

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Génie de l'Environnement

**Criblage et identification d'une souche bactérienne
hydrocarbonoclastes à double production de biomolécules
(biosurfactant et protéase) : Application environnementale et
en détergence**

Par

Fatma Zohra RAHEM

Devant le jury composé de :

O.BOURAS	Professeur, Université Blida 1	Président
A. BADIS	Professeur, Université Blida 1	Directeur de thèse
N. TAOUALIT	MCA, Université Blida 1	Examinatrice
S. FERHAT	Professeur, Université Yahia Farès de Médéa	Examinatrice
S. KOURDALI	Maitre de recherche A, CNRDPA (Bousmail)	Examineur
B. JAOUADI	Professeur, CBS, Université de Sfax, TUNISIE	Invité

Blida, Novembre 2023

الملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة قدرة سلالة بكتيرية "NIJ" محبة للحرارة ومفككة للهيدروكربونات والتي عزلت من التربة الملوثة بالنفط الخام في منطقة حاسيمسعود جنوب الجزائر في إنتاج إنزيمات البروتياز وانتاج مواد مخفضة للتوتر السطحي البيولوجي وكذا تطبيقها في معالجة النفايات المعقدة. للقيام بذلك، تم إجراء مراقبة نشاط التحلل ونمو البكتيريا وإنتاجها لمخفضات التوتر السطحي الحيوي. بينت النتائج أن هذه السلالة تتبع نوع *Bacillus atrophaeus* كما سمح الرافق الذي يحتوي على العامل الحيوي بتخفيض كبير لـ TS إلى 29 ملي نيوتن/متر، و E_{24} بنسبة 82٪. تم الحصول على مورد قدره 1.65 غلتر⁻¹ من مواد مخفضة للتوتر السطحي البيولوجي بـ CMC قدره 2.5 غ/لتر بعد الاستخلاص باستخدام الأسيتون.

أظهرت المادة الحيوية المنتجة ثباتاً جيداً في ظلال ظروف طرفية : درجة الحموضة (2-12)، والملوحة (10 - 100 غ. لتر⁻¹) ، و درجات الحرارة (4 - 100 درجة مئوية). الجزيء الحيوي الذي تم الحصول عليه ينتمي إلى عائلة الجليكوليبيدات بناءً على تحليل مجموعاتها الوظيفية التي كشف عنها التحليل الطيفي لأشعة تحت الحمراء. بالنسبة للجزيء الحيوي الثاني، أسفرت التنقية المستخدمة عن محلول إنزيمي متجانس بكتلة جزيئية واضحة تبلغ 28 كيلودالتون حددتها SDS-PAGE ويتم الحصول على النشاط الأمثل لتحلل البروتين عند درجة الحموضة 11 و 70 درجة مئوية، علماً كازين. وهو إنزيم ينتمي إلى عائلة سيرين بروتياز لأنه يتم تثبيطه بشكل أساسي بواسطة PMSF و DFP يتم تحسين نشاطها الحراري واستقرارها بشكل كبير بواسطة الكالسيوم عند 2 ملي مول. يُظهر البروتياز المسمى SAPNIJ ، نشاطاً جيداً واستقراراً وتحملاً في وجود العديد من المواد الخافضة للتوتر السطحي ، ومواد التبييض ، وعوامل إعادة التكوين ، وبعض المنظفات التجارية السائلة والصلبة بالإضافة إلى ذلك يحسن بروتياز SAPNIJ المضاف إلى المحلول المنظف PRIL-ISIS في إزالة لون بقع الدم بشكل أفضل.

تنمو سلالة NIJ بشكل جيد جداً في وسط مشكل من النفايات المعقدة، ولهذا الغرض فقد درسنا تنقية بيولوجية عن طريق استخدام السلالة المذكورة، تتجاوز نتائج معاملات التلوث الرئيسية نسبياً القيم الحدية للتصريفات المباشرة في البيئة المستقبلية: لتر/ ملغ COD = 2146 ، لتر/ ملغ، $DBO_5 = 1470$ ، لتر/ ملغ MES = 450.2 بعد العلاج و التنقية

تجدر الإشارة إلى وجود انخفاض واضح في هذه المعاملات : لتر/ ملغ COD = 150 ، $DBO_5 = 231$ ، لتر/ ملغ / لتر و MES = 130 لتر. ستسمح لنا القدرة الهائلة لسلالة NIJ على إنتاج مركبين ذو أهمية بيئية باختيارها كمرشح ممتاز في مجال المعالجة البيولوجية لمياه الصرف الصحي المحملة بالتلوث المعقد من مختلف الأنواع.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus atrophaeus* NIJ، البروتياز ، مخفض السطح الحيوي، النفايات المركبة مواد التنظيف.

Résumé

L'objectif de ce présent travail est d'étudier la double production d'enzyme protéolytique et de biosurfactant par une souche hydrocarbonoclaste thermophile isolée à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud, sud de l'Algérie ainsi que leurs applications dans le traitement d'un rejet complexe riche en protéines et hydrocarbures. Pour ce faire, des suivis d'activité protéolytique, de croissance bactérienne et de production d'un biosurfactant ont été réalisés. Les résultats obtenus nous ont montré que la souche NIJ est identifiée comme *Bacillus atrophaeus* capable de produire une enzyme protéolytique et un biosurfactant. Le surnageant contenant le biosurfactant a permis une réduction significative de TS à 29 mN.m^{-1} et E_{24} de 82%. Après extraction par l'acétone, un rendement de $1,65 \text{ g.L}^{-1}$ du biosurfactant est obtenu avec une concentration micellaire critique (CMC) de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$. Le biosurfactant produit a montré une bonne stabilité dans des conditions extrêmes : pH (2 – 12), salinité ($10 - 100 \text{ g.L}^{-1}$) et températures (4 – 100°C). La biomolécule obtenue est de nature glycolipide en se basant sur l'analyse de ses groupements fonctionnels révélés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Pour la deuxième biomolécule, les techniques de purification utilisées ont permis d'aboutir une enzyme protéolytique ayant une masse moléculaire apparente de 28 kDa déterminée par SDS-PAGE. L'optimum de l'activité protéolytique est obtenu à pH 11 et à 70°C , sur la caséine. Il s'agit d'une enzyme appartenant à la famille des protéases à sérine du fait qu'elle est inhibée essentiellement par la PMSF et le DFP. Sa thermoactivité et thermostabilité sont considérablement améliorées par le calcium à 2 mM. La protéase, appelée SAPNIJ, montre une bonne activité, stabilité et tolérance en présence de divers surfactants, des tensioactifs, des agents de blanchiments, des agents de redéposition, et certains détergents commerciaux liquides et solides. Egalement l'ajout de la protéase SAPNIJ à la solution détergente améliore les performances de détergent Pril-iSi dans le sens d'une meilleure décoloration des taches du sang.

La souche NIJ se développe très bien dans le rejet complexe (rejet d'égout + rejet de lavage), à cet effet nous avons envisagé un traitement biologique sur ce rejet. Avant le traitement les résultats des paramètres majeurs de pollution dépassent relativement les valeurs limites des rejets: DCO = 2146 mg/L , DBO5 = 1470 mg/L et MES = 450.2 mg/L . Après le traitement, Il est à noter qu'il y a une nette diminution dans ces paramètres : DCO = 150 mg/L , DBO5 = 231 mg/L et MES = 130 mg/L .

La capacité de la souche NIJ de produire deux biomolécules a une importance environnementale dans le domaine de traitement des rejets complexes.

Mots clés: *Bacillus atrophaeus* NIJ, Enzymes protéolytiques, Biosurfactant, Rejet complexe, Détergence.

Abstract

The objective of this work is to study the power of a bacterial strain "*Bacillus atrophaeus* NIJ" isolated from soils contaminated by crude oil in the region of Hassi-Messaoud, southern Algeria to produce enzymes proteolytics and biosurfactants and their applications in the treatment of complex rejection. To do this, monitoring of proteolytic activity, bacterial growth and production of a biosurfactant was carried out. The supernatant containing biosurfactant permitted a significant reduction of TS to 29 mg.L^{-1} , E_{24} equal 82%. A biosurfactant yield of 1.65 g.L^{-1} was obtained with a critical micellar concentration (CMC) of 2.5 g.L^{-1} after extraction using acetone. The biosurfactant produced showed good stability under extreme conditions: pH (2 – 12), salinity (10 – 100 g.L^{-1}), and temperatures (4 – 100°C). The biomolecule obtained is surfactin in nature based on the analysis of its functional groups revealed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). As for the second biomolecule, the purification techniques used resulted in a homogeneous enzymatic solution with an apparent molecular mass of 28 kDa determined by SDS-PAGE. Optimum proteolytic activity is obtained at pH 11 and 70°C, on casein. It is an enzyme belonging to the family of serine proteases because it is inhibited mainly by PMSF and DFP. Its thermoactivity and thermostability are considerably improved by calcium at 2mM. The protease, called SAPNIJ, shows good activity, stability and tolerance in the presence of various surfactants, bleaches, redispersion agents, and certain liquid and solid commercial detergents. Also adding the SAPNIJ protease to the detergent solution improves the performance of the Pril-iSiS detergent with better blood stains discolouration. The NIJ strain develops very well in complex rejection (slaughterhouse rejection + washing rejection), for this purpose we have considered a biological treatment (via the culture of the said strain) on this rejection. Before treatment, the results of the major pollution parameters relatively exceed the limit values for direct discharge into the receiving environment: COD = 2146 mg/L , DBO_5 = 1470 mg/L and MES = 450.2 mg/L . After the treatment, it should be noted that there is a clear decrease in these parameters: COD = 150 mg/L , DBO_5 = 231 mg/L and MES = 130 mg/L .

The power of bacterial strain NIJ to produce two biomolecules has importance environmental in the treatment of complex rejects.

Keywords: *Bacillus atrophaeus* NIJ, Proteolytic enzymes, Biosurfactant, Complex rejection, Detergence.

REMERCIEMENTS

الحمد لله رب العالمين

Nous tenons à remercier en premier lieu **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné le courage et la santé afin d'achever ce présent travail de thèse.

Ce travail a été réalisé en grande partie au sein du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes (LBMIE) au Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Sfax, TUNISIE, sous la direction scientifique de Monsieur le **Professeur Abdelmalek BADIS**, Professeur à l'Université Blida 1 et chercheur au Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) à Bou Ismaïl, Tipaza (Algérie). Ce travail entre dans le cadre du Projet de Recherche Conjoint bilatéral Algéro-Tunisien 2012-2016_Code : TA/04/2012_Acronyme : TNDZ-MicroZymes JAOUADI/BADIS entre le LBMIE-CBS, le CNRDPA et l'Université de Blida 1 (Laboratoire de Génie Chimique). Intitulé du projet : «*Criblage, étude biochimique et moléculaire, amélioration et application industrielle et environnementale de protéases et peroxydases de microorganismes pour la détergence, la tannerie et le biotraitement des eaux de mer polluées*» sous la coordination scientifique du Professeur BADIS Abdelmalek (côté Algérien) et Pr. Bassem JAOUADI (côté Tunisien). L'autre partie de travail a été réalisée dans le Hall technologique de l'Université Yahia Fares de Médéa, ALGERIE.

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à Monsieur le Professeur Abdelmalek BADIS, qui m'a encadré tout au long de ce travail, et qui m'a accordé sa confiance et d'avoir fait bénéficier de son expérience et de ses connaissances scientifiques. Merci pour votre patience inébranlable, vous n'aurait pas pu voir le jour.

J'adresse mes remerciements à Monsieur **BOURAS Omar**, Professeur à l'Université Blida 1, pour m'avoir honoré d'accepter de présider le jury de ma thèse et de juger ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs et sincères remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse :

Madame **FERHAT Samira**, Professeur à l'université Yahia Fares de Médéa, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinatrice de ce travail de thèse. Je souhaite également témoigner ma reconnaissance pour ses encouragements.

Madame, Maître de conférences (A) à l'Université Blida 1, pour l'honneur et le privilège qu'elle m'a accordé en acceptant d'être examinatrice et de juger ce travail.

Monsieur **KOURDALI Sidali**, Maître de recherche A, CNRDPA(Bousmail), de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ma thèse et de juger ce modeste travail.

Monsieur **JAOUADI Bassem**, pour l'honneur et le privilège qu'il m'a accordé en acceptant d'être invité et de juger ce travail, et surtout pour son aide précieuse, ses conseils et ses encouragements.

Je tiens également à exprimer mes sincères et vifs remerciements à toute l'équipe du département de génie des procédés de l'université Saad DAHLAB Blida 1, particulièrement à **Dr. HADJI Moundher**, pour leur aide, leur soutien, et encouragements.

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble de l'équipe du Laboratoire de chimie des substances naturelles et biomolécules, particulièrement à **Dr. Eddouaouda kamel** pour sa participation active dans la rédaction et la correction de la thèse.

Mes plus vifs remerciements sont également adressés à l'ensemble d'enseignants du Département De Génies Des Procédés de l'Université Yahia Fares de Médéa.

Je tiens à remercier infiniment Monsieur le **Professeur Sami SAYADI**, Directeur Général du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) et le **Professeur Samir BEJAR**, Directeur du LBMIE-CBS, pour leur accueil et leurs encouragements.

Enfin, je remercie ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

DÉDICACES

Je dédie ce travail à mes très chers parents que dieu protège

A mon mari

A mes enfants Abd Elmoumèn et Issam

A ma fille et ma petite princaice Lina

A mes frères Mustafa ,Omar et Zakaia

A ma sœur Amira et sa petite Farah

qui ont su croire en moi et qui m'ont soutenu tout au long de mes études.

TABLE DES MATIERES

Résumé	2
REMERCIEMENTS	5
DÉDICACES	7
TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	11
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	18
1.1. Les bactéries du genre Bacillus	18
1.1.1. Systématique	18
1.1.2. Caractères bactériologiques	18
1.1.3. Les techniques d'identification	20
1.1.4. Approche moléculaire	21
1.1.5. Bacillus atrophaeus	22
1.2. Production de biosurfactant	23
1.2.1. Généralités sur les surfactants	23
1.2.2. Définition des biosurfactants	24
1.2.3. Classification de biosurfactants	25
1.2.4. Microorganismes producteurs de biosurfacta	30
1.2.5. Rôles physiologiques des biosurfactants dans les microorganismes	30
1.2.6. Propriétés de biosurfactant	31
1.2.7. Méthode de criblage des souches produisant des biosurfactant	34
1.2.8. Paramètres influençant la production	35
1.2.9. Extraction et séparation de biosurfactant	37
1.2.10. Les avantages et les inconvénients des biosurfactant	38
1.3. Production de protéas	39

1.3.1 Définition des protéases	39
1.3.2. Marché mondial des enzymes	40
1.3.3. Origine des protéases	40
1.3.4. Nomenclature et classification des protéase	42
1.3.5. Les microorganismes protéolytiques	46
1.3.6. Mécanisme d'actions des protéases	47
1.3.7. Les paramètres affectant l'activité enzymatique	47
1.3.8. Propriétés des protéases	48
1.3.9. Moded'action des sérines protéase	48
1.4. Applicationsde biosurfactants et des protéase	49
1.4.1. Applications de biosurfactant	49
1.4.2. Application des protéases	52
CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES	61
2.1 .Produits chimiques et additifs	61
2.2. Milieux de culture	62
2.3. Criblage de la souche bactérienne à double production (Biosurfactant – Enzyme)	62
2.3.1. Origine des souches criblées	62
2.3.2. Conservation des souches	62
2.3.3. Criblage des souches à double activité de production (BS-ENZ)	62
2.4. Identification de la meilleure souche à double activité de production (BS-ENZ)	63
2.4.1 Etudes morphologique, physiologique et biochimique de la souche NIJ	63
2.4.2. Taxonomie moléculaireparle séquençage de l'ARNr 16S	64
2.5. Production, optimisation et caractérisation de biosurfactant et d'enzyme en batc	64
2.5.1. Cinétique de croissance	65
2.5.2. Production de biosurfactant	65
2.5.3. Production d'enzyme de type protéase	68
2.6. Applications biotechnologiques	74
2.6.1. Application en détergence	74
2.6.2. Dépollution d'un rejet liquide complexe	76

2.7. Méthodes de mesures, dosages et analytiques	77
2.7.1. Méthodes de mesures et de dosages	77
2.7.2. Méthodes analytiques	79
CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSIONS	81
3.1. Identification de la souche NIJ	81
3.1.1. Identification phénotypique	81
3.1.2. Taxonomie moléculaire (identification moléculaire par la technique de l'ARN 16S)	82
3.2. Production de biosurfactant	85
3.2.1. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactant	85
3.2.2. Criblage des hydrocarbures ou des huiles pour d'index d'émulsion	86
3.2.3. Optimisation des conditions de production du biosurfactant	87
3.2.4. Caractérisation de biosurfactant (BS NIJ)	91
3.3. Production d'enzyme « protéase »	96
3.3.1. Criblage des souches bactériennes sécrétrices de protéases	96
3.3.2. Optimisation de la production de protéases par la souche NIJ	97
3.3.3. Cinétique de croissance et de production de protéase par la souche NIJ	101
3.3.4. Purification de la protéase « nommée SAPNIJ » produite par la souche de Bacillus sp. NIJ	103
3.3.5. Caractérisation biochimique des préparations enzymatiques	108
3.4. Applications biotechnologiques de la souche NI	121
3.4.1. En détergences	121
3.4.2. Application dans la dépollution d'un rejet complexes	126
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	134
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	137
ANNEXE	157

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Arbre phylogénétique basée sur l'alignement des gènes de l'ARNr 16S	20
Figure 1.2	Structure simplifiée d'un biosurfactant .	26
Figure 1.3	Structure de di-rhamnolipide produit par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	27
Figure 1.4	Structure du tréhalose lipide produit par <i>Rhodococcus erythropolis</i>	28
Figure 1.5	Structure des formes lactonisé et d'acide des sophorolipides.	28
Figure 1.6	Structure de la surfactine produite par <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 .	29
Figure 1.7	Variation de la tension interfaciale, de la tension de surface et la solubilité en fonction de la concentration du biosurfactant .	33
Figure 1.8	Représentation du marché mondial des enzymes .	41
Figure 1.9	Schéma représentant la nomenclature des peptidases .	44
Figure 1.10	Proportions des différents composants des détergents.	56
Figure 2.1	Procédure de production et extraction de biosurfactant..	70
Figure 3.1	Photo de la souche NIJ sur milieu solide.	86
Figure 3.2	Analyse du produit PCR de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche NIJ	87
Figure 3.3	Carte de restriction du plasmide pHL-16S (4522 pb).	88
Figure 3.4	Séquence nucléotidique du gène d'ARNr 16S (4522 pb) de la souche NIJ.	88
Figure 3.5	Arbre phylogénétique obtenu après alignement du gène de l'ARNr 16S de la souche NIJ (numéro d'accès : MG890424) avec la banque de données GenBank BLAST.	89
Figure 3.6	Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactant.	91
Figure 3.7	Cinétique de production de biosurfactant par la souche NIJ	95
Figure 3.8	Spectre infrarouge du biosurfactant produit par la souche NIJ.	97
Figure 3.9	Effet de température sur la stabilité de biosurfactant produit par la souche NIJ	98
Figure 3.10	Influence du pH sur la stabilité du biosurfactant produit par la souche NIJ	99
Figure 3.11	CMC du biosurfactant produit par la souche NIJ	101
Figure 3.12	Mise en évidence de l'activité protéolytique produite par la	102

souche bactérienne NIJ sur gélose nutritive au lait.

