement des bactéries à partir de la cavité buccale

Les isolats ont été récupérés à partir de la cavité buccale d'un nourrisson de 3 mois et d'un adulte. Cet isolement est effectué en se basant sur la technique d'écouvillonnage (Doutre *et al.*, 1975 ; Agbo-Godeau et Guedj, 2005).

Pour cela, un écouvillon stérile est introduit, frotté et tourné à l'intérieur de la bouche. Une fois le prélèvement effectué, des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive sontensemencées par cet écouvillon. Les boîtes de Pétriensemencées sont ensuite incubées pendant 24h à température 37°C.

3. Vérification de la pureté des isolats

3.1. Observation macroscopique

Après isolement et purification des différents isolats sur Gélose Nutritive, une observation macroscopique permet de déterminer la couleur, la taille, la forme, la coupe et le contour des colonies ainsi que la pureté des isolats.

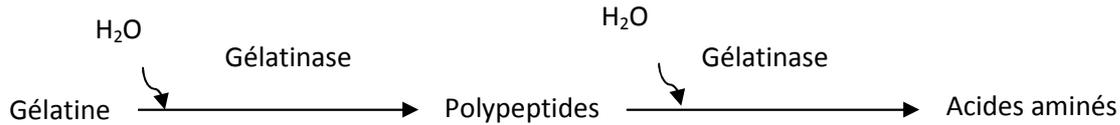
3.2. Observation microscopique

Après coloration de Gram, l'observation microscopique permet de déterminer le Gram, la morphologie et la pureté des isolats.

4. Criblage des isolats à protéases extracellulaires positives (gélatinase positive)

Ce test permet de faire le criblage entre les isolats protéases positifs et négatifs. Son principe se base sur la détection d'activité gélatinase. Les gélatinase sont des protéases extracellulaires secrétées par certaines bactéries et qui hydrolysent la gélatine (Leboffe et Pierce, 2010).

L'activité gélatinase dégrade la gélatine en polypeptides qui seront par la suite converti en acides aminés (Leboffe et Pierce, 2010)



L'hydrolyse de la gélatine est détectée par l'utilisation du Bouillon Nutritif gélatiné (Harley, 2005 ; Leboffe et Pierce, 2010). La gélatine sert à la fois comme agent solidifiant et un substrat pour l'activité gélatinase.

Afin de détecter l'activité gélatinase, le Bouillon Nutritif gélatiné à 15% seraensemencé avec 1 mL de pré-culture de chacun des isolats à tester et incubé à 30 °C (ou 37°C selon l'isolat), contre un blanc incubé dans les mêmes conditions sauf les 1 mL de la pré-culture qui seront remplacés par 1 mL du milieu BN stérile.

Si les isolats sont gélatinase positive, la gélatine sera hydrolysée par la gélatinase sécrétée et le milieu devient liquide (Leboffe et Pierce, 2010).

Lorsque le milieu gélatiné devient liquide, ceci peut être du à la température d'incubation (réaction réversible) ou bien à la dégradation de la gélatine (réaction irréversible).

Si le milieu gélatiné devient liquide sous l'influence de la température d'incubation, il sera capable de se re-solidifier lorsqu'il subira un traitement au froid à 4°C pendant 30 min. Par contre, si le milieu gélatiné devient liquide en raison de l'hydrolyse de la gélatine par l'activité gélatinase, il sera incapable de se re-solidifier et reste liquide lorsqu'il sera placé à 4°C pendant 30 min (Harley, 2005).

Le milieu gélatiné inoculé avec les isolats gélatinase négatives reste solide après le traitement froid (dela Cruz et Torres, 2012).

5. Récupération de l'extrait brut bactérien pour test de l'activité protéases +

Après criblage, des pré-cultures des isolats à protéases positifs sont préparées sur milieu BN (10 ml dans des tubes à essai) et incubées à 30 °C (ou 37°C selon l'isolat) pendant 24h.

Ensuite, les DO de ces pré-cultures sont mesurées à 600nm et des flacons contenant 50 mL de BN sontensemencés avec ces pré-cultures de sorte à avoir une DO_{initiale} à 600 nm de 0,01.

Après incubation, à 30 °C (ou 37°C selon l'isolat) pendant 24h les cultures sont centrifugées à 6000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est récupéré et conservé à 4 °C.

6. Dosage des protéines dans l'extrait brut des isolats à protéases +

La méthode utilisée dans ce travail pour le dosage des protéines totales, est une méthode qui a été développée par (Fujita, *et al.*, 1983 ; Watanabe *et al.*, 1986) pour la détermination des concentrations en protéines des liquides biologiques.

Il s'agit d'une méthode colorimétrique qui utilise le rouge de Pyrogallo et l'acide molybdique. Lorsque le complexe rouge de Pyrogallo-acide molybdique est combiné aux protéines, une coloration bleue-violette est obtenue.

L'absorbance à 598 nm est proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon.

Le milieu réactionnel est comme indiqué dans le Tableau 2 et selon les instructions du fabricant du Kit SPINREACT.

Tableau2 : Milieu réactionnel pour dosage des protéines

	Blanc	Etalon	Echantillon
R (ml)	1	1	1
Rouge de pyrogallol- Molybdate de Sodium			
Etalon (µl) Albumin/Globulin 1000 mg/mL	--	20	--
Echantillon (µl)	--	--	20

Le mélange est, ensuite, incubé pendant 5 min à 37°C ou bien 10 min à température ambiante puis les DO sont mesurées à 598 nm.

Une fois les différentes DO mesurées, les concentrations des protéines totales sont calculées selon les instructions du fabricant du Kit SPINREACT.

$$[(DO_{\text{Echantillon}} - DO_{\text{Blanc}}) / (DO_{\text{Etalon}} - DO_{\text{Blanc}})] \times 1000 = \text{mg/mL}$$

7. Caractérisation de l'activité protéolytique de l'extrait brut des isolats

L'activité protéolytique est mesurée en se basant sur le test caséinolytique (Dreyfus et Iglewski, 1986 ; Ramakrishna et Pandit, 1988; Jayaraman, 2003) avec quelques modifications.

Ce test permet de mesurer les acides aminés libérés suite à l'hydrolyse de la caséine par les protéases extracellulaires des extraits bruts. Le test de l'activité protéolytique a été effectué en un à plusieurs répliques techniques.

Ces tests ont été effectués par étude de l'influence du temps d'incubation, du pH, de la température et du CaCl₂ sur l'activité et la stabilité des protéases.

7.1. Influence du temps d'incubation sur l'activité protéolytique

Pour déterminer l'influence du temps sur l'activité protéolytique (Umayaparvathi *et al.*, 2013), le milieu réactionnel est incubé à 30 °C (pour les extraits bruts des isolats récupérés du sol, du Yaourt et de l'œuf) ou 37°C (pour les extraits bruts de la souche de référence d'*E. coli* et des isolats de la cavité buccale) à différent temps (0 min, 3min, 6min, 10min).

L'activité protéolytique est déterminée suivant la méthode de Kembhavi *et al.* (1993). Le milieu réactionnel est constitué de 0,5ml de tampon Phosphate à 0,2 M pH7, 0,25ml de solution caséine à 2% et 0,25 ml d'extrait brut.

Après incubation, la réaction est stoppée et les protéines non hydrolysées sont précipitées par ajout au milieu réactionnel de 1ml de TCA (TriChloroacetic Acid) à 10 %. Le mélange est placé à 4°C pendant 10 min puis centrifugé à 6000 rpm pendant 10min. Le surnageant est récupéré, sa DO est mesurée, contre un blanc, à 280nm dans des cuves en Quartz (Balachandran *et al.*, 2012 ; Umayaparvathi *et al.*, 2013).

7.2. Influence de la température sur l'activité protéolytique.

Pour déterminer l'effet de la température sur l'activité protéolytique, le milieu réactionnel (décrit précédemment) est incubé à différentes températures (4°C, 20°C, 30°C, 37°C et 45°C) (Nascimento et Martins, 2004 ; Fulzele *et al.*, 2011 ; Umayaparvathi *et al.*, 2013).

Le temps d'incubation optimal déterminé lors de l'étude de l'influence du temps sur l'activité protéolytique sera utilisé pour ce test.

Ensuite, la réaction est stoppée par ajout au milieu réactionnel de 1ml de TCA (TriChloroacetic Acid) à 10 %. Le mélange est placé à 4°C pendant 10 min puis centrifugé à 6000 rpm pendant 10min. Le surnageant est récupéré, sa DO est mesurée contre un blanc à 280nm dans des cuves en Quartz (Balachandran *et al.*, 2012).

7.3. Influence du pH sur la croissance bactérienne et sur l'activité protéolytique

L'influence du pH sur la croissance bactérienne a été testée sur 50 mL de BN inoculé avec une pré-culture de 24h à une DO_{600nm} initiale de 0,01. Après 24 h d'incubation, la DO_{600nm} de croissance, de chaque isolat, en fonction du pH est mesurée et comparée entre elles.

Pour déterminer l'influence du pH sur l'activité protéolytique, le tampon phosphate à 0,2 M et pH 7 (neutre) du milieu réactionnel (décrit précédemment) sera remplacé par un tampon phosphate à 0,2 M et pH 5 (acide) et du tampon glycine NaOH à 0,2 M et pH 9 (basique). Le temps d'incubation optimal déterminé lors de l'étude de l'influence du temps sur l'activité protéolytique sera utilisé pour ce test. La température d'incubation est de 30 °C (ou 37°C selon l'isolat).

Ensuite, la réaction est stoppée par ajout au milieu réactionnel de 1ml de TCA (TriChloroacetic Acid) à 10 %. Le mélange est placé à 4°C pendant 10 min puis centrifugé à 6000 rpm pendant 10min. Le surnageant est récupéré, sa DO est mesurée, contre un blanc, à 280nm dans des cuves en Quartz (Balachandran *et al.*, 2012).

7.4. Influence du $CaCl_2$ sur l'activité protéolytique

Pour déterminer l'effet du $CaCl_2$ sur l'activité protéolytique, le tampon phosphate pH 7 du milieu réactionnel décrit précédemment est remplacé par le tampon phosphate pH 7 additionné de 1% de $CaCl_2$ ce qui donne une concentration finale de $CaCl_2$ dans le milieu réactionnel de 0,5%.

Le milieu réactionnel est ensuite incubé à 30 °C (ou 37°C selon l'isolat) et le temps d'incubation optimal déterminé lors de l'étude de l'influence du temps sur l'activité protéolytique sera utilisé pour ce test.

Ensuite, la réaction est stoppée par ajout au milieu réactionnel de 1ml de TCA (TriChloroacetic Acid) à 10 %. Le mélange est placé à 4°C pendant 10 min puis centrifugé à 6000 rpm pendant 10min. Le surnageant est récupéré, sa DO est mesurée contre un blanc à 280nm dans des cuves en Quartz (Balachandran *et al.*, 2012).

8. Effet de différents traitements, thermique, pH et CaCl₂ sur la stabilité de l'enzyme

8.1. Effet du traitement thermique sur la stabilité de l'enzyme

La thermostabilité de l'enzyme est déterminée par incubation, dans un bain-marie, des extraits bruts à 90°C pendant 2h (Padmapriya *et al.*, 2012). Après traitement thermique, l'activité résiduelle de l'enzyme est mesurée en suivant le protocole standard utilisé précédemment pour tester l'activité protéolytique, sauf que l'extrait brut non-traité est remplacé par l'extrait brut traité.

8.2. Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme

L'effet du pH sur la stabilité de l'enzyme est testée par pré-incubation des extraits bruts, sans substrat, dans un tampon à pH 5, pH 7 et pH 9 pendant 2 h à température ambiante (Frankenberger et Johanson, 2002). Après traitement au pH, l'activité résiduelle de l'enzyme est mesurée en suivant le protocole standard utilisé précédemment pour tester l'activité protéolytique, sauf que l'extrait brut non-traité est remplacé par l'extrait brut traité.