Figure 3.13	Cinétique de production de protéase et de croissance bactérienne de la souche NIJ	107
Figure 3.14	Profil d'élution de la fraction active (Temps de rétention = 12.525 min) après sortie d'une chromatographie sur une colonne	109
Figure 3.15	Estimation de la taille de la protéase SAPNIJ sur SDS-PAGE à 12 %	111
Figure 3.16	Effet du pH sur l'activité de l'enzyme SAPNIJ.	113
Figure 3.17	Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme SAPNIJ	114
Figure 3.18	Effet de la température sur l'activité protéase SAPNIJ.	115
Figure 3.19	Etude de la thermostabilité de l'enzyme SAPNIJ.	116
Figure 3.20	Effet des polyols sur la thermostabilité de l'enzyme SAPNIJ.	121
Figure 3.21	Effet combiné du calcium et de PEG1500 sur la thermostabilité de l'enzyme SAPNIJ.	122
Figure 3.22	Etude de la stabilité de la protéase SAPNIJ en présence des détergents	129
Figure 3.23	Performances des protéases SAPNIJ et Alcalase Ultra 2,5 L dans le détergent liquide commerciale Ariel à 7 mg/ML.	130
Figure 3.24	Cinétique de production de biosurfactant par <i>Bacillus atrophaeus</i> NIJ sur milieu complexe.	131
Figure 3.25	Production de protéase par la souche <i>Bacillus atrophaeus</i> NIJ dans le rejet complexe, rejet d'abattoir et rejet de laiterie	134
Figure 3.26	Variation de la valeur de la DCO avant et après traitement avec les souches NIJ	136
Figure 3.27	Variation de la valeur de la DBO ₅ avant et après traitement avec les souches NIJ	137

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1	Valeurs de la E ₂₄ du surnageant pour chaque substrat (T _{incub} = 45°C, pétrole brut (2%, v/v), t _{incub} = 48 h, 200 tr/min	91
Tableau 3.2	Effet de la nature de la source de carbone sur la production du biosurfactant de la souche NIJ. (source de carbone : 2%,v/v, T _{incub} = 45°C, t _{incub} = 48 h, 200 tr/min	92
Tableau 3.3	production du biosurfactants avec des différentes concentrations du pétrole	93
Tableau 3.4	Effet de la nature de la source d'azote sur la production des biosurfactants par la souche NIJ	94

Tableau 3.5	Influence de la concentration de la source d'azote sur la production de biosurfactants par la souche NIJ.	95
Tableau 3.6	Groupements caractéristiques du biosurfactant	96
Tableau 3.7	Effet de la salinité sur l'efficacité du biosurfactant produit par la souche NIJ	100
Tableau 3.8	Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de protéase par la souche NIJ	103
Tableau 3.9	Optimisation de la concentration de la caséine pour la croissance et la production de protéase par la souche NIJ.	104
Tableau 3.10	Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéases par la souche NIJ.	105
Tableau 3.11	Optimisation de la concentration de l'extrait de levure sur la croissance bactérienne et sur la production de protéases par la souche NIJ.	105
Tableau 3.12	Bilan de la purification à homogénéité de la protéase SAPNIJ	110
Tableau 3.13	Alignement de la séquence NH ₂ -terminale de la protéase SAPNIJ avec celles d'autres protéases	112
Tableau 3.14	Effet de différents inhibiteurs et des agents réducteurs sur la stabilité de la SAPNIJ.	118
Tableau 3.15	Effet des ions métalliques sur la stabilité de la SAPNIJ	119
Tableau 3.16	Spécificité de la protéase SAPNIJ vis-à-vis des substrats.	124
Tableau 3.17	Détermination des paramètres cinétiques de la protéase SAPNIJ.	126
Tableau 3.18	Effet de certains détergents sur la stabilité enzymatique	128
Tableau 3.19	Valeurs de l'activité protéolytiques, la croissance bactérienne et la variation de pH, dans les rejets traités	133
Tableau 3.20	Analyses physico-chimiques des eaux de rejet d'abattoir du lavage	135

Listes des symboles et des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARDRA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

ARN : Acide ribonucleique

ARN_r : Acide ribonucleique ribosomique

CMC : Concentration micellaire critique

COT : Teneur en carbone organique total

DBP : Double production biosurfactant et protéase

DBO5 : Demande Biochimique En Oxygène

DCO : demande chimique en oxygène

DDP : Diamètre de déplacement du pétrole

DO: Densité optique

Dyne/cm: Dynes par centimètre

E₂₄ : Indice d'émulsification

FTIR: Infra rouge avec transformé de fourrier

GNL : Gélose nutritive au lait

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

LB : Luria Bertani (milieu de culture).

MES : Matières En Suspension

MMS : Matières Minérales

MO : Matière Organique

MVS : Matières Volatiles En Suspension

MM : milieu de culture minéral

NIJ : Souche bactérienne

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG : Polyéthylène glycol

Phe (F) : Phénylalanine

PMSF : Phénylméthylsulfonyl fluorure ou «Phenylmethysulfonylfluoride»

SAPNIJ : Sérine protéase de la souche NIJ

SDS: Sulfate Dodecyl Sodium

TS : Tension de surface

U : Unité Enzymatique Internationale

UV : Ultraviole

INTRODUCTION GENERALE

Chaque jour la pollution de notre environnement augmente à cause des activités industrielles contribuant à la destruction des milieux terrestres et marins. Ce changement a un impact sur la société, la santé humaine, l'économie, les espèces vivantes, la production alimentaire, et l'écologie. C'est pourquoi l'homme exploite les capacités des systèmes biologiques en vue d'améliorer son existence et le monde dans lequel il vit. Sans doute, les biotechnologies ont vu le jour il y a des milliers d'années, quand l'homme a commencé à sélectionner des traits spécifiques chez certains végétaux et à fabriquer des aliments à l'aide de microorganismes. Les biomolécules demeurent les outils clés de la biotechnologie. Parmi ceux-ci, l'emploi des biosurfactants et d'enzymes.

En Algérie, la pollution des sols par les hydrocarbures est inquiétante suite au développement de l'industrie pétrochimique et l'installation de nombreuses stations de service et de pipes souterraines. Bien que des progrès substantiels soient accomplis ces dernières années pour réduire les rejets industriels à l'origine de pollutions chroniques et des accidents de pollution (déversements accidentels ou rejets non contrôlés dus à des pratiques inadéquates d'entreposage de résidus industriels, des fuites de réservoirs souterrains, des ruptures d'oléoducs,...) qui se produisent toujours d'où le nombre de sites contaminés est devenu considérable [1]. Par conséquent, la prise de conscience de danger que constituent les sols contaminés pour l'environnement a permis d'élaborer une série de réglementations préventives, regroupées dans la loi 03-10 du 19 juillet 2003 relative à la protection de l'environnement dans le cadre du développement durable. Cette loi définit les obligations pour la protection des sols et des eaux souterraines incluant la décontamination des sites pollués.

De même les biosurfactants constituent des outils naturels très intéressants dans beaucoup d'applications industrielles et environnementales, et peuvent être envisagés comme remplaçants aux surfactants chimiques vu leur biodégradabilité, biocompatibilité et leur faible toxicité et leur pouvoir émulsifiant et moussant.

Depuis les années 80, un grand intérêt est accordé pour des microorganismes appartenant à divers genres (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, etc.) utilisant des hydrocarbures, des huiles végétales ou minérales comme seule source de carbone et

d'énergie pour leur croissance [2]. Il a été démontré que ces microorganismes libèrent leurs propres agents surfactants dans le milieu, facilitant ainsi la désorption des nutriments dans la matrice du sol ou leur dispersion dans l'eau [2]. Ces surfactants biologiques appelés "biosurfactants" améliorent l'accès et confèrent ainsi grâce à leur structure amphiphile un avantage compétitif aux souches microbiennes qui les sécrètent. Parmi d'autres, nous pouvons citer les glycolipides produits par des souches des genres *Halomonas*[3] et *Pseudomonas* [4], des polysaccharides produits par des souches de *Pseudoalteromonas*[5] et des lipopeptides produits par des souches appartenant au genre *Bacillus* [6]. En termes d'abaissement de la tension interfaciale ou superficielle, de stabilité thermique et chimique. Par conséquent, l'application environnementale de biosurfactants s'est révélée prometteuse en raison de la solubilisation de composés à faible solubilité, de la faible toxicité observée et de son efficacité à améliorer labiodégradation[7].

Les biocatalyseurs demeurent les outils clés de la biotechnologie. Parmi ceux-ci, l'emploi d'enzymes industrielles. Ces biocatalyseurs sont des protéines extraites à partir de microorganismes, de végétaux et d'animaux. Elles peuvent être utilisées pour catalyser biologiquement des réactions chimiques avec beaucoup d'efficacité et de spécificité. Ainsi, par rapport aux procédés chimiques conventionnels, les procédés biocatalytiques consomment normalement moins d'énergie, produisent moins de perte et sont moins polluants puisqu'ils utilisent moins de solvants organiques[8].

Actuellement, les protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et le plus utilisé en biotechnologie industrielle grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la substitution des agents chimiques toxique. En effet, ce groupe des hydrolases couvre 65% du marché total des enzymes. Toutefois, la part de ces protéases dans le marché mondial est essentiellement dominée par les protéases alcalines microbiennes [9], particulièrement du genre *Bacillus*[10] et *Streptomyces*, avec 40% de ce marché [11]. Ces enzymes sont d'une grande importance économique, en considérant les applications industrielles multiples dans lesquelles elles sont impliquées. Ce type d'enzymes est utilisé essentiellement dans les détergents pour les lessives, les tanneries pour le traitement de cuir, l'industrie pharmaceutique pour la synthèse peptidique, le traitement des rejets industriels, dans le traitement de la soie et dans l'industrie

alimentaire. Les protéases sont également capables de catalyser la synthèse d'une liaison peptidique [12].

Ce travail de thèse s'est intégré dans le cadre d'un projet bilatéral, Algéro-Tunisien. Il s'est intéressé plus particulièrement à la production de biosurfactant et de la protéase par une souche bactérienne thermophile. En effet, ce présent travail a pour objectif d'étudier l'optimisation et la production de biosurfactant et de la protéase par une souche bactérienne thermophile isolée localement à partir d'un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers (région de Hassi-Messoud). La caractérisation et l'identification des deux produits biosynthétisés ont été envisagés, ainsi l'utilisation de la souche sectionnée dans le traitement biologique des eaux usées de deux rejets (abattoir de volailles et lavage de l'automobile).

Ce présent manuscrit est structuré en trois grandes parties:

La première, comporte une synthèse bibliographique portant sur l'intérêt des biosurfactants et d'enzymes dans le domaine de la biotechnologie, la production, les propriétés et le rôle des biosurfactants et d'enzymes.

La seconde, liée au matériel et méthodes, expose la démarche expérimentale qui a mené, au criblage, optimisation de la production, l'identification de la souche en question, la caractérisation des molécules produits, et des essais d'une dépollution de rejets complexes.

La troisième partie discute les résultats de la production, de la caractérisation du biosurfactant et d'enzyme et son application.

En dernier lieu, une conclusion générale qui synthétise les principaux résultats obtenus avec leurs mises en valeur ainsi que les perspectives avenir.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Les bactéries du genre *Bacillus*

1.1.1. Systématique

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des bacillacées (*Bacillaceae*), l'ordre des bacillales (*Bacillales*), la classe des bacilles (*Bacilli*) et le phylum des firmicutes (*Firmicutes*)[13]. Ces bactéries sont généralement des bacilles mobiles à Gram- positif, le plus souvent catalase et oxydase positive, sporulantes, aérobies ou aéro-anaérobies facultatives, et tirent leur énergie par respiration ou fermentation. Le genre *Bacillus* apparaît extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique [le % du GC des diverses espèces varie de 34 à 53] que phénotypique (type respiratoire, métabolisme des sucres, composition de la paroi, etc). Le genre *Bacillus* est très hétérogène et comprend au moins 36 espèces. Les *Bacillus* sont des germes de l'environnement dont l'habitat principal est le sol où ils joueraient un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote. La résistance des spores et la diversité physiologique des formes végétatives en font des bactéries très ubiquistes que l'on peut isoler du sol, de l'eau de mer, de l'eau douce ou de denrées alimentaires. Il en existe un grand nombre d'espèces avec des propriétés physiologiques très variés, à savoir les espèces thermophiles, mésophiles, psychrophiles, acidophiles et alcalinophiles [14].

1.1.2. Caractères bactériologiques

Caractéristiques macroscopiques

Les caractéristiques des colonies, des germes du genre *Bacillus*, obtenues sur milieu gélosé sont extrêmement variables. Pour l'opacité et la couleur, certaines souches produisent des pigments lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux particuliers (pigment rouge pour *Bacillus cereus*, pigment jaune pour *Bacillus fastidiosus*, pigment jaune, orange, brun ou rose pour *Bacillus subtilis*...).

Diversité du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* apparaît donc extrêmement hétérogène tant sur le plan phénotypique que génétique. Dans ce contexte, la variabilité du pourcentage G+C des

diverses espèces et l'analyse des ARNr 16S confirment cette hétérogénéité et montre que le genre *Bacillus* doit être scindé en plusieurs genres [15,16].

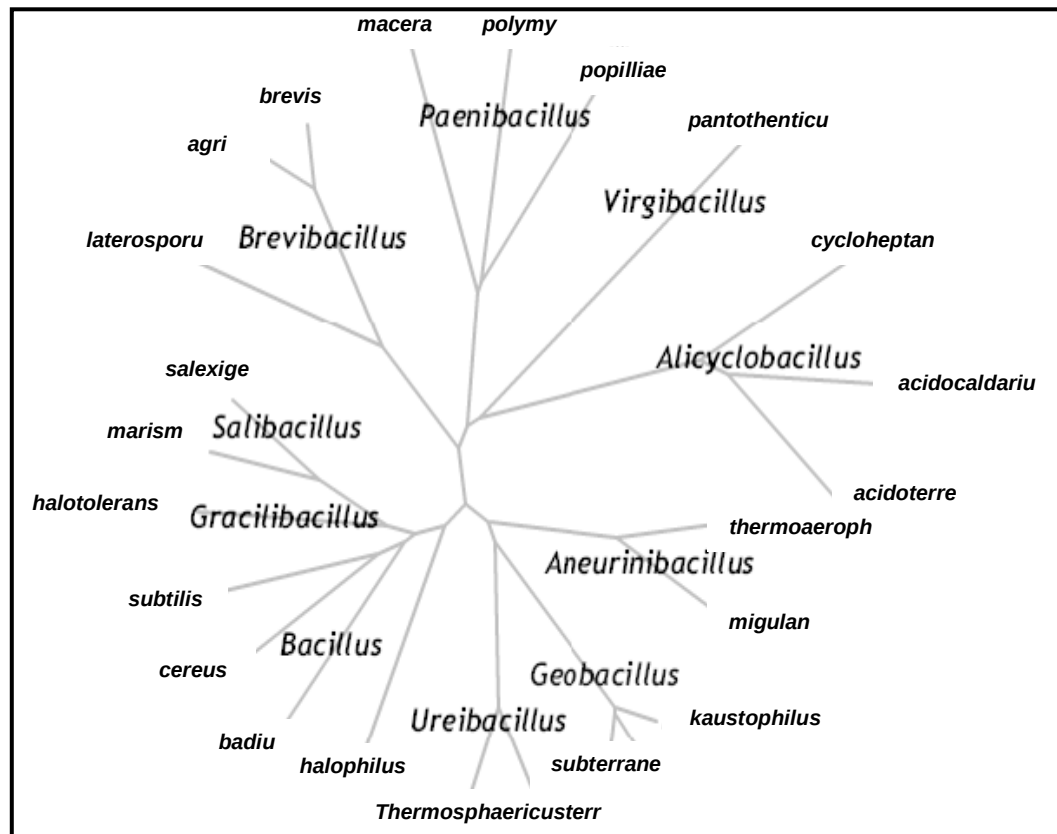


Figure 1.1: Arbre phylogénétique basée sur l'alignement des gènes de l'ARNr 16S [15,16].

La réorganisation de genre *Bacillus* a été initiée en 1992 par la création du genre *Alicyclobacillus* rassemblant trois espèces acidophiles et thermophiles. Ultérieurement ont été proposés et validés les genres *Paenibacillus* (1994), *Amphibacillus* (1995), *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Halobacillus* (1996), *Virgibacillus* (1998), *Gracilibacillus*, *Salibacillus* (1999), *Geobacillus*, *Marinibacillus*, *Ureibacillus*, *Filobacillus*, *Jeotgalibacillus* (2001) et *Lysinibacillus* (2007) qui tous rassemblent au moins une espèce ancestrale initialement incluse dans le genre *Bacillus*. La figure 1.1 représente l'arbre phylogénétique constituée à la base d'alignement des gènes de l'ARNr 16S. Cet arbre montre l'hétérogénéité génotypique à l'origine de laquelle le genre *Bacillus* a été réorganisé en au moins 10 nouveaux genres apparentés. Les genres *Amphibacillus*, *Filobacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Marinibacillus*, *Lysinibacillus* et *Halobacillus* sont également

constitués à partir d'espèces du genre *Bacillus*. Ainsi, le nombre de sous-genres descendant du genre *Bacillus* est actuellement de 15.

1.1.3. Les techniques d'identification

L'identification des bactéries se fait à la base des critères les plus vastes aux plus pointus pour aboutir à une espèce bactérienne donnée. Ces critères sont de types morphologiques, biochimiques et génétiques.

➤ Critères morphologiques

Les observations de la morphologie bactérienne permettent une orientation préliminaire pour identifier une bactérie. Ces observations peuvent être macroscopiques et concernent les caractéristiques d'une colonie isolée. Cependant, plus importants sont les observations microscopiques se faisant au microscope optique et concernent la forme et le mode de groupement ainsi que la coloration de Gram et la sporulation.[13].

Traditionnellement, les espèces du genre *Bacillus* sont réparties en 3 groupes selon la morphologie de la spore et du sporange [15]:

a- Groupe I

Ce groupe est constitué des bacilles à Gram positif, présentant une spore centrale ou terminale, sphérique, elliptique ou ovoïde, ne déformant pas la cellule. Ce groupe est divisé, microscopiquement, en 2 sous-groupes :

- Le sous-groupe IA constitué des bacilles d'undiamètre supérieur à 1 μ m et contenant des inclusions de poly- β -hydroxy butyrate (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*).

- Le sous-groupe IB rassemblant des bacilles d'undiamètre inférieur à 1 μ m et dépourvus d'inclusions de poly- β -hydroxy butyrate (*B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, etc).

b- Groupe II

Ce groupe est constitué des espèces à Gram variable, présentant une spore ovoïde, centrale ou terminale, déformante (*B. circulans*, *B. stearothermophilus*, etc).

c- Groupe III

Ce groupe est caractérisé par des bacilles à Gram variable et présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou sub-terminale (*B. globisporus*, *B. insolitus*, etc).

➤ Critères biochimiques

Les bactéries sont aussi identifiées systématiquement selon des critères biochimiques regroupant certaines aptitudes métaboliques. Chaque famille de bactéries a des propriétés métaboliques de base, comme l'oxydation du glucose en présence ou en absence d'oxygène ou encore la réduction des nitrates, selon lesquelles elles peuvent être classées et identifiées. On dispose souvent de galeries d'identifications biochimiques appelées les galeries API (Analytical Profile Index) dont chacune est réservée à un groupe de bactéries.

1.1.4. Approche moléculaire

Suite à la détermination de la structure de l'ADN par Watson et Crik en 1953, les études en bactériologie sont devenues notablement basées sur des techniques moléculaires plutôt que des aspects fonctionnels [17]. Les gènes de l'opéron de l'ARNr sont essentiels pour la survie de tous les organismes et ils sont hautement conservés particulièrement dans le règne bactérien. Par conséquent, la caractérisation de ces gènes et principalement le gène de l'ARNr 16S, est actuellement une méthode standard bien établie pour l'identification et la classification bactérienne sur les plans des familles et des genres [18]. En revanche, très peu de séquences des gènes 23S et 5S ont été reportés puisqu'elles ne sont pas communément utilisées pour des objectifs phylogénétiques.

a- Description de l'opéron des ARN ribosomaux

La transcription de l'opéron de l'ARNr donne lieu à un seul transcrit pre-ARNr qui contient dans l'ordre du 5' au 3' les séquences suivantes: ARNr 16S, spacer, ARNt, spacer, ARNr 23S, spacer et ARNr 5S. Ce transcrit est ensuite clivé en molécules d'ARNr et d'ARNt séparées. L'identification des bactéries par l'approche moléculaire nécessite l'amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S et/ou de la région intergénique 16S-23S appelée fréquemment ITS (Internal Transcribed Spacer). Pour ce faire, des régions conservées dans les gènes de l'ARNr 16S et 23S ont été mises en évidence pour servir comme des amorces d'amplification .

b- Le gène de l'ARNr 16S

Les gènes de l'ARNr 16S sont quasiment similaires en longueur pour tout le règne bactérien. En effet, une variation d'environ 200 pb au plus peut se percevoir pour une longueur moyenne de 1550 pb[19]. Ils contiennent des régions hautement conservées et quelques unes qui peuvent varier selon les familles et les genres. Leurs séquences nucléotidiques ne sont pas suffisamment divergentes pour donner une bonne discrimination entre les différentes espèces du même genre. Leur transcription produit des molécules d'ARN à structure secondaire très similaire [20].

Cependant, beaucoup d'espèces du genre *Bacillus* ont été classées en se basant sur l'alignement de séquences des gènes de l'ARNr 16S[15]. D'autres caractérisations des gènes de l'ARNr 16S aux niveaux génotypique et phénotypique ont abouti à la création de nouveaux genres à partir de certaines espèces de *Bacillus*; à titre d'exemples nous citons: *Amphibacillus*, *Paenibacillus*, *Filobacillus*, *Geobacillus*. Par ailleurs, le profil de restriction du gène de l'ARNr 16S a été utilisé comme un moyen rapide pour l'identification des espèces de *Bacillus* et des genres apparentés[21].

1.1.5. *Bacillus atrophaeus*

B. atrophaeus a été historiquement connu par plusieurs autres noms, y compris *B. globigii* (l'origine de son surnom militaire "BG") et *B. subtilis* var-Niger. Des analyses phylogénétiques modernes utilisant des méthodes génétiques multiples ont placé *B. atrophaeus* près de *B. subtilis*[22,23], Son utilisation originale et encore la plus importante est en tant qu'organisme de substitution pour *B. anthracis* pathogène [23], En commençant par le programme d'armes biologiques des États-Unis, car sa pigmentation facilitait facilement la discrimination d'organismes de base non pigmentés dans des échantillons environnementaux. Des analyses génomiques et phénotypiques ultérieures de souches issues des isolats de Camp Detrick ont révélé qu'elles avaient été délibérément sélectionnées pour des souches présentant des taux élevés de sporulation [22,24].

Bacillus atrophaeus est une bactérie Gram-positive, aérobie, formant endospore, dont la description est pratiquement identique à celle de *Bacillus subtilis* sauf pour la production d'un pigment sur un milieu contenant une source d'azote organique [25].

Bacillus atrophaeus est une espèce de bactéries pigmentées noires. Sa souche type est NRRL NRS-213 [25], Les souches *B. atrophaeus* ont été largement utilisées dans la biomédecine comme souches indicatrices pour les schémas de décontamination chimique

et thermique. La plupart des souches en usage sont des dérivés d'une lignée de *B. atrophaeus* qui sont nés à Camp Detrick dans les années 1950, où de nombreuses procédures modernes de bioconfinement ont été développées [26,27].

1.2. Production de biosurfactant

1.2.1. Généralités sur les surfactants

Les surfactants (Surface Active Agents) sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire (affinité pour l'eau) et d'une partie hydrophobe non polaire (affinité pour les lipides). Ils agissent préférentiellement à l'interface entre deux phases différentes telles que l'interface huile/eau. Cette propriété permet aux surfactants de réduire les tensions de surface et interfaciale [28]. Leur partie lipophile, comprenant généralement des acides gras saturés, insaturés ou hydrocarbonés dans le corps gras. Leur partie hydrophile, constituée par un acide aminé ou un peptide, des anions ou des cations, des mono-di-ou polysaccharides, s'immergent dans l'eau. Ces agrégats de molécules tensioactives ainsi formés s'appellent des micelles [29].

Selon la fonction qu'ils remplissent, les surfactants sont parfois appelés : détergents, stabilisateurs, agents dispersants, agents de solubilisation, agents mouillants, agents émulsifiants et agents moussants, agents antimicrobiens, agents antioxydants, etc [30].

Le classement le plus couramment utilisé des surfactants est basé sur la nature de la tête hydrophile et selon lequel on distingue quatre grandes classes :

- les cationiques qui possèdent une charge positive ;
- les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ;
- les non ioniques, sans charge ;
- les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre [31].

La partie hydrophobe des surfactants est constituée d'une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée de 8 à 18 atomes de carbone [32]. Elle influe sur la chimie du surfactant par son aromaticité, son nombre d'atomes de carbone ou son degré de ramification [31].

Le degré de ramification, la position du groupement hydrophile et la longueur de la chaîne hydrocarbonée sont autant des paramètres importants dans la spécification des propriétés physicochimiques des surfactants [32]

Dans la plupart des cas, les surfactants synthétiques, provenant des industries pétrochimiques et oléo-chimiques [33], sont des structures monomériques incluant les quatre groupes de charge cités ci-dessus [34]. Ils sont utilisés extensivement à grande échelle dans l'industrie, en particulier dans le domaine de détergence et dans le nettoyage des surfaces [33].

La production mondiale de surfactants chimiques se chiffre à plus de 18 millions de tonnes par année [35]. Les tensioactifs synthétiques sont des produits dérivés du pétrole et présentent 95% du marché international des surfactants en 2012 [35]. Cependant, ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont toxiques et non biodégradables [30]. C'est pour cette raison, et depuis plusieurs années, que les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants notamment les microorganismes, appelés biosurfactants. Ces derniers possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non ou faiblement toxiques, une stabilité dans des conditions extrêmes (température, pH et salinité), une diversité structurelle, une activité biologique (antibactériens, antifongiques et antivirales) et la possibilité de les produire à partir de ressources renouvelables [36,37].

1.2.2. Définition des biosurfactants

Les biosurfactants ou surfactants biologiques sont des composés chimiques structuralement variés produits par des micro-organismes. Ce sont des molécules amphiphiles contenant une partie hydrophile polaire, tête (soluble dans l'eau) et une partie hydrophobe non polaire (queue) (figure 1. 2). (acide gras saturé ou insaturé) [38]. C'est un groupe très hétérogène de métabolites secondaires synthétisés par une grande variété de microorganismes durant leur croissance sur des substrats de natures différentes [39,38]. Ils diminuent la tension de surface et la tension inter-faciale entre les molécules individuelles sur la surface et l'interface, respectivement et sont doués de diverses activités biologiques (antimicrobienne, antivirale, hémolytique, insecticide, anti-inflammatoire...) [39,40].

Contrairement aux surfactants synthétiques, les biosurfactants peuvent fonctionner efficacement dans des conditions extrêmes de température, de pH et de salinité [41]. En

outre, ils sont faiblement toxiques et facilement biodégradables. La diversité et l'importance de ces propriétés accroissent l'intérêt attractif de ces biosurfactants dans diverses industries et applications biotechnologiques [42].

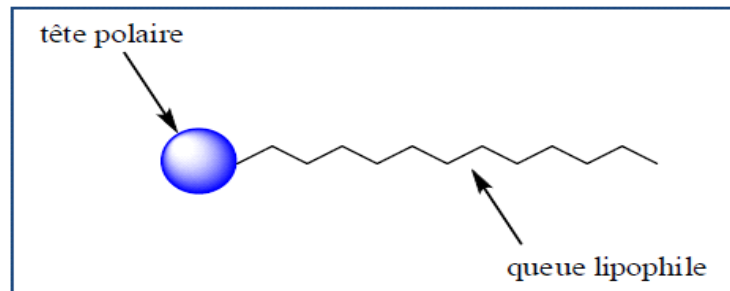


Figure 1.2: Structure simplifiée d'un biosurfactant [29].

1.2.3. Classification de biosurfactants

Contrairement aux tensioactifs chimiques, qui sont classés selon leur structure de dissociation dans l'eau (cationique, anionique, nonionique et amphotères), les biosurfactants sont classés :

1.2.3.1 Selon leur poids moléculaire

Selon leur poids moléculaire, les biosurfactants sont divisés en : [43]

- Faible masse moléculaire : les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides.
- Haute masse moléculaire : les polysaccharides amphiphiles, les protéines, les lipopolysaccharides, les lipoprotéines ou des mélanges complexes de ces biopolymères.

Les biosurfactants de faible poids moléculaire (glycolipides et lipopeptides) sont plus efficaces pour diminuer les tensions interfaciale et de surface, alors que les biosurfactants de haut poids moléculaire, connus sous le nom bioémulsifiants, (polysaccharides amphiphiles, protéines, lipopolysaccharides et lipoprotéines) sont des stabilisants efficaces (émulsion huile dans l'eau).

1.2.3.2. Selon leur composition biochimique

On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : glycolipides, lipopeptides, phospholipides, lipopolysaccharides et lipides neutres.

1.2.3.2.1. Glycolipides

De nombreux glycolipides, englobant des acides gras simples estérifiés à une fraction glucidique, ont été définis en fonction de différents micro-organismes [44]. Leur composition structurale diffère des sucres simples avec des substituants acides gras aux glucides complexes, qui peuvent être successivement liés à des composés aromatiques, des nucléosides ou des terpénoïdes, en plus d'avoir différents points de liaison à un, mono ou poly acides gras insaturés par des liaisons glycosidiques ou esters. Les structures glycolipidiques comprennent : les rhamnolipides, les sophorolipides, le mannosylérythritol, les lipides tréhalose et les xylolipides [30,44]. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides.

- Rhamnolipides

Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides qui sont principalement produits par des souches de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, bien que d'autres espèces, notamment de la famille Burkholderia comme *B. glumae*, *B. plantarii*, et *B. thailandensis* puissent aussi en produire [45]. Ils contiennent un ou plusieurs groupes rhamnose, représentant la tête hydrophile du biosurfactant et d'une ou deux chaînes lipidiques de tailles variables (figure 1.3). Dans des conditions in vitro, on sait qu'un excès de source de carbone (par exemple glucose, glycérol ou huiles de friture utilisés) et le stress avec de faibles niveaux d'azote, favorise la production de rhamnolipides. En fonction des espèces bactériennes productrices, les molécules produites seront différentes. Donc, il existe différentes voies biochimiques pour la synthèse des rhamnolipides.

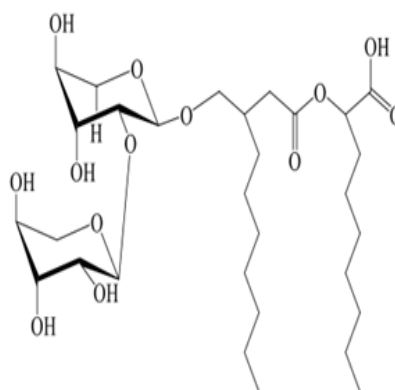


Figure 1.3: Structure de di-rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa* [46].

- Trehalolipides

Plusieurs types de structures de trehalolipides ont été rapportés (figure 1.4). Le trehalose disaccharide lié avec le carbone (C6) et le carbone (C6') est associé à la plupart des espèces des genres *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Corynebacterium*. Les acides mycoliques sont à longue chaîne, α - β -ramifiés-hydroxy-acides gras. La différence des Trehalolipides produits de différents organismes est basée sur la masse moléculaire et la structure des acides mycoliques, donc aux nombres d'atomes de carbone et le degré d'insaturation[47]. Les trehalose lipides produits par *Rhodococcus erythropolis* et *Arthrobacter* sp abaissent la tension superficielle et interfaciale de 25 à 40 et de 1 à 5 mNm⁻¹, respectivement [48].

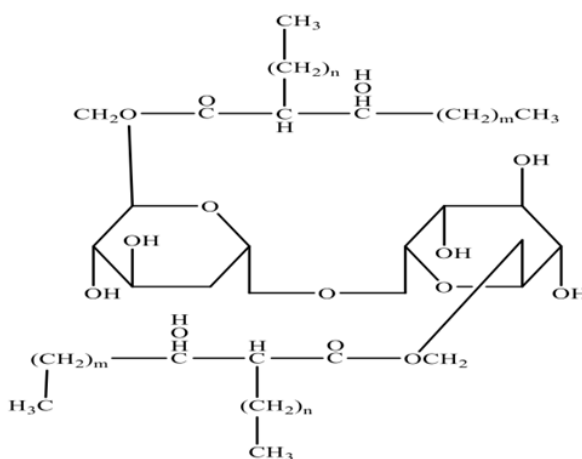


Figure 1.4: Structure du tréhalose lipide produit par *Rhodococcus erythropolis*[49].

- Sophorolipides

Elles sont produites principalement par des levures telles que *Torulopsis bombicola*[50,51]. Les surfactants produits par *T. petrophilum* et *T. apicola* se composent d'undimère sophorose glucides liée à une longue chaîne hydroxyle d'acides gras par liaisons glycosidique (figure 1.5). Généralement, les sophorolipides sont produits par un mélange de macrolactones et d'acides. Il a été démontré que la forme de sophorolipides est nécessaire, ou préférable pour de nombreuses applications [52]. Ces biosurfactants sont un mélange d'au moins six à neuf différents sophorolipides hydrophobes.

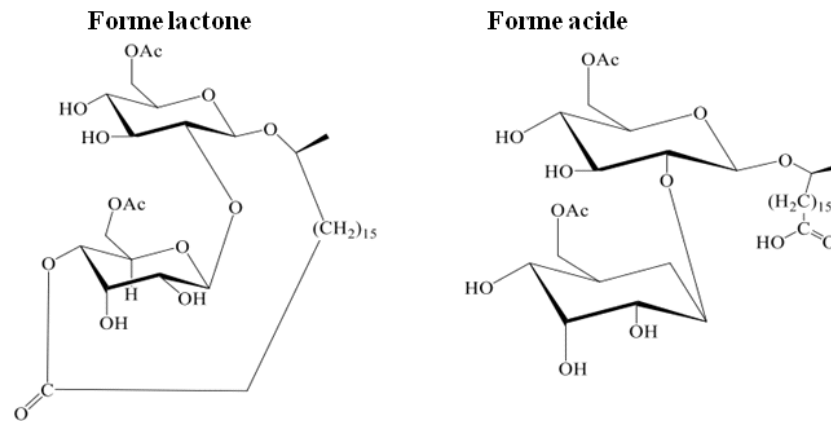


Figure 1.5: Structure des formes lactonisé et d'acide des sophorolipides[50,51]

1.2.3.2.2. Les lipopeptides et lipoprotéines

Un grand nombre de lipopeptides cycliques, y compris les antibiotiques décapeptides (gramicidines) et des antibiotiques lipopeptides (polymyxines) sont produites. Elles consistent en un attachement entre un lipide et une chaîne polypeptidique.

- Surfactin

La surfactine est un lipopeptide cyclique (figure1.6), produite par *Bacillus subtilis* ATCC21332. Il est composé d'une structure de sept acides aminés couplés à une chaîne d'acide gras par un lien lactone. Il abaisse la tension superficielle de 72 à 27,9 $mN.m^{-1}$ à de très faibles concentrations (0,005%) [53].