8.3. Effet du CaCl₂ sur la stabilité de l'enzyme

L'effet du CaCl₂ sur la stabilité de l'enzyme (Liao et McCallus, 1998) est testé par pré-incubation des extraits bruts dans un tampon à pH 7 additionné de 1% de CaCl₂, pendant 2 h à température ambiante. Après traitement au CaCl₂, l'activité résiduelle de l'enzyme est mesurée en suivant le protocole standard utilisé précédemment pour tester l'activité protéolytique, sauf que l'extrait brut non-traité est remplacé par l'extrait brut traité.

Résultats et discussion

1. Isolement des bactéries à partir des échantillons

Pour rechercher des isolats présentant une activité protéolytique extracellulaire positive, des isolations de bactéries ont été effectués à partir d'un sol vierge, d'une rhizosphère, d'un œuf, d'un yaourt et à partir d'une cavité buccale d'un nourissant de 3 mois et d'un adulte.

La Figure 2 montre le nombre d'isolat récupéré à partir de chaque échantillon.

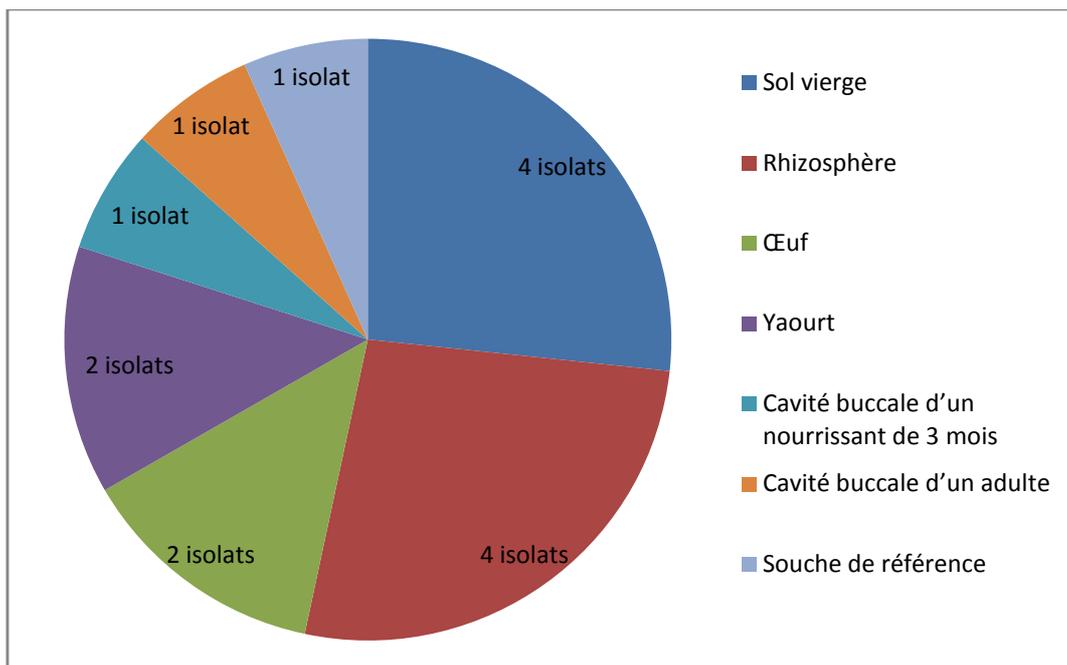


Figure 2: nombre d'isolat récupéré à partir de chaque échantillon (les nombres à l'intérieur de chaque portion indiquent le nombre d'isolats récupérés de chaque échantillon).

2. Vérification de la pureté des souches

L'observation des colonies sur Gélose Nutritive (GN) après incubation confirme la pureté des isolats : les colonies présentent un aspect, une couleur, une taille, une forme, une coupe et un contour homogènes. L'examen au microscope optique après coloration de Gram confirme aussi la pureté des isolats et révèle un aspect homogène pour toutes les cellules.

3. Criblage des isolats à protéases extracellulaires positives (gélatinase positive)

Sur les isolats récupérés des différents échantillons (un sol vierge, une rhizosphère, un œuf, un yaourt et une cavité buccale d'un nourissant de 3 mois et d'un adulte), le test de

Résultats et discussion

recherche d'activité protéolytique extracellulaire sur le Bouillon gélatiné a révélé la présence de 5 isolats possédant une activité protéases extracellulaires positives (gélatinase positive).

La souche de Référence *E. coli* a révélée aussi un résultat positif pour ce test (Figure 3).



Le milieu devient liquide après hydrolyse de la gélatine.

Figure 3 : Exemple de résultat gélatinase positive (Souche de référence *E.coli*).

Le tableau 3 regroupe les isolats possédant une activité gélatinase positive ainsi que leurs caractéristiques microscopiques et macroscopiques.

Tableau 3 : Résultats de l'observation macroscopique et microscopique des isolats possédant une activité gélatinase positive.

Isolats	Observation macroscopique					Observation microscopique	
	Couleur	Taille	Forme	Coupe	Contour	Gram	Forme
<i>(E.coli)</i>	Beige	Moyenne	Ronde	Bombée	Régulier	Négatif	Bacille
Sol (IS)	Blanchâtre	Petite	Ronde	Bombée	Régulier	Négatif	Coccobacille
Rhizosphère (IRS)	Blanchâtre	Moyenne	Ronde	Bombée	Régulier	Négatif	Coccobacille
Œuf (IOE)	Blanchâtre	Petite	Ronde	Bombée	Régulier	Négatif	Cocci
Yaourt (IYT)	Blanchâtre	Grande	Ronde	Bombée	Régulier	Négatif	Diplocoque
Cavité buccale (ICB)	Blanchâtre	Moyenne	Ronde	Bombée	Régulier	Négatif	Coccobacille

Ces isolats sont retenus pour la caractérisation de leur activité protéolytique.

4. Etude de l'activité protéolytique des extraits bruts

Les extraits bruts de la souche de référence et des différents isolats ont été récupérés à partir de culture présentant une DO_{600nm} de 0,4 à 0,5. Ces extraits ont été testés pour leur capacité à hydrolyser la caséine en fonction du temps, du pH et de la température.

La capacité à hydrolyser la caséine est mesurée en se basant sur le test caséinolytique (Dreyfus et Iglewski, 1986 ; Ramakrishna et Pandit, 1988; Jayaraman, 2007) avec quelques modifications.

Ce test permet de mesurer les acides aminés libérés suite à l'hydrolyse de la caséine par les protéases extracellulaires des extraits bruts.

Le milieu réactionnel est constitué de 0,5ml de tampon Phosphate à 0,2 M pH7, 0,25ml de solution caséine à 2% et 0,25 ml d'extrait brut.

Un dosage de protéines a été effectué et les extraits bruts ont été dilués pour rendre leur concentration en protéine égale à 0,5 mg/mL.

4.1. Influence de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique

L'influence du temps d'incubation sur l'activité protéolytique des différents isolats, a été testée dans un intervalle de temps de 3 à 10 min.

L'extrait brut de la souche de référence *E. coli*, présente la meilleure activité suivi de l'extrait brut de l'isolat récupéré à partir de l'œuf (IOE). Ensuite, viennent respectivement, les extraits bruts des isolats de la cavité buccale (ICB), du yaourt (IYT), de la rhizosphère (IRS) et du sol vierge (IS) (Figure 4).

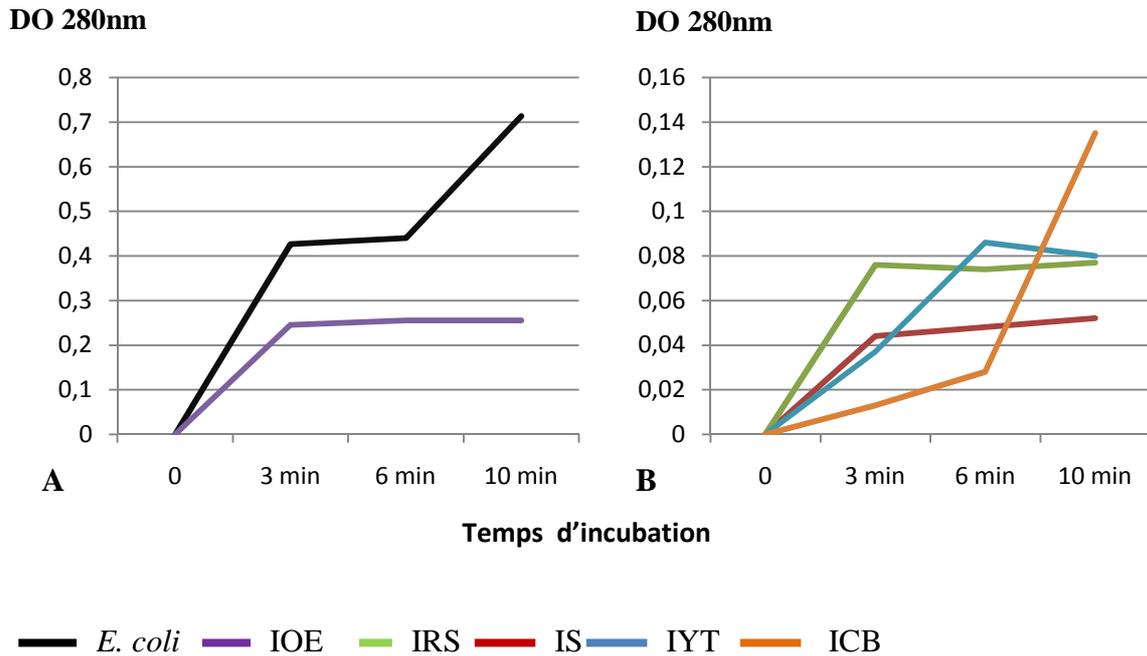


Figure 4 : Cinétique de l'hydrolyse de la caséine par les différents extraits bruts. (A) : Hydrolyse de la caséine par les extraits bruts des isolats IS, IRS, IYT et ICB. (B) : Hydrolyse de la caséine par les extraits bruts des isolats IOE et *E.coli*.

Selon la cinétique de l'activité protéolytique sur la caséine :

- Les extraits bruts des isolats récupérés à partir du sol vierge, de la rhizosphère et de l'œuf présentent un maximum d'activité protéolytique après 3 minutes d'incubation.
- L'extrait brut de l'isolat récupéré à partir du yaourt présente un maximum d'activité protéolytique après 6 minutes d'incubation.
- Les extraits bruts de la souche de référence *E. coli* et de l'isolat de la cavité buccale présentent un maximum d'activité protéolytique après 10 minutes d'incubation comparé au temps 3 min et 6 min.

Les résultats de ce test montrent que l'extrait brut d'*E.coli* est le plus performant pour l'hydrolyse de la caséine suivi directement de l'extrait de l'isolat IOE (Figure 4A). Des activités d'hydrolyse de la caséine plus au moins importantes ont été détectées, par ordre décroissant d'importance, chez les extraits des autres isolats ICB, IYT, IRS, IS (Figure 4B). → Le temps d'incubation de 10 minutes a été retenu pour les différents tests de caractérisation de l'activité protéolytique des extraits bruts des différents isolats.

4.2. Influence de la température sur l'activité protéolytique

L'influence de la température sur l'activité protéolytique des différents isolats, a été testée en incubant le milieu réactionnel, pendant 10 minutes à différentes températures de 4 °C, 20 °C, 30 (37°C) et 45°C.

Les extraits bruts des différents isolats présentent une activité protéolytique relativement faible à 4°C, et les extraits des isolats IRS et ICB présentent une activité relativement faible à 45°C comparée aux autres températures testées (Figure 5). La température de 4°C est généralement utilisée pour stocker les protéines pour ralentir et voir même pour prévenir toute activité enzymatique. Ce qui explique la faible activité protéolytique des différents extraits bruts.

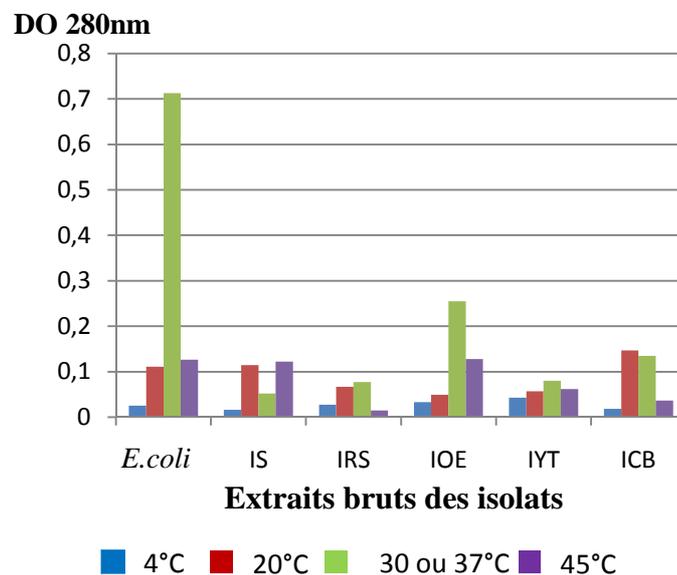


Figure 5 : Effet de la température sur l'hydrolyse de la caséine par les différents extraits bruts.

Pour les extraits bruts des différents isolats, on remarque que la température optimale de l'activité protéolytique est identique à la température potentielle de croissance bactérienne *E.coli*, ICB (37°C), IRS, IOE, IYT (30°C) (Figure 5). Des résultats similaires ont été trouvés chez *E.coli*, c'est-à-dire une protéase active entre 30°C et 40°C et un optimum de croissance de 37°C (Baehaki *et al.*, 2015) et chez *Yersinia ruckeri* une protéase active à 37°C et un optimum de croissance de 37°C (Secades et Guijarro, 1999).

L'extrait de l'isolat IS présente une température optimale (20 et 45°C) d'activité protéolytique différente de la température optimale de croissance bactérienne (30°C) (Figure 5).

Des protéases extracellulaires avec des activités optimales à 45 °C (différente de la température optimale de croissance) ont été déjà étudiées chez *Pseudomonas cepacia* (Mckevitt *et al.*, 1989) et chez *Bacillus horikoshii* (Joo *et al.*, 2002). Ces protéases thermoactives avec des optimums d'activités de 45°C peuvent être utilisées dans les industries des lessives et des détergents, comme c'est le cas de la protéase récupérées de *Bacillus* sp (Singh *et al.*, 2001).

A la température de 20 °C, les extraits bruts des isolats IS, ICB présentent leur optimum d'activité protéolytique et les extraits bruts des isolats IRS, IYT présentent, à cette température, une activité protéolytique proche de l'optimum (Figure 5). Ceci a été démontré pour les protéases de *Stenotrophomonas maltophilia*, utilisées en industries et qui sont actives à 20°C (Kuddus et Ramteke, 2011).

4.3. Influence du pH sur la croissance bactérienne et sur l'activité protéolytique

L'influence du pH sur l'activité protéolytique ainsi que sur la croissance des différents isolats, a été testée à pH acide (pH 5), pH neutre (pH 7) et pH basique (pH 9).

Les protéases sont classées en 3 groupes selon l'influence du pH sur leur activité en protéases acides, protéases neutres ou protéases alcalines.

L'étude de l'influence du pH sur l'activité d'hydrolyse de la caséine a révélée les résultats suivants (Figure 6B) :

Les différents extraits bruts présentent une activité protéolytique à pH 7. Des protéases à pH neutre sont importantes pour les industries alimentaires (Sandhya *et al.*, 2005 ; Ahmetoglu *et al.*, 2015), les industries pharmaceutiques et l'industrie du textile (Sumantha *et al.*, 2006 ; Bhaskar *et al.*, 2007).

A pH 5, l'extrait brut de l'isolat IYT présente presque une activité protéolytique nulle. Le pH 5 semble influencer l'activité protéolytique de cet extrait brut.

A pH 9, l'extrait brut de l'isolat IOE présente presque une activité protéolytique nulle. Le pH 9 semble influencer l'activité protéolytique de cet extrait brut.

Les extraits bruts récupérés à partir de l'isolat IOE, de l'isolat ICB et de la souche de référence *E. coli* présentent une plus forte activité à pH 7 qu'au pH 5 et pH 9. Des travaux ont démontré l'existence, chez des bactéries, des protéases à pH neutre comme par exemple les

protéases d'*E. coli* (Baehaki *et al.*, 2015), les protéases extracellulaires de *Legionella pneumophila* (Dreyfus et Iglewski, 1986) de *Clostridium bifermentans* (Macfarlane, 1992), de *Bacillus stearothermophilus* (Sookkheo *et al.* 2000) et de *Bacillus* sp (Ahmetoglu *et al.*, 2015).

Les extraits bruts récupérés à partir de l'isolat IS présentent une plus forte activité à pH 5 qu'au pH 7 et pH 9. Des protéases avec un optimum d'activité à pH acide ont été trouvées chez les bactéries *Lactobacillus helveticus* (pH optimum égal à 5,5) (Hutkins et Nannen, 1993) et *Bacillus acidocaldarius* (pH optimum de 2 à 6) (Darland et Brock, 1971). L'existence d'une protéase avec un optimum d'activité à pH acide (pH4) a été aussi démontrée chez la levure *Candida albicans* (Germaine et Tellefson, 1981). Ces protéases acides peuvent trouver leur application dans les industries de détergents (Ammar et Aggad., 2018) et les industries alimentaires (Leroy et De Vuyst, 2004), comme par exemple en fromagerie (Cerning, 1987).

Les extraits bruts récupérés à partir de l'isolat IRS présentent une plus forte activité à pH 9 qu'au pH 5 et pH 7. Des travaux ont démontré l'existence, chez des bactéries, de protéases à pH alcalin comme celles de *Alcaligenes faecalis* (Thangam et Rajkumar, 2002), de *Bacillus horikoshii* (Joo *et al.*, 2002) et de *Bacillus licheniformis* (Yilmaz *et al.*, 2015) qui ont un optimum d'activité à pH 9. Les protéases alcalines sont très demandées dans plusieurs industries (Rao *et al.*, 2017), telles que l'industrie des détergents, de la tannerie, de la pharmacie, du cosmétique, du cuir, de la soie et des aliments (Kembhavi *et al.*, 1993 ; Gessesse, 1997 ; Kumar et Takagi., 1999 ; Kumar et Tiwari., 1999 ; Gupta *et al.*, 2002 ; Srinivasan *et al.*, 2009 ; khan *et al.* ., 2011).

Les différents pH testés, ne semblent pas influencer l'activité protéolytique de l'extrait brut récupéré de l'isolat IRS. De même, les études de Bao *et al.*, (2008), ont montré que l'activité protéolytique des espèces *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, et *Prevotella nigrescens* n'est pas influencée par des pH différents. Aussi, les études de Kaminogawa *et al.*, (1972) ont démontré que pour les protéases se trouvant dans le lait, les pHs optimums peuvent être à la fois proches d'un pH neutre et d'un pH basique (entre 7,5 et 8,5).

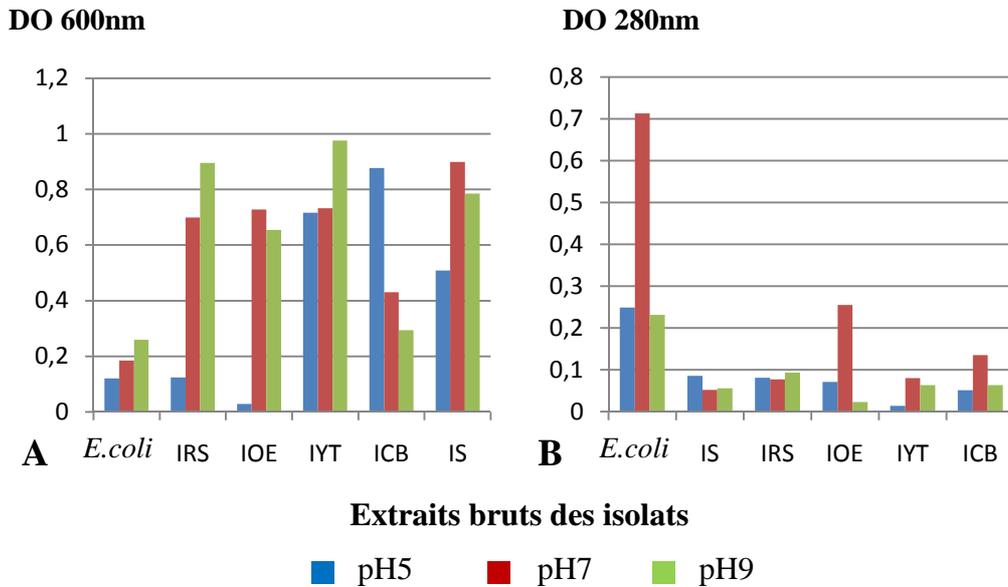


Figure 6 : Influence du pH sur la croissance bactérienne et sur l'activité protéolytique. (A) : Effet du pH sur la croissance des différents extraits bruts. (B) : Effet du pH sur l'hydrolyse de la caséine par les différents extraits bruts.

Afin de trouver un lien entre le pH optimal de croissance et le pH optimal de l'activité protéolytique des différents extraits, l'influence du pH sur la croissance des différents isolats (Figure 6 B) a été testée ensuite comparée avec l'influence du pH sur l'activité protéolytique.

Le pH5 semble influencer à la fois la croissance de l'isolat IOE et de la souche de référence *E.coli* et leur activité protéolytique (Figure 6 A et B). L'isolat IOE présente une meilleure croissance et une meilleure activité à pH7.

Pour les deux isolats IS et IRS, le pH 5 influence leur croissance mais pas l'activité protéolytique de leur extrait brut. Ses deux isolats présentent une croissance et une activité protéolytique normale à pH7. Pour l'isolat IRS, son optimum de croissance et d'activité protéolytique est situé à pH9.

Le pH5 est le pH optimal de croissance pour l'isolat ICB alors que ce pH5 affecte l'activité protéolytique de l'extrait brut de cet isolat.

Le pH5 ne semble pas affecter la croissance de l'isolat IYT alors qu'il affecte sévèrement l'activité protéolytique de son extrait.

4.4. Influence du CaCl₂ sur l'activité protéolytique

L'influence du CaCl₂ sur l'activité protéolytique des différents isolats est testée par addition au milieu réactionnel du CaCl₂ à une concentration finale de 0,5%.

Le résultat de ce test (Figure 7), montre que l'activité protéolytique des différents extraits bruts diminue en présence du CaCl₂.

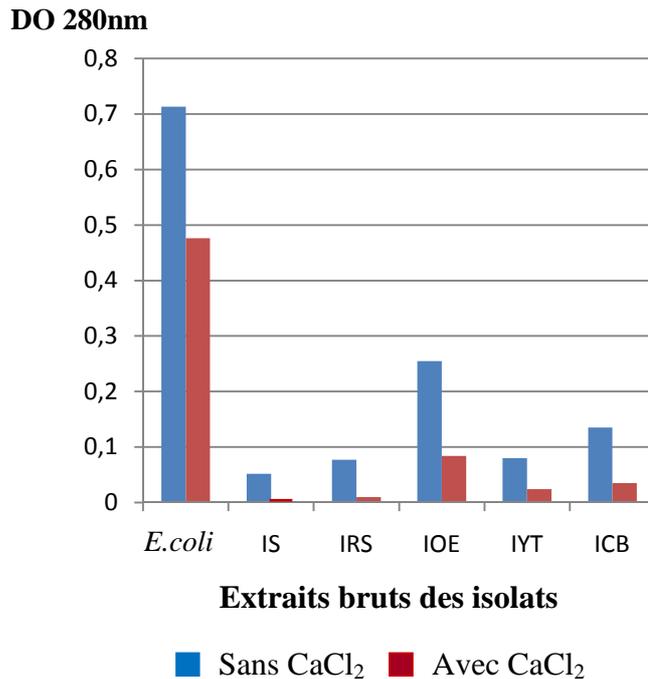


Figure7 : Effet du CaCl₂ sur l'hydrolyse de la caséine par les différents extraits bruts.