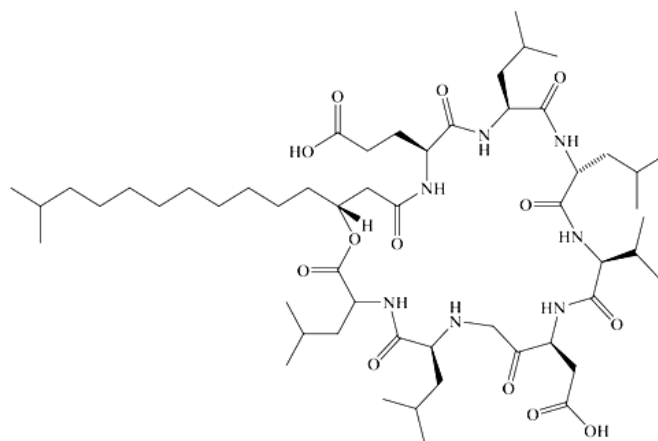


Figure 1.6: Structure de la surfactine produite par *Bacillus subtilis* ATCC 21332 [53].

- Lichenysin

L'espèce *Bacillus licheniformis* produit plusieurs biosurfactants qui présentent une excellente stabilité thermique et chimique. Ils sont similaires aux propriétés structurales et physico-chimiques du surfactin[54]. Les tensioactifs produits par *B. licheniformis* abaissent la tension superficielle de l'eau à 27 mNm^{-1} et la tension interfaciale entre l'eau et *n*-hexadecane à $0,36 \text{ mNm}^{-1}$.

1.2.3.2.3. Acides gras, phospholipides et lipides neutres

Plusieurs bactéries et levures produisent de grandes quantités d'acides gras et de tensioactifs phospholipidiques au cours de la croissance sur *n*-alkanes[55]. La balance hydrophile-lipophile (HLB) est directement liée à la longueur de la chaîne hydrocarbonée dans leurs structures. La souche *Acinetobacter*sp.HO1-N produit le phosphatidyléthanolamine[56], qui forme des micros émulsions optiquement claires des alcanes dans l'eau. Le phosphatidyléthanolamine produit par *Rhodococcus erythropolis* cultivée sur *n*-alkanes provoque un abaissement de la tension interfaciale entre l'eau et l'hexadécane à moins de 1 mNm^{-1} et une concentration micellaire critique (CMC) de 30 mg/l [57].

1.2.3.2.4. Les biosurfactants polymériques

Les biosurfactants mieux étudiés se sont les polymères : Emulsan, liposan, alasan, lipomanan et d'autres complexes polysaccharides-protéines. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 produit un bioémulsifiant efficace polyanionique hétéropoly saccharide[58]. Emulsan est un agent émulsifiant efficace pour les hydrocarbures dans l'eau [52], même à une concentration faible allant de 0,001 à 0,01%. Le liposan composé de 83% glucides et 17% protéines, est un émulsifiant d'eau soluble synthétisé par *Candida lipolytica*[58].

1.2.3.2.5. Les biosurfactants particuliers

Les biosurfactants particuliers jouent un rôle important dans l'absorption d'alcanes par les cellules microbiennes. Les vésicules produites par la souche *Acinetobacter*sp. HO1-N ont un diamètre de 20-50 nm et une densité de flottaison de $1,158 \text{ g/cm}^3$, ils sont composés de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharide[59].

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les biotensioactifs les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides [29,60].

1.2.4. Microorganismes producteurs de biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources decarbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures [61]. Ces micro-organismes sont en général des levures [62,63], des moisissures[64].ou des bactéries[61,65,66].

Les microorganismes producteurs de biosurfactants sont en généralement isolés à partir des sites contaminés (eau de mer douce et eau souterraine), milieux terrestres (le sol, les sédiments et les boues) par des substances hydrophobes comme le pétrole et ses dérivés [67,68].

1.2.5. Rôles physiologiques des biosurfactants dans les microorganismes

Dans un environnement donné (sol, eau ou sédiments), le microbiote a de nombreuses relations synergiques ou antagonistes. Afin de coloniser ces milieux, les bactéries ont un système de détection ; est un système de communication caractérisé par la sécrétion et la détection de molécules signal au sein d'unepopulation bactérienne. Les biosurfactants sont synthétisés en réponse à une stratégie écologique pour survivre sous différents stress physiques et chimiques par un système de détection spécifique régulé par des conditions environnementales ou nutritionnelles [66].

En effet, le rôle physiologique principal des biosurfactants est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension superficielle à la fin de la phase de croissance, rendant ainsi le substrat plus facilement accessible pour l'absorption et le métabolisme, quoique les mécanismes moléculaires liés à l'assimilation et le métabolisme de ces substrats ne soient pas toujours claires et ne sont pas bien compris [69].

Un autre rôle physiologique des biosurfactants est leurs activités antimicrobiennes vers des microorganismes divers. Généralement, plusieurs agents tensioactifs inhibent des microorganismes taxonomiquement différents. De plus, les biosurfactants ont été démontré pour être impliqués dans l'adhésion cellulaire (formation des biofilms) qui confèrent plus de stabilité dans des conditions environnementales hostiles et dans la virulence et la désorption cellulaire lorsque les organismes ont besoin de trouver de nouveaux habitats pour la survie [70].Egalement, la production de biosurfactants pourrait donc être un

avantage pour les microorganismes pour survivre dans des milieux contenant des produits toxiques [71].

Dans la quête d'une production biotechnologique de biosurfactants, il faut explorer la biodiversité microbienne des milieux afin d'isoler et d'identifier les souches microbiennes potentiellement productrices de biosurfactants, en utilisant des milieux sélectifs et différentiels, par des outils moléculaires et en s'assurant de leur activité par des dosages d'activité émulsion, tensioactive, hémolytique et dispersante [72].

1.2.6. Propriétés de biosurfactants

Les biosurfactants ont de meilleures propriétés moussantes et une plus grande sélectivité. Ils sont moins sensibles aux environnements extrêmes comme la température, le pH et la salinité. Ils sont biodégradables et non ou peu toxiques ce qui rend leurs applications environnementales intéressantes[70].

1.2.6.1. Activité à l'interface (et à la surface)

L'efficacité d'un biosurfactant est déterminée par sa capacité à réduire la tension de surface ; un bon biosurfactant peut diminuer la tension de surface (TS) de l'eau de 72 à 35 mN.m⁻¹ et la tension interfaciale (TI) eau/hexadécane de 40 à 1 mN.m⁻¹[73].

1.2.6.2. Concentration micellaire critique

La solubilisation d'un contaminant organique par un agent tensioactif dépend d'un processus appelé formation de micelles. En raison de sa nature amphiphile, une molécule de surfactant peut se dissoudre dans l'eau sous forme de monomère. Il s'adsorbe à l'interface ou est incorporé avec d'autres molécules de surfactant dans le cadre de la formation d'une micelle. Lorsque la concentration en biosurfactant est inférieure à une concentration spécifique, les molécules de surfactant existent principalement sous forme de monomères. La concentration à partir de laquelle les monomères commencent à former ces micelles, est définie comme la concentration micellaire critique (CMC). Les agrégats de molécules de surfactant micellaire créent un noyau hydrophobe moins polaire dans lequel sont logés des contaminants. Par conséquent, la solubilisation de contaminants est nettement augmentée[74].

La tension de surface est inversement proportionnelle à la quantité de biosurfactant, des concentrations élevées de ce dernier abaissent la tension de surface jusqu'à une valeur minimale et stable, appelée concentration micellaire critique (CMC). Au-delà de la CMC, les molécules de biosurfactant s'associent en solutions aqueuses pour former des micelles à l'intérieur desquelles vont pouvoir se solubiliser une grande variété de composés insolubles dans l'eau (figure 1.7)[75].

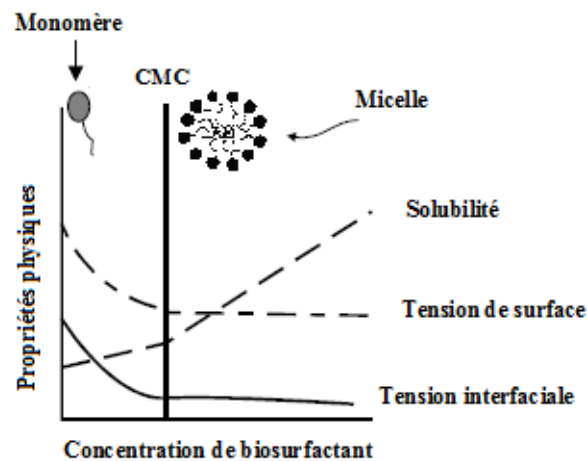


Figure 1.7: Variation de la tension interfaciale, de la tension de surface et la solubilité en fonction de la concentration du biosurfactant[75].

1.2.6.3. Biodégradabilité

Contrairement aux tensioactifs synthétiques, les biosurfactants sont des composés facilement biodégradables et particulièrement adaptés pour des applications environnementales telles que la bioremédiation des sites contaminés [74, 75].

1.2.6.4. Faible toxicité

Bien que peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la toxicité des surfactants microbiens, ils sont généralement considérés comme des produits peu ou non-toxiques et par conséquent, ils sont appropriés pour des usages pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et environnementaux. Il est à noter que la toxicité dépend de la structure des surfactants et non pas de leur origine. En générale, la toxicité est corrélée avec la chaîne grasse hydrophobe de surfactant ; plus la chaîne grasse est longue, plus l'hydrophobicité est élevée et par suite le tensioactif est plus toxique[70, 71].

1.2.6.5. Pouvoir émulsifiant

L'émulsion est un système hétérogène composé d'au moins un liquide non miscible intimement dispersé dans un autre sous forme de gouttelettes dont le diamètre dépasse en général 0,1 mm. La phase dispersée est aussi appelée phase interne ou discontinue, et la phase dispersante peut être appelée phase externe ou continue. Donc, il y a généralement deux types d'émulsions: huile-dans-eau ou eau-dans-huile, ces systèmes possèdent une stabilité minimale pouvant être accrue par des additifs tels que les agents actifs. Ainsi, des émulsions stables peuvent être produites durant des mois et même des années [76]. Les biosurfactants peuvent stabiliser (émulsifiants) ou déstabiliser de l'émulsion (démulsifiants). Les biosurfactants à haut poids moléculaire sont en général mieux que ceux à faible poids moléculaire. A titre d'exemple, les Sophorolipides de *Torulopsis bombicola* ont montré leur capacité à réduire les tensions de surface et interfaciale, mais ils ne sont pas de bons émulsifiants [77]. Par contre, le liposane a montré une mauvaise réduction de la tension de surface, mais il est utilisé avec succès pour émulsionner les huiles comestibles [55].

1.2.7. Méthode de criblage des souches produisant des biosurfactants

Les diverses applications de biosurfactants nécessitent une méthode facile, rapide et fiable pour découvrir les bactéries productrices des biosurfactants. Les techniques utilisées pour mesurer la production du biosurfactant sont : test d'hydrophobicité de la surface cellulaire, test de déplacement d'huile, l'activité hémolytique et la tension de surface. [72].

1.2.7.1. Test d'hydrophobicité de la surface cellulaire

L'hydrophobicité cellulaire est un facteur important pour prédire l'adhésion des microorganismes aux surfaces. Le caractère hydrophobe de la surface externe des cellules microbiennes pourrait être utilisé pour mesurer le potentiel de l'affinité des cellules pour les substrats hydrophobes. Si l'hydrophobicité cellulaire est élevée, les microorganismes ont plus de chance d'adhérer aux gouttelettes d'huile. Les cellules montrant une hydrophobicité élevée peuvent avoir un meilleur potentiel biodégradatif des hydrocarbures.

En plus de son rôle dans l'assimilation des hydrocarbures, l'hydrophobicité de surface des cellules joue un rôle important dans l'invasion bactérienne et l'infection, l'adhésion cellulaire, la formation de biofilm, etc. [78, 79].

1.2.7.2. Test de déplacement de pétrole (oil displacement test)

Cette technique est définie comme un test qualitatif de criblage des souches productrices de biosurfactants. Les solutions contenant plus de biosurfactant sont incapables de former des gouttes stables et par suite un étalement total est observé sur la surface huileuse, tandis que, les solutions dépourvues de biosurfactant vont conserver la forme déposée sur la surface huileuse. Cette méthode est facile à réaliser, simple, sensible et reproductible. Cependant, cette technique n'est pas corrélée à la réduction de la tension de surface pour confirmer sa fiabilité [80].

1.2.7.3. Activité hémolytique

L'hémolyse sur gélose au sang a été largement utilisée pour le criblage de bactéries productrices de biosurfactants. elle a été déjà utilisée pour quantifier la surfactine [81] et les rhamnolipides [82].

1.2.7.4. Tension de surface

Le phénomène de tension de surface peut être expliqué en termes d'énergie, c'est une mesure de l'énergie libre de surface par unité de surface nécessaire pour apporter une molécule au sein d'une phase à la surface. Augmenter la surface d'un liquide coûte de l'énergie, pour minimiser cette dernière, la plupart des liquides prennent la forme de la plus petite de surface. Car c'est la forme sphérique qui présente la surface la plus petite par rapport aux autres formes de volumes, en effet, la tension de surface est donnée par la relation :

$$\gamma = \frac{W}{\Delta A}$$

W: travail ou l'énergie qu'il faut fournir (à température et pression constantes) pour accroître la surface du liquide d'une quantité.

ΔA : La tension de surface s'exprime en J.m⁻² ou N.m⁻¹.

Le criblage des microorganismes producteurs de biosurfactants repose sur la mesure de tension superficielle du milieu de croissance, un bon biosurfactant entraîne une réduction minimale de la tension superficielle.

1.2.8. Paramètres influençant la production

Plusieurs paramètres influencent la production du biosurfactant, tels que les sources de carbone et d'azote, la température, la salinité, le pH, l'agitation et l'oxygène.

1.2.8.1. Source de carbone

La production des biosurfactants peut être réalisée en utilisant une large gamme de substrats carbonés hydrophiles de type carbohydrates [83,84] ou de substrats hydrophobes comme les huiles végétales et les hydrocarbures et ceci soit comme seule source de carbone [83], soit comme source supplémentaire [82]. Les sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont souvent utilisées pour produire les rhamnolipides ; cependant les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus en utilisant des substrats insolubles comme des n-alcanes ou de l'huile d'olive[85].

Il est également possible d'ajouter d'autres sources de carbone afin d'augmenter les rendements de production. Par ailleurs, Desai et Banat (1997) [29]. ont montré que l'ajout d'hexadécane dans le milieu constitué de glucose pendant la phase de croissance stationnaire améliore nettement le rendement de production.

1.2.8.2. Source d'azote

La source d'azote est un paramètre important dans la régulation de la synthèse de biosurfactants, certaines souches préfèrent les sels d'ammonium et l'urée comme source inorganique d'azote, alors d'autres produisent un maximum de biosurfactants en présence de nitrate comme source d'azote [86, 87]. La carence en azote non seulement affecte quantitativement la production, mais aussi change la composition de biosurfactant produit [88].

La production des biosurfactants peut être efficacement réalisée en utilisant différentes sources d'azotes organique et inorganique. Cependant, l'extrait de levure demeure le substrat azoté le plus utilisé pour la production de ces bioémulsifiants. La source d'azote peut dans certains cas influencer sur la nature du biosurfactant produit[89]. En effet, le L-Ala, utilisé comme source d'azote pour la croissance et la production de la surfactine par *B. subtilis* S499, stimule l'apparition d'un nouveau isoforme [Ala4] surfactine (substitution du résidu L-valine par L-alanine à la position 4 de la chaîne peptidique) [90].

De nombreuses études ont montré que la synthèse des rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu de culture ou lorsque l'azote était en quantité limitante[29].

L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices. La production de tensioactif par *Arthrobacterparaffineus* ATCC 19558 est favorisée en présence d'ammonium plutôt qu'en présence de nitrates [91]. D'un autre côté, Hommel et coll. (1994) [92] ont montré que la production des sophorolipides par *Candida apicola* augmente avec la concentration initiale en sulfate d'ammonium et que la proportion des deux isomères produits varie aussi avec la concentration initiale en ammonium.

1.2.8.3. Cations

L'ajout des cations multivalents dans le milieu de culture joue un rôle positif pour la production de biosurfactant. Il semblerait qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium, sodium ou éléments traces induise une augmentation de production [86].

1.2.8.4. Agitation et de l'aération

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur la croissance ou bien la production des biosurfactants. Les milieux de culture sont agités lors de la production des tensioactifs. Généralement, pour les bactéries, une augmentation modérée de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement de production plus faible [92] (Saharan et al., 2011). Čipinyté et al. , (2011) ont démontré que le besoin en oxygène chez *Arthrobacter* sp N3 est différent lors de la croissance de la souche et la production des biosurfactants. En effet, une importante aération est nécessaire pour la croissance bactérienne ; cependant une aération intense inhibe la production des bio-tensioactifs [93]. Ceci est similaire à celui démontré par Suwansukho et coll., (2008) [94] pour la production des biosurfactants par *B. subtilis* MUV4. Cependant, l'effet inverse est observé lorsque les mic-organismes producteurs sont des levures [95] .

1.2.8.5. pH

Le contrôle de pH durant la fermentation est essentiel pour maintenir un taux de production optimal [89] . Le pH initial du milieu de culture peut aussi jouer un rôle déterminant dans la

production de lipopeptides tensioactifs par certaines souches. Généralement un pH neutre est favorable pour une production optimale des biosurfactants chez la plupart des souches. Il est entre 6,5 et 6,8 pour *B. subtilis*BS5 [85] .

1.2.8.6. Température

Les biosurfactants produits par des souches thermophiles sont résistants à des températures élevées ; les propriétés physico-chimiques des biosurfactants telles que la tension de surface, la tension interfaciale et l'efficacité de l'émulsification sont stables après autoclavage à 120 °C pendant 15 min [87].

La production de lipopeptides tensioactifs peut être réalisée dans un intervalle de températures allant de 25 à 45 °C. Une température de 30 °C et de 28 °C donne, respectivement, un maximum de production de surfactine par *B. subtilis*[96]et*B. Coagulans*[97]. Pour *B. natto* la production de la surfactine se fait à 37 °C [84]. La température optimale pour la production de l'iturine A par *B. subtilis*RB14 est de 25°C alors que celle de la surfactine est de 37 °C[98].