L'activité protéolytique de l'extrait brut de la souche de référence *E.coli* est la moins affectée par la présence du CaCl₂ comparé aux extraits bruts des autres isolats.

Les activités protéolytiques des extraits bruts des isolats du sol (IS et ISR) sont les plus affectées par la présence du CaCl₂ comparé aux extraits bruts des autres isolats. L'activité protéolytique de l'extrait brut IS est nulle en présence du CaCl₂.

L'activité protéolytique des extraits bruts des isolats IOE, IYT et ICB, présentent une activité protéolytique, en présence du CaCl₂, 3 fois inférieure qu'en absence du CaCl₂.

L'influence du CaCl₂ sur l'activité des enzymes a été étudiée. Les travaux de küttemeyer *et al.* (2005) ont montrée que les transglutaminases d'origine microbienne présentent une diminution de leur activité en présence du CaCl₂.

5. Etude de la stabilité des protéases des extraits bruts

5.1. Effet du traitement thermique sur la stabilité de l'enzyme

La thermo-stabilité des protéases a été testée en mesurant l'activité résiduelle des extraits bruts des différents isolats après leur traitement de 2h à 90° C.

Il a été démontré que le traitement thermique altère la structure des protéines et affecte l'activité des enzymes (Zale et Klibanov, 1986 ; Adams, 1991 ; Dubey *et al.*, 2010 ; Perdana *et al.*, 2012). Notre objectif est de tester l'influence d'un traitement thermique sur la stabilité et l'activité des protéases de nos extraits bruts (Figure 8).

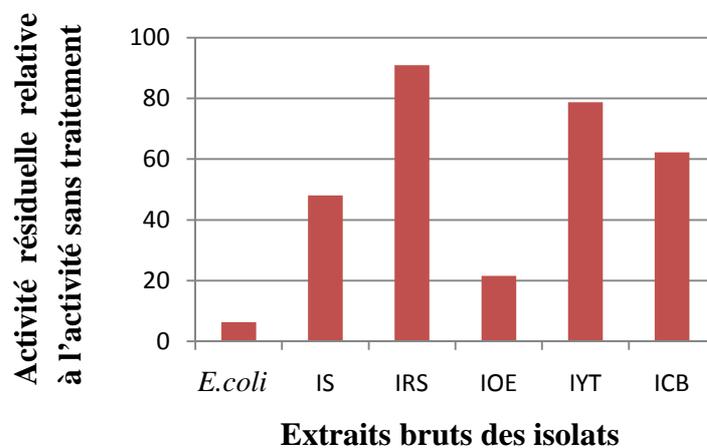


Figure 8: Effet du traitement thermique sur la stabilité de l'enzyme

D'après les résultats obtenus (Figure 8), les protéases extracellulaires des isolats IRS et IYT semblent être plus stable au traitement à 90° C comparé aux extraits bruts des autres isolats. En effet, l'activité résiduelle d'hydrolyse de la caséine est de 90,90% pour l'extrait de l'isolat IRS et de 78,75% pour l'extrait de l'isolat IYT. Ces deux protéases sont considérées comme des protéases thermostables, du fait que des protéases utilisées en industrie telles que celles de *Pseudomonas aeruginosa* ne retiennent que 85% de leurs activités après 1h de traitement à 65°C (Lu et chang, 1996) et les protéases de *Aspergillus niger* ne retiennent que 48,4% de leur activité initiale après traitement à 90 ° C pendant 15 min (Dubey *et al.*, 2010), alors que celle de l'extrait brut de l'isolat IRS retient 90,90% de son activité après 2 h de traitement à 90°C et celle de l'extrait de l'isolat IYT retient plus de 78% de son activité.

L'activité résiduelle de l'extrait brut de la souche *E.coli* est la plus sévèrement affectée après traitement thermique, suivi de l'extrait de l'isolat IOE. En effet, ces deux extraits ne retiennent, respectivement, que 6,31% et 21,56% de leur activité d'hydrolyse de la caséine

après traitement. Un résultat presque similaire a été trouvé pour la protéase *Bacillus* sp. En effet, après traitement thermique de 2 h à 80°C, la protéase de cette bactérie n'a retenu que 16% de son activité (Nascimento et Martins, 2004).

Les extraits bruts des isolats IS et ICB sont plus ou moins thermostables, ces deux extraits ont retenus, respectivement, 48,07% et 62,22% de leur activité après traitement thermique à 90°C. ce résultat montre que les protéases de ces deux extraits sont moins stables que ceux des extraits des isolats IRS et IYT, par contre, elles peuvent être considérées comme plus stables (surtout celle de l'extrait de l'isolat ICB) que la protéases de *Penicillium duponti* qui ne retient que 65% de son activité après traitement d'une heure à 70°C (Hashimoto *et al.*, 1973), alors que la protéase de l'isolat ICB retient plus de 62% de son activité après 2h de traitement à 90°C.

L'intérêt pour les enzymes thermostables a augmenté du fait que la plupart des processus industriels utilisant des enzymes nécessitent des températures élevées (Fulzele *et al.*, 2011). De plus, les enzymes thermostables présentent plusieurs avantages telles que la vitesse de réaction élevée, la diminution des risques de contamination et la durée de vie plus longue de ces enzymes thermostables (Silva *et al.*, 2007). Les principales applications des enzymes thermostables sont dans les industries alimentaires et les industries de détergents (Zamost *et al.*, 1991).

5.2.Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme

L'influence du pH sur la stabilité des protéases a été testée par pré-incubation des extraits bruts pendant 2h dans des tampons à pH 5, 7, 9 à température ambiante. Ensuite, l'activité résiduelle d'hydrolyse de la caséine a été testée (Figure 9).

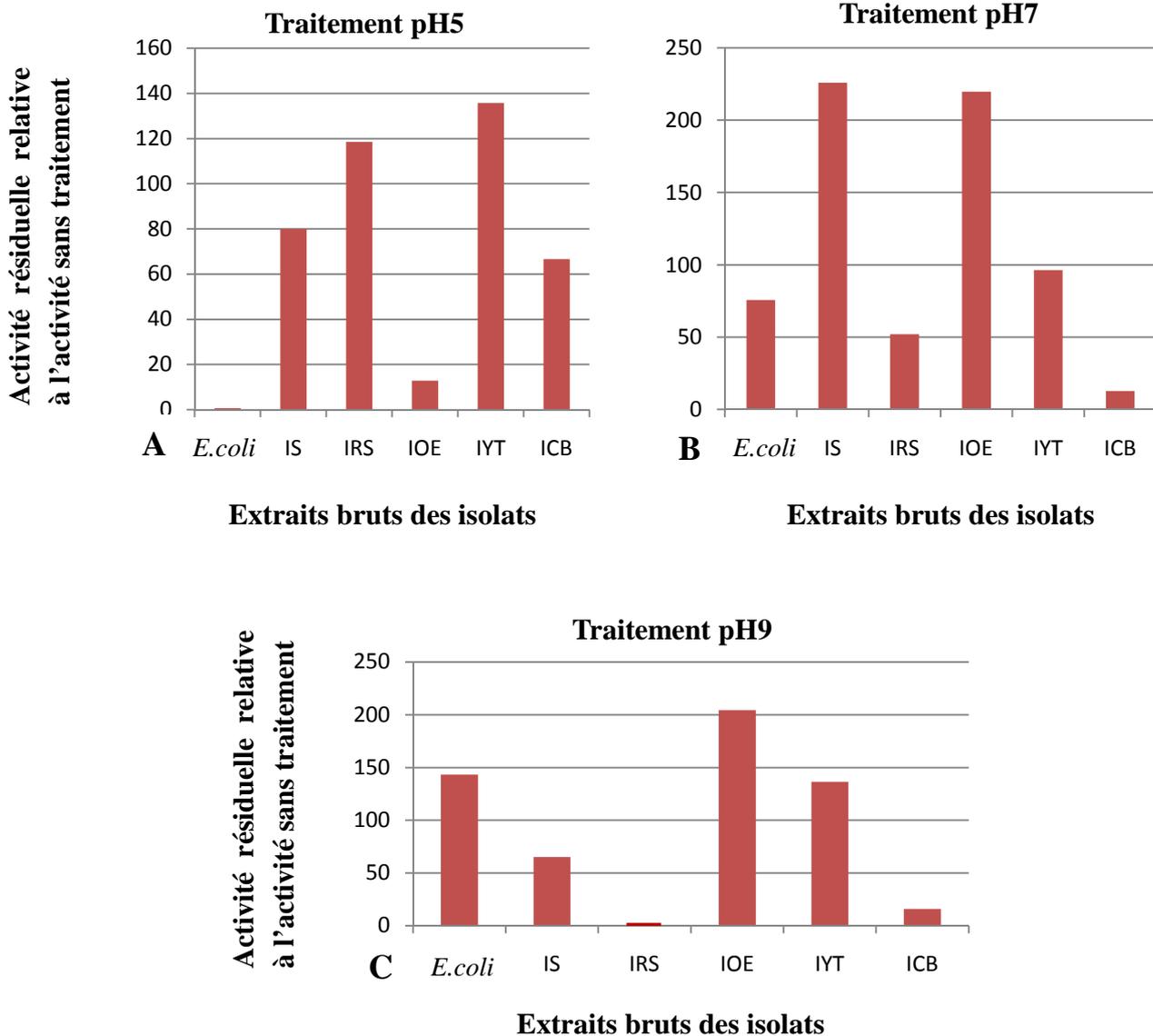


Figure 9 : Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme. (A) : Effet du pH5 sur la stabilité de l'enzyme (B) : effet du pH7 sur la stabilité de l'enzyme (C) : Effet du pH9 sur la stabilité de l'enzyme.

Comme c'est le cas pour le traitement thermique, les traitements acide ou basique peuvent altérer la structure des protéines et jouer sur la stabilité des enzymes (Kundu *et al.*, 1999).

L'activité protéolytique des extraits bruts des isolats IOE et *E.coli* sont sévèrement affectés par le traitement avec un tampon à pH5. En effet, après ce traitement, les extraits bruts de ces deux isolats ne retiennent, respectivement, que 12,81% et 0,67% d'activité protéolytique (Figure 9A). Des travaux effectués sur des protéases de *Bacillus* sp ont montré aussi que le traitement au pH 5,5 diminue l'activité de cet enzyme (Nascimento, 2003).

Par contre, le traitement avec un tampon à pH 9 ne semble pas affecter la stabilité des protéases de ces deux isolats, bien au contraire, ce traitement améliore leur activité protéolytique. En effet, l'activité protéolytique des extraits bruts des isolats IOE et *E.coli*, augmente, respectivement, de 104,34% et 43,29% après traitement avec un tampon à pH 9 (Figure 9 C). Cette augmentation peut être due à une modification de la structure de l'enzyme pour rendre son activité plus efficace.

Les protéases des isolats IOE et *E.coli* sont considérées, donc, comme protéases stables au pH alcalin. En effet, Fulzele *et al.*, (2011) a considéré la protéase extracellulaire de *Marinobacter* sp comme possédant une stabilité raisonnable au pH alcalin, alors qu'elle n'a retenu que 50% de son activité après 1h de traitement à pH9.

Le traitement avec un tampon à pH 7 améliore de 119,6% l'activité protéolytique de l'extrait brut de l'isolat IOE, ce qui n'est pas le cas pour l'extrait brut de la souche *E.coli*, où son activité protéolytique diminue de 24,34% après traitement avec un tampon à pH7 (Figure 9B). Cette différence de stabilité vis-à-vis le traitement avec un pH neutre a été démontré. En effet, les protéases de *Penicillium caseicolum* présentent une stabilité face à un traitement à pH7 (90% d'activité résiduelle) (Lenoir et Bisson, 1977), alors que les protéases de *Bacillus pumilus* perdent 41% de leur activité après ce traitement (Gomaa, 2013).