1.2.8.7. Salinité

La concentration en sels influence la production de biosurfactants, cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectent pas certains biosurfactants, bien qu'une légère diminution sur les concentrations micellaires critiques soit observée [87].

1.2.9. Extraction et séparation de biosurfactant

L'extraction du biotensioactif du milieu de croissance, se fait d'abord en séparant les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple). La récupération des biotensioactifs dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux membranes cellulaires). Les techniques les plus utilisées sont :

- Extraction

Extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, dichlorométhane, etc. [29] ou des techniques reposant sur la précipitation du tensioactif. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après élimination des cellules productrices.

- Précipitation

Il est possible d'acidifier le milieu puis d'extraire le tensioactif par un mélange de solvants (chloroforme/méthanol) comme l'ont fait[99]. Généralement, l'acidification permet une précipitation du tensioactif. Suite à cette précipitation, une étape de centrifugation puis de lavage est nécessaire pour récupérer et purifier le tensioactif.

- Adsorption

Il existe des techniques de récupération en continu. Reiling et *al.* (1986) [100] ont réalisé une adsorption sur de l'Amberlite XAD-2 suivie d'une purification et lyophilisation, donnant des rendements variant de 60 à 90% de pureté.

- Ultrafiltration

La capacité des biosurfactants à s'agréger aux surfaces a également été utilisée pour les retenir sur des membranes de filtration. Par exemple, une membrane XM-50, dont le seuil de coupure est de 5000 D, a été utilisée sur une surfactine pure à 97% et un taux de récupération de 98% est obtenu, alors qu'une membrane avec un seuil de coupure plus élevé (10000 D) fournit un rendement de récupération de 92% [101].

1.2.10. Les avantages et les inconvénients des biosurfactants

1.2.10.1. Les avantages

En plus des propriétés citées précédemment (biodégradabilité, la non-toxicité, efficaces dans des conditions extrêmes). Les biosurfactants peuvent être produits à partir des déchets industriels (effluents des huileries, graisse animale, lactosérum, déchets riches en amidon,) en diminuant leur effet polluant et conduisant à une réduction du coût de production. Egalement, ils sont biocompatibilité et digestibilité qui permettent leurs applications dans les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et les additifs alimentaires fonctionnels.

1.2.10.2. Les inconvénients

Malgré ils ont beaucoup d'avantages par rapport à leurs homologues synthétisés chimiquement. Cependant, leurs coûts de production demeurent encore assez élevés et limitent leurs utilisations [103]. Les substrats de croissance pour les microorganismes producteurs de biosurfactants sont peu coûteux, mais le faible taux de production et les procédures de purification font que leurs coûts peuvent être parfois supérieurs à ceux des tensioactifs chimiques [103,104].

1.3. Production de protéase

Actuellement, l'application répandue des enzymes était limitée par la rareté des enzymes disponibles dans le commerce. Le marché industriel est constitué principalement d'hydrolases, telle que la protéase. Cette biocatalyse est utilisée dans l'industrie alimentaire et des détergents[105].

1.3.1. Définition des protéases

Les protéases sont des catalyseurs biologiques présentant une spécificité réactionnelle qui est due à la fois à la conformation et la composition en acides aminés de leur site catalytique et à la complémentarité structurale entre enzyme et substrat. Elles appartiennent au groupe des hydrolases qui catalysent les réactions de coupure des liaisons peptidiques au niveau des protéines et des peptides. Cette réaction peut être initiée soit au milieu de la séquence polypeptidique (end peptidase), soit à partir des extrémités NH₂ ou COOH-terminal (exopeptidase) [106]. Elles sont normalement générées comme des pro-enzymes inactives (zymogènes) et selon les exigences, elles seront converties en forme active par une protéolyse limitée [107- 109].

Aujourd'hui, dans le commerce, il existe un large choix de protéases d'origine végétale (bromélie, papaïne, Ficin, etc.), animale (trypsine, pepsine) microbienne (Alcalase®, Neutrase®...), fongique et virale (Flaviastase ou transcriptase inverse). Actuellement, les protéases d'origine bactérienne sont les plus employées, notamment à partir de *Bacillus* et *Streptomyces*. Ces protéases correspondent à des mélanges enzymatiques et possèdent une large gamme de spécificités.

1.3.2. Marché mondial des enzymes

Aujourd'hui, les protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et le plus utilisé en biotechnologie industrielle. En effet, ce groupe couvre 65% du marché total des enzymes (figure 1.8), et représente 67 % des ventes mondiales d'enzymes détergentes pour lessives et 50% d'enzymes pour lave-vaisselle automatique[110]. Ce dernier est dominé par de grandes sociétés multinationales telles que Novozymes A/S-Danemark (40 %), Gist-Bricades-Hollande (20 %), Genencor International-USA (10 %) et Miles Laboratories-USA (10 %). Actuellement, 89 % des poudres lessiviellles en Europe et en Amérique du Sud contiennent au moins une enzyme. Toutefois, la part de ces protéases

dans le marché mondial est essentiellement dominée par les protéases alcalines microbiennes, avec près de 40 % de ce marché [111- 113].

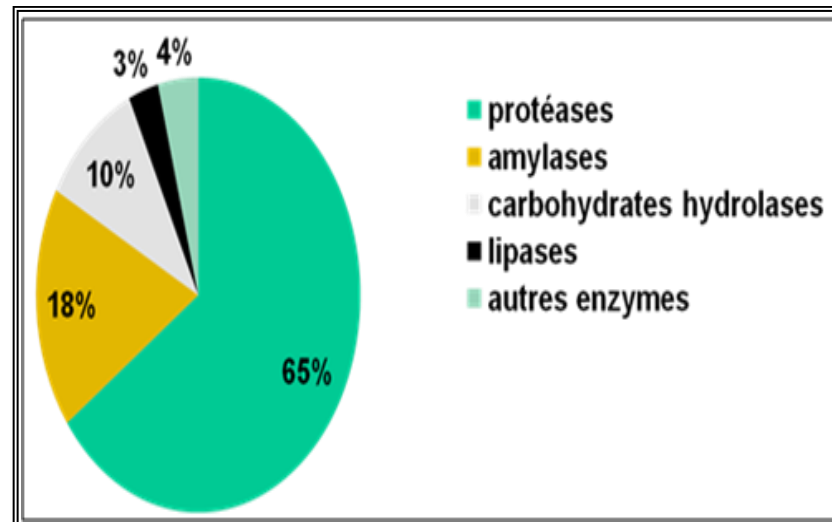


Figure 1.8: Représentation du marché mondial des enzymes [110]

1.3.3. Origine des protéases

Les protéases se trouvent dans diverses sources telles que : les plantes, les animaux et les microorganismes[114].

1.3.3.1. Protéases d'origine végétale

Parmi les protéases appartenant à ce groupe, nous pouvons citer : la papaïne, la broméline et la kératinase.

- **Papaïne** : En provenance du latex de fruit *Caricapapaya* qui se développe dans les régions subtropicales de l'ouest et le centre d'Afrique, ainsi en Inde. Elle est largement utilisée dans l'industrie pour la préparation des hydrolysats de protéines très solubles et aromatisés[115]. C'est une protéase à cystéine, active aux pH 5 - 9 [116].
- **Broméline** : Extraite à partir de l'Ananas (*Ananas comosus* Merr.). C'est une protéase à cystéine active à des pH allant de 5 à 9[117].

- Kératinase : Certains des groupes botaniques des plantes produisent des protéases qui dégradent les cheveux. Ainsi, la digestion des cheveux et de la laine peut servir pour la production des acides aminés essentiels comme la lysine et la prévention du colmatage des systèmes du traitement des eaux usées [118,114].

1.3.3.2. Protéases d'origine animale

a- Protéases gastriques

Les protéases gastriques sont des enzymes acides. Elles sont formées d'une seule chaîne polypeptidique comportant 3 ponts disulfures intramoléculaires, tels que :

- La chymosine : C'est une protéase aspartique extraite des caillottes de veaux, elle possède un pH optimum de 4,8 et elle est utilisée dans la fabrication du fromage en hydrolysant la liaison entre les résidus Phe105 et Met106 de la caséine, provoquant la coagulation du lait [119,120].
- La rénine : Elle est produite comme précurseur inactif (prorénine) dans l'estomac des nourrissons de mammifères. Elle devient active par autocatalyse ou après l'action de la pepsine [121], d'où le nom de pepsine-like protéase. Cette enzyme est largement utilisée en industrie laitière pour produire du lait caillé stable avec de bonne saveur. La spécificité d'action de cette enzyme découle de son spécificité de clivage d'une seule liaison peptidique de la caséine κ pour générer la paracaséine κ insoluble et un glycopeptide C-terminal [115].
- Pepsine : C'est une protéase acide qu'on trouve dans l'estomac de presque tous les vertébrés. L'optimum de son activité est situé entre pH 1 et 2. La pepsine scinde préférentiellement les liaisons peptidiques incluant la fonction amine de la tyrosine ou de la phénylalanine [122].

b- Protéases pancréatiques

Ce sont des protéases à sérine, synthétisées sous forme de précurseurs inactifs :

- Trypsine : C'est la protéase à sérine la plus spécifique des protéases connues, elle coupe après la lysine ou l'arginine. Son pH optimum d'action est de 8 et elle est responsable de l'hydrolyse des protéines au niveau de l'intestin [123,124].
- Chymotrypsine : Elle coupe préférentiellement les liaisons peptidiques aux quelles participe le carboxyle des aromatiques (Trp, Tyr et Phe). Son pH optimal d'action est compris entre 7 et 8 [125].

1.3.3.3. Protéases d'origine microbienne

Les protéases microbiennes représentent 40% des enzymes du marché mondial[126]. Le grand succès de ces protéases microbiennes dans les systèmes biotechnologiques est attribué à leur diversité biochimique très large, à la faisabilité de la culture de masse et la facilité des manipulations génétiques[127]. Une large proportion des protéases commerciales disponibles, principalement les protéases neutres et alcalines sont dérivées de bactéries, particulièrement de souches de *Bacillus*[128,129]. Leurs propriétés sont adaptées, plus particulièrement pour l'usage en détergence [130]. Ainsi, des protéinases à partir de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus subtilis* sont commercialement utilisées [131,132].

D'autre part, une large variété de protéases est également élaborée par les moisissures [133](Tronchin et al., 2002). Les enzymes d'origine fongiques sont des enzymes extracellulaires, ce qui permet une séparation du mycélium du milieu de fermentation par une simple filtration [134,135]. En outre, ces moisissures sont des souches "Generally Recognized As Safe" (GRAS) et peuvent se développer sur des substrats pas chers [136]. Par rapport aux protéases du genre *Bacillus*, celles produites par les champignons sont plus adaptées pour l'industrie agroalimentaire.

1.3.4. Nomenclature et classification des protéases

Les recommandations pour la nomenclature des enzymes ont été regroupées dans une liste EC (« Enzyme Commission »), publiée la première fois en 1954 puis en 1992 par l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire, IUBMB, (NC-IUBMB, 1992). Depuis, cette liste est régulièrement actualisée dans les revues scientifiques de biochimie et sur le site internet [137]. Selon le comité de nomenclature de l'IUBMB, les protéases appartiennent au sous-groupe 4 du groupe 3 (hydrolases) d'où l'adoption de la nomenclature EC 3.4.

D'une manière générale, les protéases sont classées selon plusieurs critères majeurs tout en se basant sur ; leur mode d'action, la nature du résidu nucléophile de leur site actif, leur structure tridimensionnelle (3D) et leur origine évolutive (nouvelle approche).

1.3.4.1. Classification selon le mode d'action

En se basant sur leur site d'action, les protéases sont divisées en deux groupes, d'une part les exopeptidases qui réalisent une hydrolyse à partir des extrémités d'une chaîne peptidique et d'autre part, les endopeptidases ou protéases qui hydrolysent une liaison peptidique interne (figure 1.9).

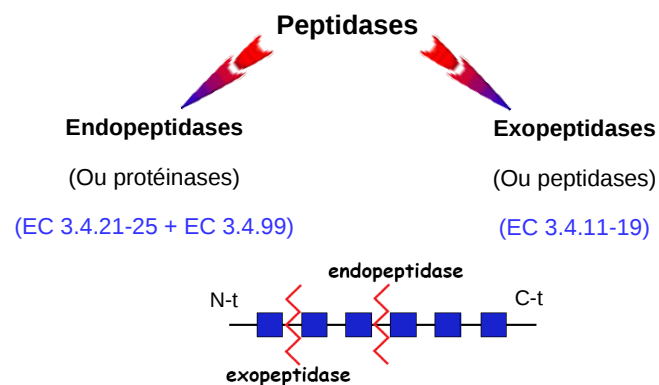


Figure 1.9: Schéma représentant la nomenclature des peptidases [138].

a. Exopeptidases

Les exopeptidases sont les enzymes qui agissent au niveau d'une extrémité N-terminale et libèrent soit, un unique résidu d'acide aminé et sont alors dénommées Amin peptidases (EC 3.4.11) soit, un dipeptide ou un tri peptide et sont alors dénommées dipeptidyl-peptidases et tripeptidyl-peptidases (EC 3.4.14) [139].

Celles qui agissent au niveau d'une extrémité C-terminale peuvent de la même manière libérer soit, un unique résidu et sont alors dénommées carboxypeptidases (EC 3.4.16, EC 3.4.17 et EC 3.4.18) soit, un dipeptide et sont alors dénommées peptidyl-dipeptidases (EC 3.4.15). Certaines exopeptidases sont spécifiques de dipeptides particuliers et portent le nom de dipeptidases (EC 3.4.13). Enfin, les omèga peptidases (EC 3.4.19) hydrolysent des liaisons peptidiques impliquant un résidu terminal d'acide aminé qui est modifié ou lié par des ponts isopeptidiques (liaisons peptidiques différentes de celles entre un groupement α -carboxyle et un groupement α -amine).

b. Endopeptidases

Les endopeptidases qui coupent les liaisons peptidiques à l'intérieur de la chaîne peptidique, sont subdivisées en cinq sous-sous-classes distinctes en fonction de leurs

mécanismes catalytiques: les endopeptidases à sérine (EC 3.4.21), les endopeptidases à cystéine (EC 3.4.22), les endopeptidases à acide aspartique (EC 3.4.23), les endopeptidases à métal (EC 3.4.24) et les endopeptidases à thréonine (EC 3.4.25)[140]. Il existe dans la nature d'autres endopeptidases, dont leurs mécanismes catalytiques sont encore inconnus.

1.3.4.2. Classification selon la nature du résidu nucléophile du site actif

Les structures moléculaires des protéases ont été déterminées en utilisant des analyses de séquences en acides aminés et des études de cristallographie. Dans la plupart des cas, le site catalytique se situe dans un sillon trouvé à la surface de la molécule d'enzyme. La spécificité d'action des enzymes protéolytiques est régie par la nature de l'acide aminé et d'autres groupes fonctionnels (aromatiques, aliphatiques ou la présence de soufre) autour de la liaison à hydrolyser[141].

a. Les protéases à acide aspartique

Les protéases aspartiques appelées également protéases acides, sont des enzymes protéolytiques dont l'activité catalytique dépend d'un résidu d'acide aspartique présent au niveau du site actif de l'enzyme. Elles ont été regroupées en trois familles, à savoir, la pepsine (A1), retro-pepsine (A2), et les enzymes de para-rétrovirus (A3). La majorité de ces enzymes a un pH isoélectrique entre 3 et 4,5 et une activité maximale à des faibles pH (généralement de 3 à 5) qui est déterminée par la position et l'orientation de tous les résidus à proximité du site actif [142].

Les protéases acides sont reconnues par leur inhibition spécifique par le pepstatin, un pentapeptide produit naturellement par des souches de *Streptomyces*. Il contient deux résidus d'acide aminé inhabituel: la statine. L'oxygène de l'hydroxyle de la première statine forme des liaisons hydrogène avec les deux résidus catalytiques d'aspartate, ce qui provoque l'inhibition [143].

b. Les protéases à sérine

Dans le monde vivant, plus d'une protéase sur trois est une protéase à sérine. Classiquement, elles sont actives aux pH neutres à alcalins. Les protéases à sérine, comme leur nom l'indique, sont caractérisées par la présence d'une sérine impliquée dans le site actif de l'enzyme [144]. Généralement, plusieurs protéases à sérine utilisent la fameuse triade catalytique Asp-His-Ser pour la catalyse[145] telle que la trypsine et la chymotrypsine, d'autres utilisent plutôt une diade catalytique plus simple où une lysine ou

une histidine est associée à la sérine catalytique. Par ailleurs, d'autres protéases réalisent le mécanisme de la catalyse de nouvelles triades catalytiques telle que par exemple celle constituée d'une paire d'histidine plus la sérine catalytique [146].

Les protéases à sérine sont considérées d'un grand intérêt industriel vu qu'elles sont souvent actives et stables aux pH alcalins, favorisant ainsi leur utilisation dans de nombreuses industries telles que l'industrie de détergence, decuir, alimentaire, cosmétique etc... En effet, les protéases à sérine alcalines sont le groupe d'enzymes le plus commercialisé sur le marché mondial [147]. Les protéases à sérine constituent une sous-classe d'endopeptidases d'un grand intérêt au niveau industriel. Chaque enzyme présente une spécificité particulière plus ou moins étroite vis-à-vis des résidus après lesquels elle coupe la chaîne peptidique, sur cette base on distingue trois groupes. Le type trypsine provoque l'hydrolyse de la protéine après un site chargé positivement. Le type chymotrypsine hydrolyse les protéines après un résidu hydrophobe de haut poids moléculaire. Le type élastase coupe les protéines après un résidu hydrophobe de faible poids moléculaire.

c. Les protéases à cystéine

Les protéases à cystéine, ou thioles, sont largement représentées dans le monde procaryote et eucaryote où elles sont impliquées dans de nombreux processus protéolytiques intra et extracellulaires, dont la papaine d'origine végétale est la plus utilisée à l'échelle industrielle. La plupart de ces enzymes sont activées seulement en présence d'agents réducteurs comme la cystéine ou l'acide cyanhydrique (HCN). Leur activité est liée à la présence de Cys et His au niveau du site actif. Il y a eu un intérêt croissant pour ces protéases, en particulier pour la modification des protéines alimentaires et pour la synthèse des peptides biologiquement actifs [142,109].

d. Les métallo-protéases

Les métallo-protéases sont les plus diversifiées de tous les types des protéases, caractérisées par une activité catalytique qui exige la présence d'un ion métallique divalent au niveau de leur site actif habituellement le Zn^{2+} , bien que dans certains cas, autres métaux de transition (éléments de groupe B du tableau périodique) peuvent s'y substituer tel que le Mn^{2+} .

Ces enzymes sont généralement des protéases neutres, dont le pH optimum se situe près de 7, mais certaines d'entre elles sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de

10. La stabilité de ces protéases augmente considérablement en cas d'addition des ions Ca^{2+} au milieu et au contraire elle diminue si des agents séquestrant sont ajoutés. Ainsi, ces protéases sont inactivées en présence d'agents chélateurs forts (ex: EDTA), qui enlèvent le Zn^{2+} , alors que l'enlèvement des ions Ca^{2+} affecte seulement leur thermo-stabilité[109].

1.3.5. Les microorganismes protéolytiques

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles. Elles représentent 40% du marché mondial des enzymes [128]. Leur grand succès dans les systèmes biotechnologiques est attribué à la diversité biochimique très large, à la faisabilité de la culture de masse et la facilité des manipulations génétiques [127].

De nombreuses enzymes protéolytiques d'Archaea et de bactéries thermophiles ont été identifiées. La plupart d'entre elles ne présentent pas seulement une activité catalytique à des températures élevées, mais conservent cette activité en présence de détergents et autres substances dénaturantes [148]. Les Protéases ont été identifiées à partir de *Thermotoga maritima*, *Thermosphaera aggregans*, *Thermococcus* *celery*, *Thermococcus* *litoralis*, *Thermococcus* *stetteri*, *Pyrococcus* *sp.* *Coprothermobacter proteolyticus* [149]. Les protéases des espèces de *Sulfolobus* [150,151], de *Thermoplasma* [152] et d'*Aquifex aeolicus* [153] ont fait l'objet de diverses études en raison de leur haute thermostabilité. La protéase à thiol de *Pyrococcus* *sp.* constitue la protéase la plus thermostable, indiquant une température optimale de 110°C. Plusieurs protéases à sérine de *Pyrococcus furiosus* ont été clonées et exprimées dans *Escherichia coli* [154].

Les *Thermococcales* fournissent des protéases thermostables, à titre d'exemples: Une protéase acide (pH 2) et thermostable (T_{opt} de 90°C) produite par *Sulfolobus acidocaldarius* a été purifiée; le gène correspondant a été cloné, séquencé et exprimé dans *Escherichia coli* [155]. Une large proportion des protéases neutres et alcalines sont dérivées de bactéries, particulièrement de souches de *Bacillus* et *Streptomyces* [156--158].

1.3.6. Mécanisme d'action des protéases

La réaction de protéase peut s'effectuer selon deux types de mécanismes:

➡ Mécanisme « one-by-one »:

Comme son nom l'indique, la protéase hydrolyse protéine par protéine. Ce mécanisme permet l'obtention de polypeptides intermédiaires et ensuite à des peptides de petites tailles.

➡ Mécanisme « zipper »:

Contrairement au mécanisme précédent, la protéolyse est simultanée sur l'ensemble des protéines, ce qui engendre des peptides de tailles variées.

1.3.7. Les paramètres affectant l'activité enzymatique

Chaque enzyme possède un optimum d'activité qui est fonction de la température, du pH, du rapport enzyme/substrat (E/S) et de la nature du substrat.

Généralement, la température entraîne une augmentation de la vitesse des réactions biocatalysées. Toutefois, au-delà d'une certaine valeur seuil, propre à chaque couple protéine/catalyseur, la chaleur peut provoquer une altération de leur structure tertiaire qui conduit à la destruction de son site actif. Généralement, la température optimale, pour une large majorité d'enzymes connues, se situe entre 25 °C et 60 °C. Cependant, les protéases ont la capacité de catalyser des réactions jusqu'aux températures de 75 °C. La température a aussi un effet sur la protéine substrat, qui en altérant sa structure, peut favoriser la rupture de ses liaisons peptidiques. L'accessibilité de l'enzyme au site de coupure est ainsi favorisée. C'est pourquoi, souvent, les substrats subissent un prétraitement thermique [159]. Il s'avère aussi que les conditions de la protéolyse induisent la formation d'agrégats de protéines. Cette modification structurale réduit l'accessibilité de l'enzyme aux sites de clivage [160].

Les variations du pH peuvent provoquer des changements d'ionisation des groupements impliqués dans la réaction de catalyse ou dans la fixation du substrat. Par conséquent, il est observé une altération de l'affinité de l'enzyme par le substrat et/ou la modification de la structure tridimensionnelle de l'enzyme ou du substrat. Ainsi, le pH optimal dépend à la fois de la nature de l'enzyme et de l'état du substrat.

Le rapport E/S peut varier de $1/1000^{\text{ème}}$ à $1/20^{\text{ème}}$ en fonction de la source protéique et de l'activité enzymatique [161]. La concentration initiale d'enzyme est importante puisqu'elle permet de déterminer, de manière proportionnelle, la vitesse initiale de la réaction. Pour ce qui concerne la concentration en substrat, elle peut être très variable.

1.3.8. Propriétés des protéases

Les protéases constituent un groupe très large et complexe. Ces enzymes diffèrent par leurs propriétés tels que: le site actif, le mécanisme catalytique, les optima du pH et de température, le profil de la stabilité et la spécificité du substrat [141]. Ces hydrolases sont très importantes du fait qu'elles ne contrôlent pas seulement les réactions protéolytiques, mais aussi elles régulent les diverses cascades enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire tels que la décomposition des lipides et des glucides. Les protéases sont capables aussi de modifier les propriétés biologiques des chaînes polypeptidiques suite à la coupure des liaisons peptidiques (activation, inactivation ou une protéolyse non spécifique pendant la dégradation). La raison pour laquelle les protéases peuvent être dangereuses pour les cellules en altérant leur environnement. De ce fait, la cellule a développé une large gamme des mécanismes pour contrôler l'activité protéolytique.

1.3.9. Mode d'action des sérines protéases

Avant l'hydrolyse de la liaison peptidique, la protéase doit se fixer sur le substrat peptidique au niveau de son site actif. L'efficacité de cette fixation dépend de l'environnement chimique créé par la protéase et de la nature chimique du peptide qui interagit directement avec le site actif.

La réaction catalytique se fait en deux étapes :

- Dans un premier temps (**acylation**), le groupe-OH du résidu de Ser 221 transfère son proton sur le résidu d'His 64 suivi par la formation d'une liaison avec le groupe carbonyle de la liaison peptidique qui va subir l'hydrolyse. On aboutit alors à un oxyanion intermédiaire (nommé ES⁺⁺) dont le carbone possède une configuration tétraédrique, stabilisée par deux liaisons hydrogènes, l'une avec l'Asn 155 et l'autre avec l'His 64.
- Dans un deuxième temps (**désacylation**), il y a formation de l'acétyl-enzyme (Ac-E) avec migration du proton sur le NH₂ libéré. Enfin, une molécule d'eau intervient pour hydrolyser l'acyl-enzyme et permet la régénération de l'enzyme pour un autre cycle [162].

1.4. Applications de biosurfactants et des protéases

Aujourd'hui, les applications de la biotechnologie sont très diverses et leurs avantages sont tellement évidents que les industries les intègrent actuellement dans leurs processus de production d'une manière ou d'une autre.

La technologie de protéase et de biosurfactant traverse actuellement une phase d'évolution qui est marquée par la gamme d'applications dans différents domaines et qui seront évidemment plus largement utilisés dans l'avenir et cela sera reflété à l'échelle industrielle, à de recherche et la gamme des conditions environnementales dans lesquelles ils opèrent.

1.4.1. Applications de biosurfactants

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes. C'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines :

1.4.1.1. Applications industrielles

Initialement, les biosurfactants ont attiré l'attention des biotechnologues comme agent de dissolution des hydrocarbures, mais l'intérêt de ces biomolécules a augmenté considérablement ces dernières décennies comme alternatives aux surfactants chimiques (les carboxylates, sulphonates et les esters d'acides sulphates) spécialement pour des applications en industries alimentaires, pharmaceutiques et pétrolières[163]. En raison de leur propriétés physico-chimiques assez attractives (activités de surface et d'interface, grande tolérance aux conditions extrêmes de pH, de température et de salinité, biodégradabilité et faible toxicité) et leur structure amphiphile, l'utilisation des composés tensio-actifs microbiens a, également, été proposée pour diverses applications industrielles, comme additifs dans les aliments, les produits cosmétiques et les formulations détergentes et dans le domaine de récupération de pétrole[164,165]. Leurs activités émulsifiantes ; moussante ; antimicrobienne, antiadhésive, stabilisante et dispersante ont attiré l'attention des biotechnologues, depuis longtemps, pour ces diverses applications. En effet, plusieurs biosurfactants ont été utilisés dans la formulation de certains produits cosmétiques comme les crèmes antiride, les lotions de nettoyage de la peau,...[166].et de détergence [167,168]. Doués de propriétés assez intéressantes, les biosurfactants peuvent être utilisés comme des ingrédients polyvalents montrant des activités émulsifiante, antiadhésive et antimicrobienne simultanée appropriées pour de multiples applications alimentaires.

1.4.1.2. Applications environnementales

1.4.1.2.1. Bioremédiation des sites contaminés

L'utilisation de biosurfactants est une méthode prometteuse susceptible d'améliorer l'efficacité de la bioremédiation des environnements contaminés par les substances hydrophobes (hydrocarbures). Ils peuvent améliorer la biorestauration des hydrocarbures par deux mécanismes. Le premier inclut l'augmentation de la biodisponibilité du substrat pour les microorganismes, tandis que l'autre implique une interaction avec la surface cellulaire qui augmente l'hydrophobie de la surface permettant aux substrats hydrophobes de s'associer plus facilement aux cellules bactériennes. En réduisant les tensions superficielles et interfaciales, les biosurfactants augmentent les surfaces des composés insolubles, entraînant une mobilité et une biodisponibilité accrues des hydrocarbures. En conséquence, les biosurfactants améliorent la biodégradation et l'élimination des hydrocarbures [169-172].

1.4.1.2.2. La pollution et la dépollution des rejets

➤ Définition

Les eaux usées sont des liquides de composition hétérogène, chargées de matières minérales ou organiques, pouvant être en suspension ou en solution, et dont certains peuvent avoir un caractère toxique, et qui doit être traité avant d'être réintroduite vers d'autres sources d'eaux pour qu'ils ne causent pas de pollution [173].

➤ Origine de la pollution des eaux

La pollution des eaux est provoquée par le rejet d'eau salie par nos activités domestiques, mais également par les diverses activités industrielles et agricoles [174]. C'est une altération qui rend son utilisation dangereuse et perturbe l'écosystème aquatique. Selon Eckenfelder, les eaux usées proviennent de quatre sources principales:

- Les eaux usées domestiques;
- Les eaux usées industrielles;
- Les eaux de pluie et de ruissellement dans les villes;
- Le ruissellement dans les zones agricoles [175].

➤ Caractéristiques des eaux usées

Les normes de rejet des eaux usées, fixent des indicateurs de qualité physico-chimique et biologique. Ce potentiel de pollution généralement exprimés en mg/L, est quantifié et

apprécié par une série d'analyses. Certains de ces paramètres sont indicateurs de modifications que cette eau sera susceptible d'apporter aux milieux naturels récepteurs. Pour les eaux usées domestiques, industrielles et les effluents naturels [176], on peut retenir les analyses suivantes:

- Les paramètres physico-chimiques

Ils résultent de l'introduction dans un milieu des substances conduisant à son altération, se traduisant généralement par des modifications des caractéristiques physico- chimiques du milieu récepteur (température, pH, salinité, DCO, DBO5, matières organiques et minérales, ...). La mesure de ces paramètres se fait au niveau des rejets, à l'entrée et à la sortie des usines de traitement et dans les milieux naturels [176].

➤ Les eaux usées d'abattoir

- Les effluents d'abattoirs

Les effluents d'abattoirs correspondent à l'ensemble des rejets liquides produits sur le site de l'abattoir, c'est-à-dire les eaux résultant de l'activité d'abattage (procédé, lavage) et les eaux de vannes [177].

Les activités d'abattage sont à l'origine d'effluents bruts, liquides d'aspect rougeâtre comprenant de nombreux débris organiques. La fraction liquide de ces effluents bruts est principalement constituée de l'eau issue du réseau urbain et utilisée à de nombreux postes de lavage tout au long de l'activité d'abattage: (Lavage des véhicules, des aires, des locaux et du matériel, des cuves à sang, des bacs d'échaudage, des viscères). Les effluents d'abattoirs contiennent également du sang, du jus de pressage ou d'essorage des matières stercoraires.

La fraction solide macroscopique des effluents bruts issus des abattoirs est généralement constituée de plume, de patte, de morceaux d'onglons, de déchets de parage (graisse), de débris végétaux [177].

Les boues constituent un cas particulier. Elles sont issues du système d'épuration des eaux usées, qui correspond à l'étape biologique de consommation de la matière organique. Le but du traitement est d'enlever et de limiter la fraction organique dissoute. Ce processus entraîne la formation des boues [178].

Déchets d'abattoir : Les parties d'un animal qui ne sont pas utilisées pour la production de nourriture sont appelées déchets d'abattoir et peuvent se composer d'organes internes, de sang, d'os, de tendons et de ligaments [179].

Chez le poulet, les sites principaux d'activité bactérienne sont le jabot, le caecum et l'intestin grêle. Ainsi, dans le caecum et l'iléon, on trouve 10^{11} et 10^{15} bactéries /g de contenu respectivement. Compte tenu des nombreux facteurs modifiant la flore, les différences méthodologies entre les études (type de régime entre la présence ou non d'antibiotique, etc...), les études effectuées sur la microflore ont concerné principalement le caecum [180].

➤ Les eaux usées de lavage

Les eaux de lavage sont principalement polluées par des détergents, des matières en suspension comme l'huile, des lubrifiants, des microorganismes ou des métaux lourds. Il est nécessaire de les traiter spécifiquement avant de les rejeter ou de les réutiliser, afin de limiter tout risque de pollution. Il existe des systèmes de traitement spécifique des eaux de lavage, principalement utilisés dans les stations de lavage automobile. Ces installations permettent une dépollution et une remise à disposition immédiate de l'eau, ce qui constitue une qualité majeure dans l'optique du respect de l'environnement [181].

1.4.2. Application des protéases

Le marché mondial des enzymes est en nette progression essentiellement du fait de l'intérêt que porte ces dernières à l'environnement et aux industries dites propres. Les protéases alcalines bactériennes trouvent de nombreuses applications dans divers secteurs industriels [115,147]. Ce type d'enzymes est utilisé essentiellement dans les détergents pour les lessives, les tanneries pour le traitement de cuir, l'industrie pharmaceutique pour la synthèse peptidique, le traitement des rejets, dans le traitement de la soie et dans l'industrie alimentaire.

1.4.2.1. Détergence

Actuellement, les protéases utilisées dans les détergents à lessive représentent 25% des ventes mondiales totales des enzymes. Selon Freedonia Group [182], la demande en enzyme protéases sera 1,8 milliard de dollars en 2017. L'utilisation de ces enzymes dans les produits détergents est la clef du problème écologique résultant de l'utilisation excessive des détergents chimiques lesquels sont corrosifs, toxiques et non biodégradables entraînant ainsi la pollution de l'environnement [183,184]. Les enzymes détergentes peuvent être utilisées sous forme de poudre, granules ou liquide. Bien que leur incorporation sous forme liquide soit pratique, les enzymes granulées se sont avérées les

plus stables au cours du stockage dans les formulations détergentes solides et liquides [185].

1.4.2.1.1.Définition

La détergence, est définie comme étant un processus de nettoyage durant lequel des salissures sont séparées d'un milieu solide par mise en suspension ou en solution dans un bain de nature aqueuse au moyen d'un détergent. Ce dernier assure trois fonctions: la fonction d'usage principale qui est l'élimination de tous les types de salissures et les odeurs corporelles adsorbées sur les fibres textiles ; les fonctions secondaires correspondent à la conservation ou la restauration de la souplesse du linge et au ravivage des couleurs et les fonctions tertiaires associées à la satisfaction du consommateur et au respect de l'environnement [186]. L'utilisation d'enzymes dans la composition chimique des produits de détergence est en progression à l'échelle mondiale grâce à leurs caractéristiques non-toxiques et écologiques. L'utilisation de technologie d'enzyme est séduisante grâce à leurs spécificités et leurs classification en tant que produit vert dédié à réduire la pollution causée par les produits récalcitrants non dégradables. Le marché mondial des enzymes est en nette progression essentiellement du fait de l'intérêt que portent ces biocatalyseurs à l'environnement et aux industries dites propres. Grâce à ce genre d'enzyme, les industries des détergents ont fait des progrès considérables [187]. C'est l'une des principales classes d'enzymes détergentes pour l'application dans la lessive et le lavage automatique de la vaisselle. Historiquement, les protéases ont été les premiers utilisés dans les détergents à lessive [188] environ deux tiers de cette industrie [187,189].

Les protéases utilisées dans les détergents de lessives comptent environ 40% du total des ventes mondiales d'enzymes [190]. Elles sont utilisées dans les formulations détergentes comme additives de nettoyage, avec d'autres enzymes hydrolytiques, afin de faciliter la répartition et la libération de protéines [191]. Les protéases présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergence pour leur capacité à favoriser l'élimination des tâches protéiques vue leur avantage unique qui ne peut être pas obtenu avec la technologie des détergents classiques [147]. De nos jours, les protéases sont ajoutées comme ingrédients clés, ce qui présente environ 25% des ventes totales dans le monde entier des enzymes. Parmi les principales conditions préalables pour l'utilisation des protéases dans la production des détergents sont:

- l'action sur une large gamme des substrats,

- l'activité et la stabilité à des pH alcalines, à des températures élevées et en présence des agents oxydants additionnés.