Le traitement de l'extrait brut d'isolat IYT avec un tampon à pH 7 ne modifie pas l'activité protéolytique de cet extrait. Le traitement de cet extrait avec un tampon à pH 5 ou pH 9 améliore son activité protéolytique, respectivement, de 35,7 % et de 36,5%. (Figures 9 A, B et C). Ce qui nous permet de les considérer comme des protéases extrêmement stables aux pH acide et pH alcalin. Des enzymes actives en conditions acides et alcaline indiquent un fort potentiel d'utilisation de ces enzymes, respectivement, en industries alimentaires (Leroy et De Vuyst, 2004) et en industries des détergents (Cowan et Daniel, 1982 ; Towatana *et al.*, 1999).

Pour l'extrait brut de l'isolat IRS, le traitement avec un pH acide améliore son activité protéolytique de 18,5%. Ce qui signifie que ces protéases sont stables à un pH acide, ceci a été démontré chez les protéases *Bacillus cohnii* qui ont gardé 85% de leur activité après 30 min de traitement au pH5 (Dudhagara *et al.*, 2015).

Le traitement de l'extrait brut de l'isolat IRS avec un pH neutre fait diminuer son activité protéolytique de 48,06%, ce qui a été observé pour les protéases de *Bacillus pumilus*

qui présente une diminution de 41% après un traitement au pH7 (Gomaa, 2013). Le traitement avec un pH alcalin annule carrément l'activité protéolytique de cet extrait.

Pour l'extrait brut de l'isolat ICB, les traitements aux différents pH diminuent son activité protéolytique. En effet, cette activité chute de 33,33% suite à un traitement à pH 5, de 87,41% pour le traitement à un pH 7 et de 84,13% pour le traitement à un pH 9.

Pour l'extrait brut de l'isolat IS, le traitement au pH 7 améliore son activité protéolytique de 125,69%, par contre le traitement avec un pH 5 et pH 9 fait diminuer l'activité protéolytique de cet extrait, respectivement, de 20% et de 34,83%. L'influence d'un traitement à pH acide ou alcalin a été démontrée chez les protéases de *Bacillus licheniformis*. Ces protéases ne gardent que 20% de leur activité après traitement à pH6 (Abu Sayem *et al.*, 2006) et celles de *Bacillus sp* qui perdent environ 66% de leur activité après traitement à pH9 (Nascimento, 2003).

5.3. Effet du CaCl₂ sur la stabilité de l'enzyme

L'effet du CaCl₂ sur la stabilité de l'enzyme est testé par pré-incubation des extraits bruts dans un tampon phosphate pH 7 additionné de 1% de CaCl₂, pendant 2 h à température ambiante.

À l'exception de l'activité protéolytique de l'extrait brut IS (diminution de 5,77%), le traitement avec du CaCl₂ semble affecter l'activité protéolytique des différents extraits bruts (Figure 10).

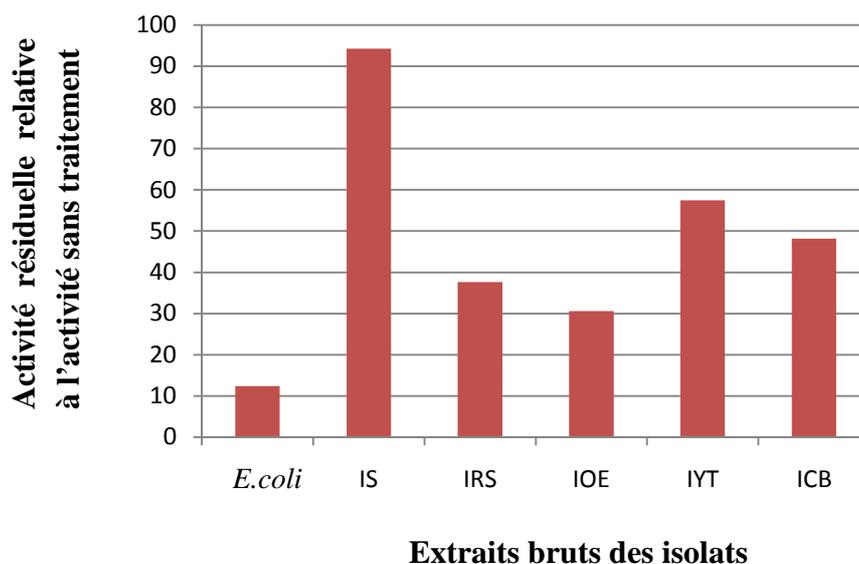


Figure 10 : Effet du CaCl₂ sur la stabilité de l'enzyme

L'activité protéolytique de l'extrait brut de la souche *E.coli* est la plus affectée par ce traitement avec une diminution de 87,59%, suivi de l'activité de l'extrait de l'isolat IOE (diminution de 69,42%) et de l'extrait de l'isolat IRS (diminution de 62,34%).

Pour les extraits bruts des isolats IYT et ICB, leur activité protéolytique présente une diminution, respectivement de 42,5% et de 51,86%.

L'influence du CaCl_2 sur la stabilité des enzymes a été étudiée. Les travaux de Kütemeyer *et al.* (2005) ont montrée que les transglutaminases d'origine microbienne présentent une diminution de leur stabilité en présence du CaCl_2 .

6. Discussion générale

Comme mentionné dans la partie synthèse bibliographique, des efforts considérables ont été dirigés vers la sélection d'organismes produisant des enzymes avec de nouvelles propriétés physiologiques et des tolérances à des conditions extrêmes utilisées dans des processus industriels tels que la température, la salinité et le pH (Fulzele *et al.*, 2011 ; Umayaparvathi *et al.*, 2013). L'objectif de notre travail été de rechercher des activités protéolytiques, chez des isolats, possédant ces caractéristiques extrêmes utilisées dans des processus industriels et biotechnologiques.

Pour les isolats récupérés à partir du sol IS et IRS (respectivement sol vierge et rhizosphère), leurs extraits bruts semblent avoir le même profil d'hydrolyse de la caséine (un optimum d'activité après 3min d'incubation), de plus, l'activité protéolytique de ces deux extraits est sévèrement affectée par la présence du CaCl_2 . Cependant, l'activité protéolytique de ces deux extraits, présentent un optimum de température et de pH différents. L'activité d'IS atteint son maximum à une température de 20°C et de 45°C et à un pH5. Alors que L'activité de IRS, à un maximum d'activité à 30°C et à pH 9.

Concernant la stabilité des protéases, l'activité protéolytique de ces extraits est considérée comme plus ou moins thermostables pour l'extrait de l'isolat IS, à thermostables pour l'extrait de l'isolat IRS. Ces deux extraits retiennent, respectivement, 48,07% et 90,90% d'activité résiduelle après 2 h traitement thermique à 90°C.

Les extraits bruts de ces deux isolats présentent un comportement différent vis-à-vis des traitements pH. Pour l'extrait de l'isolat IRS, le traitement avec un pH acide améliore son activité protéolytique de 18,5%, alors que pour l'extrait brut de l'isolat IS, c'est le traitement

avec un pH neutre qui améliore son activité protéolytique de 125,69%. Cela veut dire que les protéases de l'extrait brut de l'isolat IRS sont stables à un pH acide, alors que celles de l'extrait brut de l'isolat IS sont stables à un pH neutre. Pour les autres pH ces protéases sont plus moins stables.

Les protéases de l'extrait brut de l'isolat IS sont moins affectées par le traitement au CaCl_2 que les protéases de l'extrait brut de l'isolat IRS. Ces deux extraits retiennent, respectivement, 94,23% et 37,66% après 2 h de traitement avec 0,5% de CaCl_2 .

Pour les isolats récupérés à partir des aliments IYT et IOE (respectivement yaourt et œuf), les optimums d'activité de leurs extraits bruts sont identiques, une température optimale de 30°C, et un pH neutre (pH7).

L'activité protéolytique est affectée de la même façon pour ces deux extraits et elle est 3 fois inférieure en présence du CaCl_2 qu'à son absence. Par contre, leur profil d'hydrolyse de la caséine est différent, l'extrait de l'isolat IOE atteint son maximum d'activité à 3min et celui de IYT à 6min.

Concernant la stabilité des protéases, le traitement thermique de 2 h à 90°C affecte la stabilité des protéases de l'extrait brut de l'isolat IOE qui ne retient que 21,56% de son activité protéolytique, alors que l'extrait brut de l'isolat IYT retient 78,75% après ce traitement. Les protéases de l'extrait brut de l'isolat IYT sont plus thermostables que les protéases de l'extrait brut de l'isolat IOE.

Pour les extraits des isolats IYT et IOE, les traitements aux différents pH n'affectent pas la stabilité des protéases de ces deux extraits bruts, à l'exception de l'extrait brut de l'isolat IOE qui présente une diminution de son activité protéolytique de 87,2% suite à un traitement de 2 h au pH5.

Les protéases de l'extrait brut de l'isolat IYT sont moyennement affectées par le traitement au CaCl_2 , alors que celles de l'isolat IOE ne maintient que 30,58% de son activité.

Pour les extraits bruts de la souche de référence *E.coli* et de l'isolat ICB (cavité buccale), l'hydrolyse de la caséine arrive à son optimum après 10min d'incubation et à pH neutre (pH7). Cependant, leur température optimale d'activité protéolytique est différente, 20°C pour ICB et 37°C pour *E.coli*.

Concernant les protéases de l'extrait brut de l'isolat ICB sont plus stables, au traitement thermique de 2h à 90°C, que les protéases de l'extrait brut de la souche de référence *E.coli*. Ces protéases retiennent, respectivement, 62,2% et 6,3% de leur activité.

Le traitement aux différents pH affecte la stabilité des protéases des extraits bruts des deux isolats, sauf pour le traitement au pH 9 qui n'affecte pas la stabilité des protéases de l'extrait brut de la souche *E.coli*.

La stabilité des protéases de ces deux extraits est affectée par CaCl₂, l'extrait de la souche *E.coli* est plus affecté par rapport aux protéases de l'isolat ICB. Ces protéases retiennent, respectivement, 12,41% et 48,14% de leur activité après ce traitement.

Bien que les protéases de l'extrait brut d'*E.coli* présentent la meilleure activité d'hydrolyse de la caséine, ces protéases n'ont pas de tolérances aux conditions extrêmes utilisées dans les processus industriels tels la stabilité à des températures élevées. Pour cela, ces protéases ne peuvent être exploitées en industrie. De même pour les extraits bruts de l'isolat IOE (œuf) qui ne présentent pas une stabilité à des températures élevées.

Pour les protéases de l'isolat de la cavité buccale (ICB), bien qu'elles présentent une bonne thermo-stabilité, elles sont sensibles aux traitements pH 7 et pH 9, ce qui limite leur utilisation dans les industries nécessitant des conditions de pH neutre ou alcalin.

Les protéases de l'extrait brut de l'isolat IRS présentent la meilleure stabilité au traitement thermique et une bonne stabilité aux traitements pH 5 et pH 7, l'extrait brut de l'isolat IS présente une certaine stabilité au traitement thermique et elles sont stables aux traitements aux pH 5, 7 et 9. Ce qui fait des protéases récupérées à partir du sol (sol vierge et rhizosphère), des candidats potentiels pour des utilisations industrielles et biotechnologiques. De plus, il a été démontré que les enzymes récupérées à partir des microorganismes du sol sont les plus recherchées grâce à leur capacité à être utilisées dans divers domaines de recherche et peuvent être exploitées en agriculture, en industrie et en biotechnologie (Rao *et al.*, 2017). Les enzymes microbiennes les plus recherchées dans les sols sont les hydrolases et en particulier les protéases (Kakirde *et al.*, 2010 ; Souza *et al.*, 2018) grâce à leur importance biotechnologiques et à leur utilisation dans les industries des bio surfactants, des détergents, du cosmétique, des aliments, des textiles, de la pharmacie,... etc. (Sindhu *et al.*, 2009 ; Saggiu et Mishra, 2017 ; Souza *et al.*, 2018). C'est pour cette raison que l'intérêt pour des enzymes provenant des divers espèces du sol (ex *Bacillus* sp et *Aspergillus*) a augmenté (Sohail *et al.*,

2009; Oyeleke *et al.*, 2010; Padmapriya *et al.*, 2012; Josephine *et al.*, 2012; Naidu et Devi, 2005).