Le premier détergent contenant l'enzyme bactérienne a été introduit sur le marché en 1956 sous le nom commercial Bio-40 [192]. Aujourd'hui, toutes les protéases des détergents commercialisés sont des sérines protéases (subtilisines et/ou des protéases alcalines) produites par *Bacillus* sp.[193]. Les ingrédients qui constituent les détergents peuvent être classés en matières actives et auxiliaires de formulation qui assurent différents rôles. Les enzymes constituent un ingrédient essentiel des détergents mais en aucun cas suffisant. En effet, les détergents sont constitués de plusieurs éléments dont le rôle permet d'agir sur différents types de salissures et de tâches.

1.4.2.1.2.Composition d'un détergent

Les ingrédients qui constituent les détergents peuvent être classés en matières actives et auxiliaires de formulation qui assurent différents rôles. Les enzymes constituent un ingrédient essentiel des détergents mais en aucun cas suffisant. En effet, les détergents sont constitués de plusieurs éléments dont le rôle permet d'agir sur différents types de salissures et de tâches. Il s'agit de garantir la blancheur du linge, d'adoucir les eaux dures pour optimiser les conditions d'action des ingrédients actifs, de préserver l'éclat des couleurs et l'aspect général du linge et de lutter contre la redéposition de la saleté.

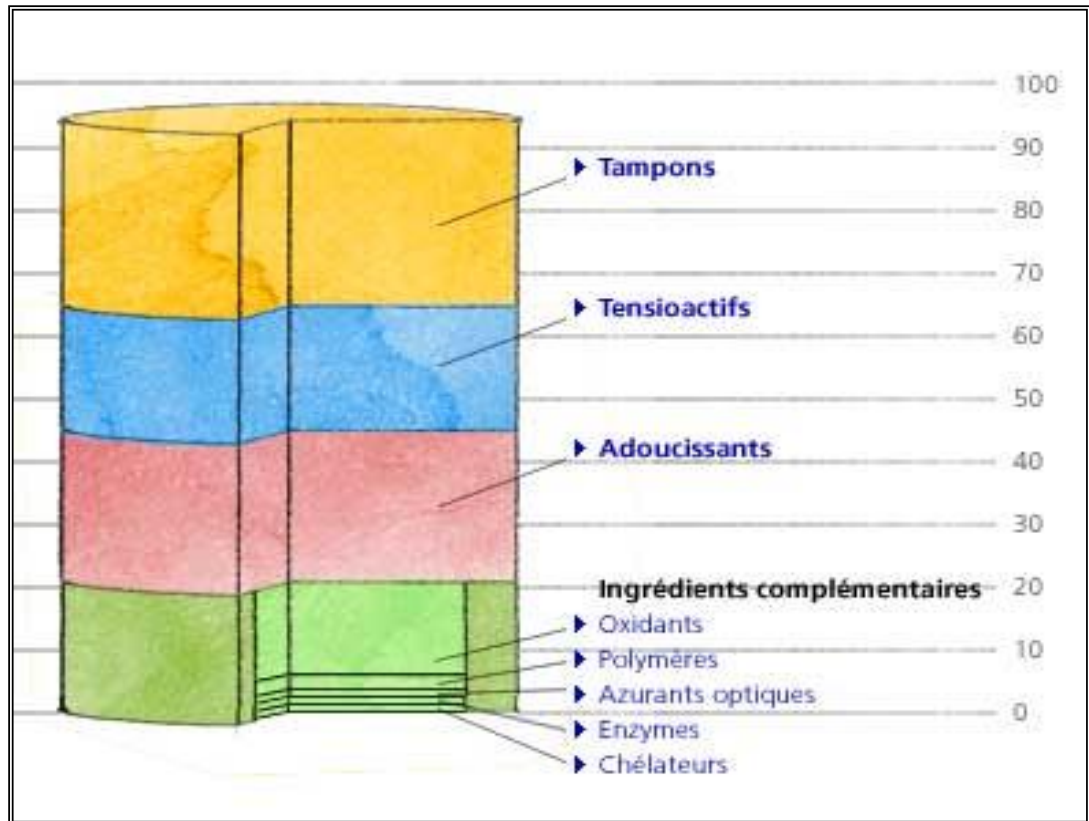


Figure 1.10: Proportions des différents composants des détergents.

Depuis 1998, les lessiviers se sont engagés à réaliser les efforts nécessaires pour réduire l'impact des constituants des lessives sur l'environnement en diminuant le volume de la dose unitaire du détergent tout en conservant son efficacité, à abaisser le taux des ingrédients organiques faiblement biodégradables et à réduire l'énergie nécessaire au lavage. Tous ces critères imposent aux fabricants de détergents une évolution permanente des formulations de lessive en incorporant de nouveaux ingrédients permettant d'éliminer les taches plus efficacement, à plus basse température, tout en respectant au mieux le linge et l'environnement [193].

1.4.2.1.3. Critère de choix

La stabilité des enzymes est une préoccupation pour les fabricants de détergents, qui veulent assurer que les enzymes incorporées dans un détergent demeurent actives et stables jusqu'au lavage.

Plusieurs paramètres importants dans la sélection de bonnes enzymes de détergence à savoir:

✓ Un des paramètres les plus importants dans la sélection des enzymes de détergence est la valeur de leur point isoélectrique (pI). Il est connu que les performances des

biocatalyseur de détergence sont meilleures quand la valeur du pH de la solution de détergent est approximativement la même que la valeur du (pI) de l'enzyme [194].

✓ La compatibilité avec les composants du détergent, tels que les surfactants, les parfums, les agents de blanchiment [195-197].

☞ Les tensioactifs anioniques sont utilisés généralement dans les détergents, forment facilement avec les protéines peu hydrosolubles des complexes protéine/tensioactif mettant en jeu des interactions de type polaire et apolaire entraînant l'inactivation de l'enzyme. Ils peuvent même provoquer la dénaturation complète des enzymes, tel que l'effet du LBAS (sulfonate alkyl benzène linéaire) sur les protéases et les amylases [198].

☞ Les adjuvants de détergence : un certains nombre d'adjuvants exercent un effet déstabilisant sur les enzymes comme :

- L'agent de blanchiment : il accélère la dégradation des protéases [199].
- Les enzymes protéolytique : les protéases décomposent différents types d'enzymes tels que les lipases, les cellulases et les amylases au cours du stockage [200] et peuvent se dégrader mutuellement. Par ailleurs, le phénomène de dénaturation et d'agrégation des protéases est très rencontré [201].

✓ La compatibilité avec la force ionique de la solution de détergent.

✓ La dégradation des taches et élimination potentielle.

✓ La bonne activité à des pH alcalins et des températures modérées [202,203].

La stabilité de l'enzyme vis-à-vis des conditions de la détergence [204].

1.4.2.1.4. Les enzymes détergentes

Utilisées à des fins nettoyantes, les enzymes se révèlent être des puissants agents nettoyants naturels qui offrent une réelle alternative aux détergents chimiques classiques, beaucoup plus agressifs pour la peau et l'environnement. En raison du développement des lessives compactes et de l'abaissement des températures de lavage, les enzymes, d'origine bactérienne essentiellement du genre *Bacillus*, sont actuellement utilisées et représentent très certainement les ingrédients de l'avenir essentiel pour la formulation des détergents. Elles sont efficaces à des taux extrêmement faibles et même à température modérée (20-40 °C) vis-à-vis de certaines taches difficiles à éliminer [186]. En effet, l'utilisation des enzymes dans les produits détergents est l'un des clés du problème écologique résultant de l'utilisation excessive des détergents chimiques lesquels sont corrosifs, toxiques et non biodégradables entraînant ainsi la pollution de l'environnement [184]. Les enzymes détergentes peuvent être utilisées sous forme poudre, granules ou liquide. Bien que leur

incorporation sous forme liquide soit pratique, les enzymes granulées se sont avérées plus stables au cours du stockage dans les formulations détergentes solides et liquides[185]. Différents types d'enzymes permettent, d'obtenir un haut niveau de performance en terme d'élimination des taches, le nettoyage total, la protection du textile, garantir la blancheur du linge, préserver l'éclat des couleurs et lutter contre la redéposition de la saleté [205, 192]. Ces enzymes sont:

- **L'Alcalase®** de Novozymes, à base de la subtilisine A de Carlsberg est produite par une souche de *Bacillus licheniformis*. Elle est très employée et active dans les conditions neutres ou légèrement alcalines, donc parfaitement adaptée aux détergents ménagers liquides qui présentent en général un pH de 8 à 9. L'Alcalase possède une température optimale d'action de 60 °C et pH optimum d'activité de 7, 5 à 8, 5. Elle est stable après incubation 1 h à 50 °C, garde environ 45% de son activité initiale à 65 °C et s'inactive après incubation à 70 °C.
- **La Savinase®**, à base de la subtilisine 309, également de Novozymes agit dans des conditions plus alcalines (pH 8-11) que l'Alcalase, et elle est particulièrement efficace aux moyennes températures de lavage. Elle présente une activité optimale à 55 °C, mais elle est également efficace à basse température. Cette protéase est la plus vendue dans le monde et employée par de nombreuses grandes marques de détergents ménagers [206]. La Savinase, comme les autres protéases, est sensible aux attaques des agents de blanchiment. Pour pallier à ce problème, Novozymes a mis au point de variantes de Savinase plus stables au blanchiment, exploitant les dernières techniques d'ingénierie des protéines pour améliorer l'enzyme.
- **L'Everlase™** est le résultat de ces travaux qui offre une meilleure stabilité au cours du stockage en présence d'agents de blanchiment dans les détergents avec une meilleure performance au lavage.
- **L'Espérance®** de Novozymes, conserve son effet lavant en milieu hautement alcalin (jusqu'à pH 12) et à haute température. Elle est active dans les conditions qui inactivent les autres protéases. Elle est parfaitement adaptée aux détergents pour blanchisseries industrielles qui fonctionnent à des températures de 60 à 70 °C et à des pH alcalins supérieurs à 10. Elle s'est aussi imposée dans les détergents pour lave-vaisselle automatique car ceux-ci présentent pour la plupart un pH élevé et de nombreux programmes de lave-vaisselle fonctionnant à de hautes températures.

- **La Kannase™** ou protéase (« cool ») conserve toute son efficacité à des températures de 10 à 20 °C. Cette efficacité à basse température est un élément clé de la performance des protéases dans les détergents, surtout dans certains pays de l'Asie (Japon), de l'Australie ou de l'Amérique latine où la lessive se fait à l'eau froide après une longue période de trempage.

A côté des protéases qui dégradent les taches protéiques telles que le sang, l'œuf ou le lait, de nombreux détergents de lessive contiennent d'autres enzymes, seules ou en combinaison. Les lipases (exemple : **Lipolase®**) agissent sur les salissures grasses en catalysant l'hydrolyse des triglycérides insolubles comme ceux du sébum, des huiles végétales ou des produits cosmétiques. Les amylases (exemple : **Termamyl®**) scindent les liaisons α -(1,4) des molécules d'amidon rencontrées dans les pâtes ou les pommes de terre. Enfin, les cellulases (exemple: **Celluzyme®**) qui dégradent les micro-fibrilles qui apparaissent sur le coton au fil des lavages.

1.4.2.2. Tannerie et traitement du cuir

Conventionnellement, la chaux et beaucoup de sulfures sont utilisés pour le tannage du cuir. Les effluents ainsi créés comptent pour 50-60% de la charge polluante due aux tanneries [207]. L'utilisation des enzymes en tannerie, comme alternative des produits chimiques, a été un succès dans la réduction de la pollution de l'environnement, la diminution des coûts et amélioration de qualité du produit final qui devient plus résistant à la déchirure et présentant une teinte plus uniforme [204].

Les enzymes protéolytiques sont employées dans les trois étapes du traitement du cuir: trempage, épilage et confitage. Elles permettent de retirer les poils et la chair du cuir sans dénaturer le collagène. Cette étape est critique pour la production d'un cuir de qualité. Il a été rapporté que des protéases de certaines bactéries de nature alcalophiles étaient performantes pour l'épilage des peaux d'animaux [208]. Plusieurs microorganismes produisent des kératinases qui peuvent être utilisées lors de l'étape d'épilage: *Bacillus subtilis* S14 [209], *B. subtilis* KD-N2 [210], *Bacillus halodurans* PPKS-2 [211], *Trichoderma harzianum* MH-20 [212], et *Paenibacillus woosongensis* TKB2 [213].

La kératinase nommée KERUS produite par *Brevibacillus brevis* US575 a été testée dans le traitement du cuir à l'échelle industrielle. Une élimination totale des poils a été obtenue et aucun endommagement des constituants du collagène du cuir n'a été observé [214].

1.4.2.3. Récupération de l'argent

Les protéases alcalines sont aussi employées dans les bioprocédés utilisant les films de rayons X usagés pour la récupération de l'argent. En effet, ces pellicules contiennent approximativement 1,5 à 2% (m/m) d'argent dans leurs couches de gélatine. La pratique conventionnelle de récupération de l'argent consiste à brûler les films ce qui provoque des problèmes de pollution environnementale. Pour cela l'utilisation des enzymes hydrolytiques permet de recycler non seulement l'argent mais aussi la base de polyester du film. La protéase alcaline de *Bacillus coagulans* PB-77 a décomposé le revêtement gélatineux des films de rayons X usagés à partir desquels l'argent a été récupéré [215]. Une autre protéase alcaline de *B. subtilis* permet la décomposition de la couche de gélatine et la récupération de l'argent à la suite d'une incubation à 50-60°C pendant 30 min [216].

1.4.2.4. Industrie pharmaceutique

Diverses protéases sont utilisées pour la production d'agents à usage thérapeutique. En effet, l'administration orale des protéases Luzyme® et Nortase® produites par *Aspergillus oryzae* aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques. De même, la collagénase de *Clostridium* est utilisée en combinaison avec un large spectre d'antibiotiques dans le traitement des brûlures et des blessures [217]. L'utilisation des protéases alcalines, ayant une activité fibrinolytique, dans le traitement des thromboses a été également rapporté [218]. Une élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes [219]. Des enzymes protéolytiques telles que la subtilisine, la collagénase, la kératinase, l'élastase...etc. ont été utilisées pour l'élimination de cérumen [147]. L'activité élastase de certains microorganismes a été exploitée pour la préparation d'élastotérase qui est utilisée dans le traitement des brûlures, de plaies infectées [220]. Les kératinases ont montré leur aptitude dans le traitement de l'acné. Elles éliminent les cellules mortes et la kératine [221].

1.4.2.5. Traitement de la soie

Les fibres de séricines représentent 25% de la soie brute, elles sont éliminées par immersion des fibres dans l'eau chaude savonneuse et légèrement alcaline [222]. Ce processus étant généralement coûteux, une méthode alternative suggérant l'utilisation des préparations enzymatiques, telles que les protéases, a été mise au point. Le traitement enzymatique consiste à placer les fibres dans une solution contenant l'Alcalase® de

Novozymes à pH 8 et à une température de l'ordre de 55 à 60°C [223]. D'autres enzymes telles que la papaïne, trypsine, pepsine, savinase peuvent être utilisées pour remplacer la procédure classique de traitement de la soie[224].

1.4.2.6. Industrie alimentaire

Les protéases animales ont été fréquemment employées dans la fabrication du fromage, la préparation des hydrolysats de soja et l'attendrissage de la viande[115]. Une élastase alcaline [225]. et une protéase alcaline thermostable[226]. ont montré leurs efficacités à attendrir la viande puisqu'elles possèdent la capacité d'hydrolyser les tissus connectifs ainsi que les fibres protéiques des muscles.

Les protéases ont été aussi utilisées dans la préparation d'hydrolysats de protéines à haute valeur nutritionnelle. Ces hydrolysats de protéines jouent un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et sont employés dans les formulations des aliments pour les nourrissons, dans les produits diététiques et pour l'enrichissement des jus de fruits et des boissons non alcoolisées [227].

1.4.2.7. Traitement des eaux usées et des rejets industriels

Les protéases solubilisent les ordures de nature protéique et contribuent à la diminution de la demande biologique en oxygène (DBO) dans les systèmes aquatiques, c'est pourquoi, les protéases alcalines ont été utilisées dans la gestion des ordures de diverses industries et activités ménagères. Des protéases et notamment des kératinases sont utilisées pour traiter les eaux usées riches en kératine provenant des chaînes d'abattage de volailles [228] et elles sont utilisées aussi comme agents dépilatoires pour éliminer les restes de cheveux et le nettoyage des drains sanitaires responsables de l'émission d'odeurs nauséabondes [229].

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre travail est focalisé sur la production et l'application de deux biomolécules microbiennes de type biosurfactant et d'enzyme issues d'une souche bactérienne thermophile isolée localement d'un biotope du sol sableux pollué par les hydrocarbures de la région de Hassi Messaoud, sud d'Algérie.

Notre démarche scientifique entreprise durant les nombreuses années de recherche s'articule autour des axes suivants :

- 1) Criblage des bactéries hydrocarbonoclastes productrices de biosurfactants et d'enzymes, précédemment isolées au sein du laboratoire de recherche de chimie des substances naturelles et de biomolécules (USD Blida 1).
- 2) Identification phénotypique et génotypique de la souche la plus performante en se basant sur les critères établis dans le manuel de Bergy « *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* » ainsi que les bases de données de séquences génétiques de GenBank.
- 3) Production, optimisation et caractérisation de biosurfactant et d'enzyme en culture batch.
- 4) Essais de deux applications biotechnologiques en utilisant la souche bactérienne dans la dépollution d'un rejet complexe et en détergence par la substitution des additifs chimiques par l'enzyme protéase produite par la même souche.

2.1 .Produits chimiques et additifs

Tous les produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont de qualité analytique et provenaient de diverses sources commerciales reconnues (BIOCHEM, Panreac, VWR et Sigma-Aldrich) et de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, États-Unis). Les additifs témoins et commerciaux utilisés sont : SAPHM de *Bacillus licheniformis* K7A [181], SAPRH de *Bacillus safensis* RH12 [231] et Savinase™ 16L, type EX (subtilisine 309) de 90 *Bacillus clausii*, aimablement fournies par Novozymes Biopharma DK A/S (Bagsvaerd, Danemark).

2.2. Milieux de culture

Tous les milieux de culture ont été préparés au préalable au laboratoire pour le criblage des bactéries hydrocarbonoclastes ainsi que pour la production de biosurfactants et d'enzyme de type protéase.