Le tableau suivant (Tableau 4) récapitule les résultats obtenus des différentes activités protéolytiques.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des résultats de la caractérisation des protéases chez les différents isolats

	Activités protéolytiques			Stabilité des protéases (activité résiduelle)		
	pH optimal	Température optimale	Activité en présence de 0,5% de CaCl₂	Stabilité à pH	Stabilité à 90°C	Stabilité en présence de 0,5% CaCl₂
<i>E.coli</i>	7,0	37°C	Faible diminution	7,0 et 9,0	Faible	Faible
IS	5,0	20°C, 45°C	Activité nulle	5, 7,0 et 9,0	Moyenne	Forte
IRS	9,0	30°C	Forte diminution	5,0 et 7,0	Forte	Faible
IOE	7,0	30°C	Forte diminution	7,0 et 9,0	Faible	Faible
IYT	7,0	30°C	Forte diminution	5, 7 et 9,0	Forte	Moyenne
ICB	7,0	20°C	Forte diminution	5,0	Moyenne	Moyenne

***C**onclusion et perspectives*

L'activité protéolytique extracellulaire d'une souche de référence (*E.coli*) et de 5 isolats récupérés à partir du yaourt (IYT), de l'œuf (IOE), du sol (IS), de la rhizosphère (IRS) et de la cavité buccale d'un nourissant (ICB) a été testée, afin de récupérer des protéases à intérêt industriel.

Les résultats des tests de l'influence des températures sur l'activité protéolytique révèlent des températures optimales de 20°C et 45°C pour les protéases de l'isolat IS alors que les protéases des autres isolats présentent un optimum de température de 30°C ou de 37°C. L'influence du pH sur l'activité protéolytique des différents isolats a été testée à pH 5, pH 7 et pH 9, les résultats de ce test montrent que les extraits bruts des isolats IS et IRS ont une activité protéolytique optimale à pH acide (pH5), les extraits bruts d'*E.coli*, IOE et ICB ont une activité protéolytique optimale à pH neutre (pH7) et les extraits bruts des isolats IYT, IRS et IS ont une activité protéolytique optimale à pH basique (pH9). L'influence du CaCl₂ sur l'activité protéolytique a été aussi testée à une concentration de 0,5%, les résultats montrent que l'activité protéolytique des différents isolats est affectée par la présence du CaCl₂.

Concernant les tests de stabilité des protéases aux conditions extrêmes, les résultats du traitement thermique à 90°C pendant 2h ont montrés une grande stabilité des protéases des isolats IRS et IYT avec maintien, respectivement, de 90,90% et de 78,75% de leur activité après ce traitement. Pour ce qui est stabilité des protéases à des traitements pH, les résultats obtenus montrent que les protéases des isolats IS, IRS, IYT et ICB sont stables au traitement pH 5, les protéases des isolats IS, IOE, IYT et d'*E.coli* sont stables au traitement pH 7 et les protéases des isolats IYT, IOE, IS et d'*E.coli* sont stables au traitement pH 9. Pour le traitement avec le CaCl₂, la stabilité des protéases des différents isolats est affectée par la présence du CaCl₂ à l'exception de celles de l'extrait brut IS qui présentent une certaine stabilité (94,23% d'activité résiduelle).

D'après ces différents résultats on peut conclure sur l'existence d'une certaine stabilité des protéases des isolats IS, IRS et IYT aux conditions extrêmes de pH et de température. Ces propriétés donnent un fort potentiel d'utilisation de ces protéases en industries et peuvent être donc exploitées commercialement.

Conclusion et perspectives

Afin de mieux les caractériser, les protéases possédant des propriétés industrielles, doivent être purifiées et leur capacité à hydrolyser d'autres substrats protéiques tels que l'azocaséine, l'azocoll, l'hémoglobine...etc. doit être testée, de plus, l'influence de certains inhibiteurs (acide éthylène-diamine-tétra acétique (E.D.T.A), Phénylméthanesulfonyl fluoride (P.M.S.F) sur l'activité protéolytique sera aussi testée.

Ensuite, les isolats possédant les protéases les plus performantes seront identifiés et les gènes codant pour ces protéases seront isolés. Des modifications génétiques peuvent être apportées à ces gènes afin d'améliorer ces protéases pour les rendre plus performantes vis-à-vis des conditions extrêmes utilisées en industrie : pH et températures extrêmes, solvants, sels, des inhibiteurs de protéases...etc.

Une fois ceci réalisé, des protocoles de productions industrielles seront adaptés afin de produire ces protéases à échelle industrielle.

Références bibliographiques

1. **Ali, S., et Ghulam Muhammad, Y. (2017).** Industrial application of microbial proteases. *European journal of pharmaceutical and medical research*, 4(6), 623-629.
2. **Abu Sayem, S., Alam, M. J., et Hoq, M. M. (2006).** Effect of temperature, pH and metal ions on the activity and stability of alkaline protease from novel *Bacillus licheniformis* MZK03. *Proceedings-Pakistan academy of sciences*, 43(4), 257
3. **Adams, J. B. (1991).** Enzyme inactivation during heat processing of food-stuffs. *International journal of food science et technology*, 26(1), 1-20
4. **Adams, M. W., et Kelly, R. M. (1998).** Finding and using hyperthermophilic enzymes. *Trends in biotechnology*, 16(8), 329-332.
5. **Adsul, M. G., Bastawde, K. B., Varma, A. J., et Gokhale, D. V. (2007).** Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. *Bioresource Technology*, 98(7), 1467-1473.
6. **Agbo-Godeau, S., et Guedj, A. (2005).** Mycoses buccales. *EMC-Stomatologie*, 1(1), 30-41
7. **Ahmetoglu, N., Bekler, F. M., Acer, O., Guven, R. G., et Guven, K. (2015).** Production, purification and characterisation of thermostable metallo-protease from newly isolated *Bacillus* sp. KG5. *EurAsian Journal of BioSciences*, 9, 1-11.
8. **Ammar, I. A. et Aggad, H. (2018).** Predominant bacterial biofilm and efficiency of cleaning and disinfection in a dairy industry, *Lucrări științifice*, 5.
9. **Andrade, V. S., Sarubbo, L. A., Fukushima, K., Miyaji, M., Nishimura, K., et Campos-Takaki, G. M. D. (2002).** Production of extracellular proteases by *Mucorcircinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(2), 106-110.
10. **Anisworth, S. J. (1994).** Soap and detergents. *Chemical and Engineering News*, 72, 34-59.
11. **Balachandran, C., Duraipandiyar, V., et Ignacimuthu, S. (2012).** Purification and characterization of protease enzyme from *Actinomycetes* and its cytotoxic effect on cancer cell line (A549). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S392-S400.
12. **Balogh, T., Boross, L., et Kosáry, J. (2004).** Novel reaction systems for the synthesis of O-glucosides by enzymatic reverse hydrolysis. *Tetrahedron*, 60(3), 679-682.

13. **Banerjee, G., et Ray, A. K. (2017).** Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 119-143.
14. **Bao, G. J., Kari, K., Tervahartiala, T., Sorsa, T., et Meurman, J. H. (2008).** Proteolytic activities of oral bacteria on ProMMP-9 and the effect of synthetic proteinase inhibitors. *The open dentistry journal*, 2, 96.
15. **Benmrad, M. O., Moujehed, E., Elhoul, M. B., Jaouadi, N. Z., Mechri, S., Rekik, H., ... et Bejar, S. (2016).** A novel organic solvent-and detergent-stable serine alkaline protease from *Trametes cingulata* strain CTM10101. *International journal of biological macromolecules*, 91, 961-972.
16. **Bhaskar, N., Modi, V. K., Govindaraju, K., Radha, C., et Lalitha, R. G. (2007).** Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource technology*, 98(2), 388-394.
17. **Boddey, J. A., Hodder, A. N., Günther, S., Gilson, P. R., Patsiouras, H., Kapp, E. A., ... et Cowman, A. F. (2010).** An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell. *Nature*, 463(7281), 627.
18. **Boyer, P.D. (1971)** . The enzymes,3rd ed., Academic Press, Inc., New York, Vol.5
19. **Bull, A. T., Ward, A. C., et Goodfellow, M. (2000).** Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(3), 573-606.
20. **Cerning, J. (1987).** Biochemical activities of *Penicillium* used in cheese making. *Le Lait*, 67, 3-39.
21. **Cooper, G. M. (2000).** Cell proliferation in development and differentiation. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.*
22. **Contesini, F. J., Melo, R. R. D., et Sato, H. H. (2017).** An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical reviews in biotechnology*, 38(3), 321-334.
23. **Cowan, D. A., et Daniel, R. M. (1982).** Purification and some properties of an extracellular protease (caldolysin) from an extreme thermophile. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 705(3), 293-305.
24. **Craik, C. S., Page, M. J., et Madison, E. L. (2011).** Proteases as therapeutics. *Biochemical Journal*, 435(1), 1-16.
25. **Darland, G., et Brock, T. D. (1971).** *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *Microbiology*, 67(1), 9-15.

26. **Das, G. et Prasad, M. P. (2010).** Isolation, purification et mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *Int. Res. J. Microbiol*, 1(2), 26-31.
27. **dela Cruz, T. E. E. et Torres, J. M. O. (2012).** Gelatin hydrolysis test protocol.
28. **Devi, M. K., Banu, A. R., Gnanaprabhal, G. R., Pradeep, B. V., et Palaniswamy, M. (2008).** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian journal of science and technology*, 1(7), 1-6.
29. **Divakar, G., Sunitha, M., Vasu, P., et Ellaiah, P. (2006).** Optimization of process parameters for alkaline protease production under solid-state fermentation by *Thermoactinomyces thalophilus* PEE 14.
30. **Do Nascimento, W. C. A., et Martins, M. L. L. (2004).** Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian journal of microbiology*, 35(1-2), 91-96.
31. **Dreyfus, L. A. et Iglewski, B. H. (1986).** Purification and characterization of an extracellular protease of *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity*, 51(3), 736-743.
32. **Doutre, M. P., Perreau, P. et Sane, M. (1975).** Note sur le portage buccal de *Pasteurella multocida* chez les chats vivant dans l'agglomération dakaraise. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 28(1), 21-23.
33. **Desmazeaud, M. et Hermier, J. (1968).** Isolement, purification et propriétés d'une protéase extracellulaire de *Micrococcus caseolyticus*, *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, 8 (4), 565-577.
34. **Dubey, R., Adhikary, S., Kumar, J. et Sinha, N. (2010).** Isolation, production, purification, assay and characterization of alkaline protease enzyme from *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Dev Microbiol Mol Biol*, 1(1), 75-94.
35. **Dudhgara, P. R., Sunil, B., et Anjana, G. (2015).** Hide dehairing and laundry detergent compatibility testing of thermostable and solvents tolerant alkaline protease from hot spring isolate *bacillus cohnii*U3. *Online Journal of Biological Sciences*, 15(3), 152.
36. **Ekici, Ö. D., Paetzel, M., et Dalbey, R. E. (2008).** Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Science*, 17(12), 2023-2037.

37. **Frankenberger Jr, W. T. et Johanson, J. B. (1982).** Effect of pH on enzyme stability in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(5), 433-437.
38. **Fujita, Y., Mori, I. et Kitano, S. (1983).** Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (VI) complex and protein. *Bunseki Kagaku*, 32(12), 379-386.
39. **Fulzele, R., Desa, E., Yadav, A., Shouche, Y. et Bhadekar, R. (2011).** Characterization of novel extracellular protease produced by marine bacterial isolate from the Indian Ocean. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1364-1373.
40. **Gaber, Y. (2012).** *Hydrolases as Catalysts for Green Chemistry and Industrial Applications: Esterase, Lipase and Phytase*. Department of Biotechnology, Lund University.
41. **Gardan, L., et Devaux, M. (1987).** La bactériose du noisetier (*Xanthomonas campestris* pv. *corylina*): biologie de la bactérie 1. *EPPO Bulletin*, 17(2), 241-250.
42. **Germaine, G. R., et Tellefson, L. M. (1981).** Effect of pH and human saliva on protease production by *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 31(1), 323-326.
43. **Gessesse, A. (1997).** The use of nug meal as low-cost substrate for the production of alkaline protease by the alkaliphilic *Bacillus* sp. AR-009 and some properties of the enzyme. *Bioresource Technology* 62, 59– 61.
44. **Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Ebrahiminezhad, A., Kazemi, A., Shahbazi, M., et Talebnia, N. (2011).** Screening and isolation of extracellular protease producing bacteria from the Maharloo Salt Lake. *Iranian journal of Pharmaceutical sciences*, 7(3), 175-180.
45. **Godfrey, T., et West, S. (1996).** *Industrial enzymology* 2nd ed Macmillan Publishers Inc New York NY.
46. **Grudkowska, M. et Zagdanska, B. (2004).** Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*, 609-624.
47. **Gupta, R., Beg, Q., Khan, S., et Chauhan, B. (2002).** An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(4), 381-395.
48. **Gupta, R., Beg, Q., et Lorenz, P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(1), 15-32.
49. **Haki, G. D., et Rakshit, S. K. (2003).** Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, 89(1), 17-34.

50. **Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J. C., Hamdi, M. et Lomascolo, A. (2006).** Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of applied microbiology*, 100(2), 219-232.
51. **Hamza, T. A. (2017).** Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use. *Int. J. Chem. Biomol. Sci*, 3(1), 1-10.
52. **Harley, J.P. (2005).** Laboratory exercises in microbiology, 6th ed. McGraw-Hill Companies Inc : New York, NY.
53. **Hartley, B. S. (1960).** Proteolytic enzymes. *Annual review of biochemistry*, 29(1), 45-72.
54. **Hashimoto, H., Kaneko, Y., Iwaasa, T., et Yokotsuka, T. (1973).** Production and purification of acid protease from the thermophilic fungus, *Penicillium duponti* K1014. *Appl. Environ. Microbiol.*, 25(4), 584-588.
55. **Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. H. et Mainardi, C. L. (1985).** Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *Journal of Biological Chemistry*, 260(4), 2493-2500.
56. **Hoffman, R. L. (1974).** Discontinuous and dilatant viscosity behavior in concentrated suspensions. II. Theory and experimental tests. *Journal of Colloid and Interface Science*, 46(3), 491-506.
57. **Horikoshi, K. (1971).** Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35(11), 1783-1791.
58. **Horimoto, Y., Dee, D. R. et Yada, R. Y. (2009).** Multifunctional aspartic peptidase prosegments. *New biotechnology*, 25(5), 318-324.
59. **Hutadilok-Towatana, N., Painupong, A., et Suintanalert, P. (1999).** Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719. *Journal of bioscience and bioengineering*, 87(5), 581-587.
60. **Houde, A., Kademi, A., et Leblanc, D. (2004).** Lipases and their industrial applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 118(1-3), 155-170.
61. **Hutkins, R. W. et Nannen, N. L. (1993).** pH homeostasis in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 76(8), 2354-2365.
62. **Khan, M. A., Ahmad, N., Zafar, A. U., Nasir, I. A. et Qadir, M. A. (2011).** Isolation and screening of alkaline protease producing bacteria and physio-chemical characterization of the enzyme. *African Journal of Biotechnology*, 10(33), 6203-6212.

63. **Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., et Hatada, Y. (1998).** Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles*, 2(3), 185-190.
64. **Jacobs, M. F. (1995).** Expression of the subtilisin Carlsberg-encoding gene in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Gene*, 152(1), 69-74.
65. **Jayaraman, J. (2003).** Biuret method of protein estimation. *Laboratory Manual in Biochemistry*, 78-79.
66. **Jenssen, P. H., Peek, K., et Morgan, H. W. (1994).** Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(4), 400-406.
67. **Joo, H. S., Kumar, C. G., Park, G. C., Kim, K. T., Paik, S. R. et Chang, C. S. (2002).** Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry*, 38(2), 155-159.
68. **Josephine, S. F., Ramya, V. S., Neelam, D., Suresh, B.G., Siddalingeshwara, K. G., Venugopal, N., et Vishwanatha, T. J. (2012).** Isolation, production and characterization of protease from *Bacillus* Sp isolated from soil sample *Microbiol. Biotech. Res*, 2 (1), 163-168
69. **Kakirde, K. S., Parsley, L. C., et Liles, M. R. (2010).** Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(11), 1911-1923.
70. **Kaminogawa, S. et Yamauchi, K. (1972).** Acid protease of bovine milk. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(13), 2351-2356.
71. **Kembhavi, A. A., Kulkarni, A. et Pant, A. (1993).** Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 38(1-2), 83-92.
72. **Kouomegne, R., Bracquart, P. et Linden, G. (1984).** Application d'un réactif de transparisation du lait au dénombrement de bactéries. *Le Lait*, 64(643-644), 418-435.
73. **Krem, M. M., Rose, T., et Di Cera, E. (2000).** Sequence determinants of function and evolution in serine proteases. *Trends in cardiovascular medicine*, 10(4), 171-176.
74. **Kuddus, M., et Ramteke, P. W. (2011).** Production optimization of an extracellular cold-active alkaline protease from *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 7528 and its application in detergent industry. *African Journal of Microbiology Research*, 5(7), 809-816.

75. **Kulakova, L., Galkin, A., Kurihara, T., Yoshimura, T., et Esaki, N. (1999).** Cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella* strain Ac10: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(2), 611-617.
76. **Kumar, C. G., Malik, R. K., et Tiwari, M. P. (1998).** Novel enzyme-based detergents: an Indian perspective. *Current Science*, 75(12), 1312-1318.
77. **Kumar, C. G., et Takagi, H. (1999).** Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances*, 17(7), 561-594.
78. **Kumar, C. G., Tiwari, M. P., et Jany, K. D. (1999).** Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties. *Process Biochemistry*, 34(5), 441-449.
79. **Kundu, S., Sundd, M., et Jagannadham, M. V. (1999).** Structural characterization of a highly stable cysteine protease ervatamin C. *Biochemical and biophysical research communications*, 264(3), 635-642.
80. **Kütemeyer, C., Froeck, M., Werlein, H. D., et Watkinson, B. M. (2005).** The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. *Food Control*, 16(8), 735-737.
81. **Lasure, L. L. (1980).** Regulation of extracellular acid protease in *Mucormiehei*. *Mycologia*, 72(3), 483-493.
82. **Lathem, W. W., Grys, T. E., Witowski, S. E., Torres, A. G., Kaper, J. B., Tarr, P. I., et Welch, R. A. (2002).** StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157: H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Molecular microbiology*, 45(2), 277-288.
83. **Leboffe, M. J., et Pierce, B. E. (2012).** *Microbiology: laboratory theory and application*. Morton Publishing Company.
84. **Lehnherr, H. A. N. S. J. O. R. G., et Yarmolinsky, M. B. (1995).** Addition protein Phd of plasmid prophage P1 is a substrate of the ClpXP serine protease of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(8), 3274-3277.
85. **Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O., Turunen, O., et Schoemaker, H. (2001).** *Industrial use of enzymes*. Eolss Publishers, Oxford.
86. **Lenoir, J., et Auberger, B. (1977).** Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. II. Caractérisation d'une protéase neutre. *Le lait*, 57(568), 471-491.

87. **Leroy, F., et De Vuyst, L. (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science et Technology*, 15(2), 67-78.
88. **Liao, C. H., et McCallus, D. E. (1998).** Biochemical and Genetic Characterization of an Extracellular Protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(3), 914-921.
89. **López-Otín, C., et Bond, J. S. (2008).** Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433-30437.
90. **Lu, S. F., et Chang, P. P. (1996).** A thermostable neutral protease from *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541. *Letters in applied microbiology*, 22(1), 5-9.
91. **Macfarlane, G. T., et Macfarlane, S. A. N. D. R. A. (1992).** Physiological and nutritional factors affecting synthesis of extracellular metalloproteases by *Clostridium bifermentans* NCTC 2914. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(4), 1195-1200.
92. **Madhavi, J., Srilakshmi, J., Rao, M. R., et Rao, K. S. (2011).** Efficient leather dehairing by bacterial thermostable protease. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*, 3(4), 11-26.
93. **Maheshwari, R., Bharadwaj, G., et Bhat, M. K. (2000).** Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(3), 461-488.
94. **Maugard, T. (2003).** Application of hydrolases to the enzymatic synthesis of cosmetic Ingredients. *Sci. Study Res.*, 4, 39-50.
95. **McKevitt, A. I., Bajaksouzian, S., Klinger, J. D., et Woods, D. E. (1989).** Purification and characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas cepacia*. *Infection and immunity*, 57(3), 771-778.
96. **Merheb, C. W., Cabral, H., Gomes, E., et Da-Silva, R. (2007).** Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, 104(1), 127-131.
97. **Miller, D. K. (1997).** The role of the caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Seminars in immunology*, 9(1), 35-49.
98. **Mitchell, R. S., Kumar, V., Abbas, A. K., et Fausto, N. (2007).** Robbins Basic Pathology. 8th (edn.) Philadelphia.
99. **Mótyán, J., Tóth, F., et Tózsér, J. (2013).** Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3(4), 923-942.

100. **Naidu, K. S. B., et Devi, K. L. (2005).** Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 724-726.
101. **Neurath, H., et Walsh, K. A. (1976).** Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(11), 3825-3832.
102. **Ogino, H., Yasui, K., Shiotani, T., Ishihara, T., et Ishikawa, H. (1995).** Organic solvent-tolerant bacterium which secretes an organic solvent-stable proteolytic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(12), 4258-4262.
103. **Okada, Y. A. S. U. N. O. R. I., Nagase, H. I. D. E. A. K. I., et Harris, E. D. (1986).** A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 261(30), 14245-14255.
104. **Oyeleke, S. B., Egwim, E. C., et Auta, S. H. (2010).** Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 2(7), 83-87.
105. **Padmapriya, B., Rajeswari, T., Nandita, R., et Raj, F. (2012).** Production and purification of alkaline serine protease from marine *Bacillus* species and its application in detergent industry. *European Journal of Applied Sciences*, 4(1), 21-26.
106. **Pastor, M. D., Lorda, G. S., et Balatti, A. (2001).** Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(1), 6-9.
107. **Perdana, J., Fox, M. B., Schutyser, M. A. I., et Boom, R. M. (2012).** Enzyme inactivation kinetics: Coupled effects of temperature and moisture content. *Food Chemistry*, 133(1), 116-123.
108. **Priest, F. G. (1977).** Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological reviews*, 41(3), 711.
109. **Puente, X. S., Sánchez, L. M., Overall, C. M., et López-Otín, C. (2003).** Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Reviews Genetics*, 4(7), 544.
110. **Rahman, R. N. Z. A., Razak, C. N., Ampon, K., Basri, M., Zin, W. M., Yunus, W., et Salleh, A. B. (1994).** Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Applied microbiology and biotechnology*, 40(6), 822-827.

111. **Ramakrishna, T., et Pandit, M. W. (1988).** Self-association of α -chymotrypsin: effect of amino acids. *Journal of Biosciences*, 13(3), 215-222.
112. **Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., et Deshpande, V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3), 597-635.
113. **Rao, R. R., Vimudha, M., Kamini, N. R., Gowthaman, M. K., Chandrasekran, B., et Saravanan, P. (2017).** Alkaline protease production from *Brevibacterium luteolum* (MTCC 5982) under solid-state fermentation and its application for sulfide-free unhairing of cowhides. *Applied biochemistry and biotechnology*, 182(2), 511-528.
114. **Rapilly, F. (1968).** Les techniques de mycologie en pathologie végétale.
115. **Rawling, N. D., et Barrett, A. J. (1994).** Classification of peptidases. *Meth Enzymol*, 244, 1-15.
116. **Ribitsch, D., Karl, W., Birner-Grünberger, R., Gruber, K., Eiteljörg, I., Remler, P., ... et Schwab, H. (2010).** C-terminal truncation of a metagenome-derived detergent protease for effective expression in *E. coli*. *Journal of biotechnology*, 150(3), 408-416.
117. **Saggu, S. K., et Mishra, P. C. (2017).** Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil. *PloS one*, 12(11).
118. **Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., et Pandey, A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process biochemistry*, 40(8), 2689-2694.
119. **Saha, M. L., Begum, K. H., Khan, M. R., et Gomes, D. J. (2011).** Bacteria associated with the tannery effluent and their alkaline protease activities. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 21(1), 53-61.
120. **Santos, A., Ladero, M., et Garcia-Ochoa, F. (1998).** Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(7), 558-567.
121. **Sareen, R., et Mishra, P. (2008).** Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(3), 399-405.

122. **Sawant, R., et Nagendran, S. (2014).** Protease: an enzyme with multiple industrial applications. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(6), 568-579.
123. **Secades, P., et Guijarro, J. A. (1999).** Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(9), 3969-3975.
124. **Shannon, J. D., Baramova, E. N., Bjarnason, J. B., et Fox, J. W. (1989).** Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. *Journal of Biological Chemistry*, 264(20), 11575-11583.
125. **Silva, C. R. D., Delatorre, A. B., et Martins, M. L. L. (2007).** Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic bacillus sp and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 253-258.
126. **Sindhu, R., Suprabha, G. N., et Shashidhar, S. (2009).** Optimization of process parameters for the production of alkaline protease from *Penicillium godlewskii* SBSS 25 and its application in detergent industry. *African Journal of Microbiology Research*, 3(9), 515-522.
127. **Singh, J., Batra, N., et Sobti, R. C. (2001).** Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry*, 36(8-9), 781-785.
128. **Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., et Mehta, P. K. (2016).** Microbial protease in commercial applications. *J Pharm Chem Biol Sci*, 4(3), 365-74.
129. **Srinivasan, T. R., Das, S., Philip, V. B. R., et Kannan, N. (2009).** Isolation and characterization of thermostable protease producing bacteria from tannery industry effluent. *Recent research in science and technology*, 1(2).
130. **Sohail, M., Naseeb, S., Sherwani, S. K., Sultana, S., Aftab, S., Shahzad, S., ... et Khan, S. A. (2009).** Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: *Aspergillus* the pre-dominant genus of hydrolase producer. *Pak. J. Bot*, 41(5), 2567-2582.
131. **Sonnleitner, B., et Fiechter, A. (1983).** Advantages of using thermophiles in biotechnological processes: expectations and reality. *Trends in Biotechnology*, 1(3), 74-80.
132. **Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., et Chen, S. T. (2000).** Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein expression and purification*, 20(2), 142-151.

133. **Souza, P. M. D., Bittencourt, M. L. D. A., Caprara, C. C., Freitas, M. D., Almeida, R. P. C. D., Silveira, D., ... et Magalhães, P. O. (2015).** A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337-346.
134. **Souza, A. N. D., et Martins, M. L. L. (2001).** Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic Bacillus. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(4), 271-275.
135. **Souza, R. C., Cantão, M. E., Nogueira, M. A., Vasconcelos, A. T. R., et Hungria, M. (2018).** Outstanding impact of soil tillage on the abundance of soil hydrolases revealed by a metagenomic approach. *brazilian journal of microbiology*, 49(4), 723-730.
136. **Straus, D. B., Walter, W. A., et Gross, C. A. (1987).** The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . *Nature*, 329(6137), 348.
137. **Stroud, R. M., Kay, L. M., et Dickerson, R. E. (1974).** The structure of bovine trypsin: electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Å and at 2.7 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 83(2), 185-208.
138. **Sumantha, A., Larroche, C., et Pandey, A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 211.
139. **Tavano, O. L. (2013).** Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.
140. **Terra, W. R., Ferreira, C., Jordao, B. P., et Dillon, R. J. (1996).** Digestive enzymes. In *Biology of the insect midgut*, 153-194.
141. **Tester, R. F., Qi, X., et Karkalas, J. (2006).** Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*, 130(1-2), 39-54.
142. **Thangam, E. B., et Rajkumar, G. S. (2002).** Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 35(2), 149-154.
143. **Tokiwa, Y., et Suzuki, T. (1977).** Hydrolysis of polyesters by lipases. *Nature*, 270(5632), 76.
144. **Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Arumugam, M., et Balasubramanian, T. (2013).** Purification and characterization of protease from *Bacillus cereus* SU12 isolated from oyster *Saccostrea cucullata*. *African Journal of Biotechnology*, 12(40), 5897-5908

145. **Völkel, H., Kurz, U., Under, J., Klumpp, S., Gnau, V., Jung, G., et Schultz, J. E. (1996).** Cathepsin L is an intracellular and extracellular protease in *Paramecium tetraurelia*: Purification, cloning, sequencing and specific inhibition by its expressed propeptide. *European journal of biochemistry*, 238(1), 198-206.
146. **Ward, O. P. (1985).** Proteolytic enzymes. Blanch HW, Drew S, Wang DI (Eds), *Comprehensive Biotechnology*.
147. **Watanabe, N., Kamei, S., Ohkubo, A., Yamanaka, M., Ohsawa, S., Makino, K., et Tokuda, K. (1986).** Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clinical chemistry*, 32(8), 1551-1554.
148. **Weaver, L. H., Kester, W. R., et Matthews, B. W. (1977).** A crystallographic study of the complex of phosphoramidon with thermolysin. A model for the presumed catalytic transition state and for the binding of extended substrates. *Journal of molecular biology*, 114(1), 119-132.
149. **Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Kronberger, A., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Grant, G. A., ... et Goldberg, G. I. (1987).** Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(19), 6725-6729.
150. **Wolfenden, R., et Snider, M. J. (2001).** The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Accounts of chemical research*, 34(12), 938-945.
151. **Wu, T. Y., Mohammad, A. W., Jahim, J. M., et Anuar, N. (2006).** Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(6), 1223-1229.
152. **Yang, J. K., Shih, L., Tzeng, Y. M., et Wang, S. L. (2000).** Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes☆. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(5-6), 406-413.
153. **Yilmaz, B., Baltaci, M. O., Sisecioglu, M., et Adiguzel, A. (2016).** Thermotolerant alkaline protease enzyme from *Bacillus licheniformis* A10: purification, characterization, effects of surfactants and organic solvents. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(6), 1241-1247.
154. **Zale, S. E., et Klibanov, A. M. (1986).** Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures?. *Biochemistry*, 25(19), 5432-5444.

155. **Zamost, B. L., Nielsen, H. K., et Starnes, R. L. (1991).** Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*, 8(2), 71-81.
156. **Zeikus, J. G., Vieille, C., et Savchenko, A. (1998).** Thermozyms: biotechnology and structure–function relationships. *Extremophiles*, 2(3), 179-183.
157. **Zevaco, C., Hermier, J., et Gripon, J. C. (1974).** Le système protéolytique de *Penicillium roqueforti*: II-Purification et propriétés de la protéase acide. *Biochimie*, 55(11-12), 1353-1360.

Résumé

Il a été montré que les protéases des microorganismes sont largement utilisées en industries et en biotechnologie grâce à leurs propriétés catalytiques et leur résistance aux conditions extrêmes. Afin de sélectionner des bactéries productrices de protéases à intérêt industriel, l'activité protéolytique extracellulaire d'une souche de référence (*E.coli*) et de 5 isolats récupérés à partir du yaourt (IYT), de l'œuf (IOE), du sol (IS), de la rhizosphère (IRS) et de la cavité buccale d'un nourissant (ICB) a été caractérisée. De plus l'influence des conditions extrêmes, de températures et de pH, sur la stabilité de ces protéases a été testée. Les résultats obtenus montrent que, contrairement aux protéases des autres isolats, celles des isolats IRS et IYT présentent une grande stabilité au traitement thermique de 2h à 90°C avec maintien, respectivement, de 90,90% et de 78,75% de leur activité après ce traitement. De plus les protéases de ces deux isolats sont stables à un traitement de 2h à pH 5, et celles de l'isolat IYT sont même stables à des traitements au pH 7 et 9. Pour l'isolat IS, bien que ces protéases soient plus sensibles au traitement thermique comparé aux deux précédentes, elles sont stables au traitement pH 5, 7 et 9. Ce qui donne aux protéases des trois isolats IS, IRS et IYT un fort potentiel d'utilisation industrielle.

Mots-clés : Enzymes industrielles, enzymes bactériennes, hydrolases, activité protéolytique, caractérisation des protéases.

Abstract

Microorganism proteases have been shown to be widely used in industries and biotechnology due to their catalytic properties and resistance to extreme conditions. In order to select protease-producing bacteria of industrial interest, the extracellular proteolytic activity of a reference strain (*E. coli*) and 5 isolates recovered from yogurt (IYT), egg (IOE), soil (IS), rhizosphere (IRS) and oral cavity of a nutrient (ICB) was characterized. In addition, the influence of extreme conditions, temperatures and pH on the stability of these proteases was tested. The results obtained show that, unlike the proteases of the other isolates, those of the IRS and IYT isolates have a high stability to the heat treatment of 2 h at 90°C with 90.90% and 78.75% respectively of their maintenance activity after this treatment. In addition, the proteases of these two isolates are stable at a treatment of 2h at pH 5, and those of the IYT isolate are even stable at pH 7 and 9 treatments. For the isolate IS, although these proteases are more sensitive to heat treatment compared to the two previous ones, they are stable to pH 5, 7 and 9 treatment. This gives the proteases of the three IS, IRS and IYT isolates a high potential for industrial use.

Keywords: Industrial Enzymes, Bacterial Enzymes, Hydrolases, Proteolytic Activity, Protease Characterization.

ملخص

تتم الاستعانة ببروتياز الكائنات الحية الدقيقة في العديد من الصناعات والتكنولوجيا الحيوية وذلك بفضل خصائصها المحفزة ومقاومتها للظروف القاسية. من أجل تعيين البكتيريا المنتجة لبروتياز ذات أهمية صناعية، تم اختبار نشاط التحلل خارج الخلوي لسلسلة مرجعية (*E.coli*) و 5 عزلات مستخرجة من الزبادي (IYT)، البيض (IOE)، التربة (IS)، ريزوسفير (IRS) وتجوييف الفم لرضيع (ICB).

بالإضافة إلى ذلك، تم اختبار تأثير الظروف القاسية، درجات الحرارة و درجة الحموضة على استقرار هذه البروتياز. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أنه، على عكس بروتياز العزل الأخرى، فإن عزلي IRS و IYT يتمتعان بثبات عالٍ في المعالجة الحرارية لمدة ساعتين عند 90 درجة مئوية. مع حفاظ الانزيم على 90.90% و 78.75% على التوالي من نشاطه بعد هذا العلاج. بالإضافة إلى ذلك، بروتياز هذين العزل كانت ثابتة عند المعالجة عند درجة حموضة pH 5 لمدة 2 ساعة، و بروتياز العزلة IYT كانت مستقرة أيضاً عندما تمت المعالجة عند pH 7 و 9. على الرغم من أن بروتياز العزلة IS، أكثر حساسية للمعالجة الحرارية مقارنة بالاثنتين السابقتين، إلا أنها مستقرة بالنسبة لمعامل pH 5 و 7 و 9. وهذا ما يمنح لبروتياز العزل الثلاثة IS و IRS و IYT إمكانات عالية للاستخدام الصناعي.

الكلمات المفتاحية: الإنزيمات الصناعية، الأنزيمات البكتيرية، الهيدروليزات، نشاط التحلل، توصيف البروتياز