2.3. Criblage de la souche bactérienne à double production (Biosurfactant – Enzyme)

2.3.1. Origine des souches criblées

Le biotope utilisé pour isoler les souches bactériennes utilisées dans cette étude est un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers de la région de Hassi-Messaoud dans le sud-est de Ouargla en Algérie (Coordonnées GPS : 6° 04' 21" Est, 31° 40 ' 57" Nord). Les prélèvements des échantillons, l'isolement, la purification et la conservation des souches isolées ont été réalisés par Eddouaouda [180].

2.3.2. Conservation des souches

Pour la conservation à long terme, les souches sont conservées dans le bouillon LB après une croissance optimale en présence de 20% de glycérol stérile à (-80 °C) au niveau du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes (LBMIE), au Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) (Sfax, Tunisie).

2.3.3. Criblage des souches à double activité de production (BS-ENZ)

2.3.3.1. Sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactant

Le criblage de la meilleure souche productrice de biosurfactant est effectuée selon un protocole expérimental standard [68,244]; dans sept (07) Erlenmeyers contenant 50 mL de milieu minéral de culture, additionné de 2% du pétrole brute comme seule source de carbone et d'énergie et chaque Erlenmeyer a été inoculée par 1% d'une préculture bactérienne âgée de 24h cultivée en bouillon LB, soit au total, 07 souches de bactéries hydrocarbonoclastes thermophiles ont été testées. L'incubation s'effectue à 45 °C dans un incubateur à 200 tr/min pendant 48 heures.

Le criblage est basé sur la mesure de la tension superficielle T_s et l'index d'émulsion E_{24} du surnageant après centrifugation à 4000 tr/min pendant 20 minutes. La T_s a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre manuel de Krüss qui est calibré avec l'eau ultra pure (72 mN/m) et avec l'éthanol pur (22,7 mN/m) (Cf. section méthodes de mesure, dosage analytiques).

2.3.3.2. Sélection de la meilleure souche productrice d'enzyme de type protéase

En effet, les 07 souches de bactéries hydrocarbonoclastes thermophiles testées pour leurs activités de production de biosurfactants ont été retenues comme productrices d'enzyme en se basant sur le rapport du diamètre de l'halo d'hydrolyse de la caséine

présent dans le milieu de culture sur le diamètre de la colonie (constitue un premier critère de sélection). Ces sept souches ont été sujettes à une étude de production sur milieu liquide pour une étude quantitative afin de sélectionner la meilleure souche.

2.4. Identification de la meilleure souche à double activité de production (BS-ENZ)

L'identification de la souche à double activité de production codée NIJ est accomplie par des études phénotypiques (morphologiques, physiologiques et biochimiques) et par l'analyse moléculaire du gène codant pour l'ARNr 16S (taxonomie moléculaire).

2.4.1 Etudes morphologique, physiologique et biochimique de la souche NIJ

2.4.1.1. Etude macro et micromorphologique

Une description de la colonie bactérienne de la souche NIJ en pleine croissance permettra de déterminer les caractéristiques culturales de cette souche : Taille– Forme (contour et aspect de surface) – Transparence – Production de pigments – Consistance.

L'observation microscopique à l'état frais de la souche NIJ a permis la détermination de la forme microscopique ainsi que la mobilité et la sporulation.

2.4.1.2. Tests physiologiques

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

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

- Test de la catalase : Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram positifs. La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée (H_2O_2) qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air, des hydrogènes transportés par la voie oxydative directe. Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche de

H₂O₂ à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de H₂O₂ sous l'action de la catalase (réaction catalase positive).

- Test de l'indole : Une portion de culture de la souche NIJ est déposée sur un disque de papier imbibé de réactif d'indole à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. La réaction est positive lorsqu'une coloration marron apparaît.

- Détermination du type respiratoire : Le milieu OF (10 g glucose ; 2 g tryptone ; 5 g NaCl ; 0,3 g K₂HPO₄ ; 4 g gélose et 0,08 g bleu de bromothymol dans un litre d'eau distillée, et à pH entre 6,6 et 7,0) permet de réaliser un test d'oxydation/fermentation du glucose, pour identifier le type respiratoire de la bactérie étudiée. La dégradation du glucose est observée, en aérobie et anaérobie, par le virage de la couleur du bleu de bromothymol suite à l'acidification du milieu.

2.4.1.3. Tests biochimiques

La galerie API 50 CH (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Lyon, France) permet d'étudier le métabolisme de 49 substrats de carbohydrates et ses dérivés de la souche NIJ. La lecture s'effectue après incubation à 30 °C pendant 20 h puis 48 h. Le logiciel APILAB (bioMérieux) permettra ensuite d'obtenir, à un pourcentage admis, l'identité de la bactérie recherchée par comparaison à des profils typiques.

2.4.2. Taxonomie moléculaire par le séquençage de l'ARNr 16S

L'étude moléculaire a été achevée suite à l'amplification par PCR du gène codant pour l'ARNr 16S en utilisant l'ADNg de la souche NIJ et des amorces nucléotidiques ; **27F** (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et **1525R** (5'-AAGGAGGTGATCCAAGCC3 ') dont les séquences appartiennent aux régions conservées flanquant ce gène, respectivement de 8 à 27 et de 1541 à 1525 de l'opéron d'ARNr chez *E. coli*. Les fragments PCR de tailles attendues sont purifiés puis clonés et leurs séquences nucléotidiques sont déterminées.

La plupart des techniques de la biologie moléculaire que nous avons utilisé, sont décrites dans le manuel de « Molecular Cloning » .

2.5. Production, optimisation et caractérisation de biosurfactant et d'enzyme en batch

Les activités de production (double) biosurfactant et protéase ont été étudiées séparément.

2.5.1. Cinétique de croissance

Les précultures sont effectuées sur milieu LB dans des Erlenmeyers de 250 mL avec un volume utile de 50 mL. L'incubation se fait pendant 24h aux températures correspondantes et sous une agitation de 200 rpm.

Les cultures de cinétiques sont inoculées par 1 mL de la préculture à 3 unités DO_{600} (Abs= 0.8). L'incubation se fait pendant 72 h à la température adéquate de 45 °C et sous agitation de 200 rpm. Des prélèvements réguliers de 2 mL sont effectués chaque 24h d'incubation.

2.5.2. Production de biosurfactant

2.5.2.1. Milieux de culture

- **Milieu LuriaBertani liquide (LB)** : 10 g de peptone, 5 g d'extrait de levure, 23 g de NaCl dans 1 litre d'eau distillée.

- **Milieu LB gélosé** : préparé par l'ajout de 18 g d'agar-agar bactériologique aux additifs du milieu LB liquide.

- **Milieu à base de sels minéraux (MSM) (g /L d'eau distillée)** : [23 NaCl, 0.4 NH_4Cl , 0.3 KH_2PO_4 , 0.3 K_2HPO_4 , 0.33 $MgCl_2$, 0.05 $CaCl_2$] + [1 mL d'oligoéléments contenant (mg.L⁻¹ d'eau distillée) : 1500 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 190, 100 $MnCl_2 \cdot 6H_2O$, 70 $ZnCl_2$, $6H_3BO_3$, 36 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$] + [6.7 mL HCl 35%] [67].

Le pH de tous les milieux de culture a été ajusté à $7 \pm 0,2$ avec une solution de soude caustique 1M (NaOH) ou avec solution d'HCl à 1M. La stérilisation est assurée par autoclavage à 121 °C/20 min [67].

2.5.2.2. Conditions de production de biosurfactant

- **Préculture**: En ensemençant une colonie bien isolée dans le milieu LB liquide au début de chaque production afin d'obtenir des cultures jeunes et fraîches. Les précultures ont été préparées et maintenues sous incubation à 45 °C et agitation à 200 tr.min⁻¹ pendant 24h.

- **La culture de production de biosurfactant** : La culture bactérienne de production en milieu liquide MSM est réalisée en batch (mode discontinu) dans des Erlenmeyers de 250 mL avec un volume réactionnel de 50 mL et inoculé avec 1% (v/v) de préculture en aérobiose sous agitation de 200 tr.min⁻¹ à 45 °C pendant 48 h.

Deux paramètres de suivi de la production ont été mesurés : $DO_{\lambda=620}$ et la TS (cf. section méthodes de mesures, dosages et analytiques).

2.5.2.3. Optimisation de la production de biosurfactant

Cette partie consiste à maximiser la quantité du biosurfactant produit en faisant varier quatre paramètres intéressants : la nature et la concentration de la source de carbone et d'énergie et la nature et la concentration de la source d'azote.

- Choix de la source de carbone : Les sources de carbones utilisées sont : L'hexadécane, l'huile d'olive, pétrole et gasoil à une concentration de 2% (v/v) ainsi que le glucose anhydre à 2% (m/v) avec NH_4Cl (0.4g/L) comme source d'azote. La meilleure source de carbone choisie a été utilisée à différentes concentrations : 0,5% (0.25mL) ; 1% (0.5mL) ; 2% (1mL) ; 3% (1.5mL) et 4% (2 mL).
- Choix de la source d'azote : On ajoute aux milieux de cultures contenant la source de carbone optimale, les différentes sources d'azote : NH_4Cl , $NaNO_3$, arginine, urée et NH_4NO_3 . La meilleure source d'azote choisie a été utilisée à différentes concentrations : (2% (0.01g/L); 3% (0.015g/L); 4% (0.02g/L); 5% (0.025g/L) et 6% (0.03g/L)). Le choix de la source et sa concentration optimale est basée sur la mesure de la TS et l'index E_{24} .

2.5.2.4. Etude de la cinétique de production de biosurfactant

Sous les conditions optimales de production déjà déterminées, une culture a été réalisée dont le but est de suivre les variations de la tension superficielle, l'indice d'émulsification et le pH à différentes intervalles du temps : 0, 6, 24, 40, 48, 56, 72, et 120 heures. Après une bonne croissance, une centrifugation de la culture est réalisée à 4000 tr/min pendant 30 min, le culot est récupéré et filtré pour la mesure de la cinétique de la croissance. Les surnageants ont subi les mesures suivantes : TS et E_{24}

- **Extraction de biosurfactant** : L'extraction de biosurfactant s'effectue selon la méthode de précipitation acide [66] avec quelques modifications. Après 48 h d'incubation, le bouillon de culture a été centrifugé à 6000 tr.min^{-1} pendant 20 min. Le surnageant dépourvu de cellules bactériennes correspond au biosurfactant brut (selon le TS et E_{24}) est obtenu par une extraction liquide-liquide à l'aide de l'acétone (v/3v). Le surnageant est déposé sur un bain marie à $+4^\circ C$ et sous agitation jusqu'à évaporer toute la quantité de

l'acétone. Ensuite, il est laissé au repos pendant une nuit à +4 °C. Le précipité est récupéré par centrifugation à 6000 tr.min⁻¹ pendant 20 min puis un séchage pour récupérer le biosurfactant sous forme solide (figure 2.1)

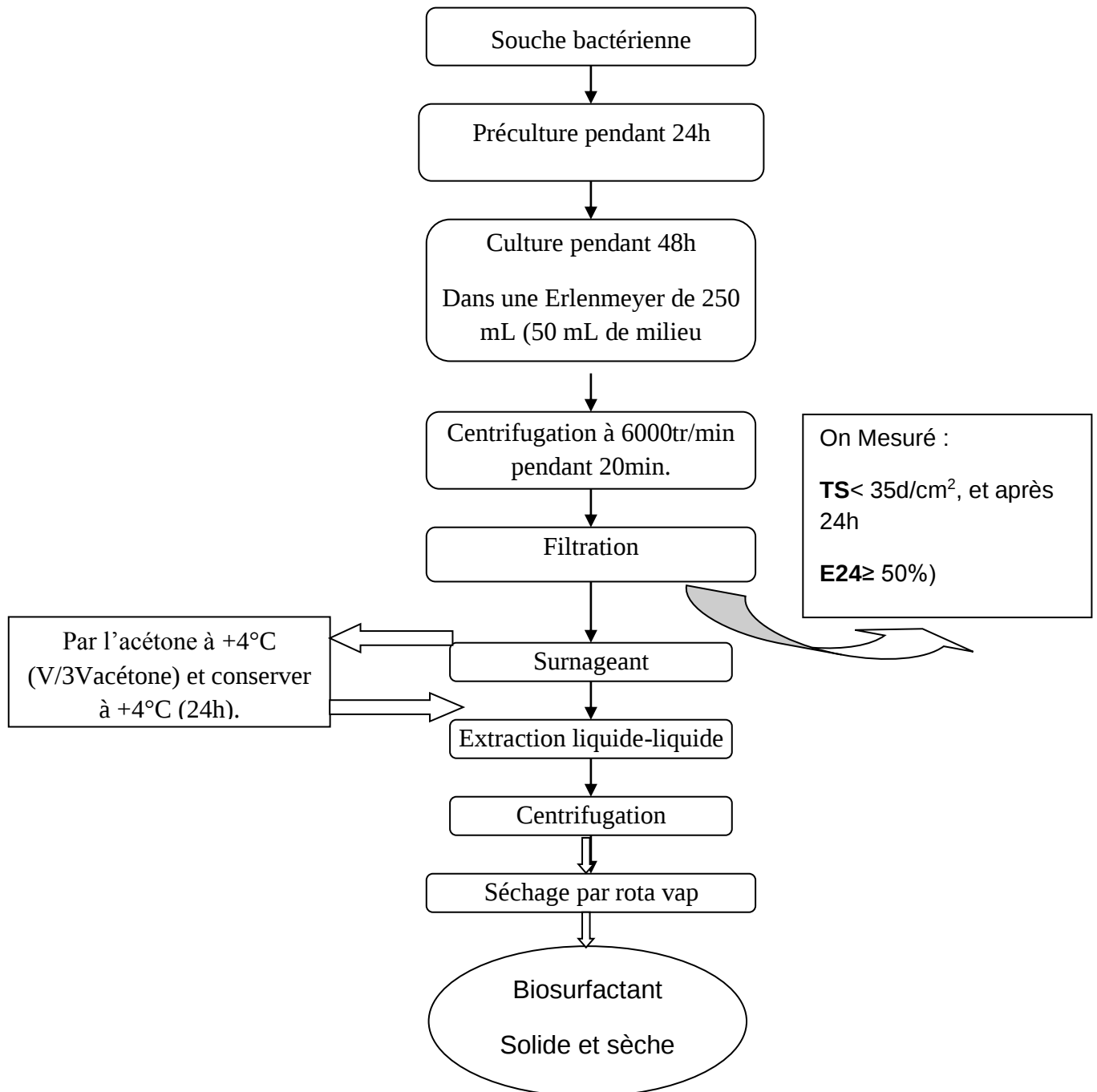


Figure 11: Procédure de production et extraction de biosurfactant.

2.5.2.5. Caractérisation de biosurfactant

- **Caractérisation structurale de biosurfactant** : La caractérisation structurale de biosurfactant a été effectuée au moyen d'analyse spectroscopique infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de la poudre sèche de biosurfactant en le balayant dans la gamme de 500 - 4000 cm^{-1} à une résolution de 4 cm^{-1} (cf. Méthodes de mesure, dosage et analytiques).

- **Caractérisation physico-chimique** : Cette étude a été réalisée sur le surnageant correspondant au biosurfactant brut. Le contrôle de l'efficacité s'effectue après 24h par la mesure de la mesure de la TS. Deux paramètres de stabilité ont été étudiés.

1) Stabilité chimique (pH et salinité) : Le pH du surnageant a été ajusté à différentes valeurs (2 à 12) en utilisant des solutions HCl ou NaOH à 1M. Pour examiner également l'effet de la salinité, le biosurfactant a été soumis à différentes concentrations en chlorure de sodium (NaCl) : 5, 15, 50 et 100 (p/v). Les solutions sont laissées à la température ambiante pendant 24h avant de mesurer la TS.

2) Stabilité thermique : Afin d'évaluer la thermostabilité du biosurfactant, le surnageant a été incubé à différentes températures : 4, 25, 45, 60 et 100 °C pendant 24h. L'efficacité après traitement thermique est confirmée par la mesure de la TS.

3) La concentration micellaire critique : La concentration micellaire critique (CMC) a été déterminée par la méthode de dilution en mesurant la tension superficielle à chaque dilution [231], puis en traçant la courbe de la tension de surface en fonction de la concentration de la solution du biosurfactant [232]. La concentration du biosurfactant, au delà de laquelle la tension de surface n'a pas changé, a été définie comme la CMC.

2.5.3. Production d'enzyme de type protéase

2.5.3.1. Milieux de cultures

Tous les milieux utilisés dans ce travail sont stérilisés à 120 °C pendant 20 min.

- **Milieu LB solide (« Luria-Bertani »)** : Voir composition dans la section 2.5.2.1.

- **Milieu gélose nutritive au lait (GNL)** : Ce milieu est utilisé pour le criblage des souches productrices de protéases, il est composé de : 5g peptone ; 3 g extrait de levure et 15 g d'agar dans 750 mL d'eau distillée. Le pH est ajusté avec du NaOH 1M à une valeur

désirée (7,4). Après stérilisation et refroidissement, 250 mL du lait écrémé sont ajoutés et le milieu est homogénéisé puis coulé dans des boîtes de Pétri. Le milieu GNL est utilisé pour le criblage des souches producteurs de protéases. En effet, c'est un test semi-qualitatif qui repose sur le fait que les protéases, secrétées par les souches protéolytiques, vont diffuser dans le milieu gélosé environnant et vont aussi hydrolyser les protéines du lait (caséines). L'activité protéolytique des enzymes se traduit par l'apparition des halos transparents autour des colonies qui produisent des protéases.

- **Milieu de production de protéase :BILM(g/L)** : Caséine (15); extrait de levure (2); CaCl_2 (0,5); K_2HPO_4 (0,5); KH_2PO_4 (0,5) et 1% (v/v) pétrole et 2% (v/v) oligoéléments (en g/L : ZnCl_2 (0,4); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2); H_3BO_3 (0,065) et $\text{MoNa}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,135) dans un litre d'eau distillée et le pH est ajusté à 7,4. Les cultures ont été réalisées sur une incubation agitée (180 rpm) pendant 46 h à 45 °C dans Flacons Erlenmeyer de 1000 ml avec un volume utile de 100 mL.

2.3.3.2. Précultures

Les précultures des souches criblées ont été préparées sur milieu LB liquide dans un Erlenmeyer de 250 mL avec un volume utile de 25 mL. L'incubation se fait pendant 24h à 45 °C et sous agitation de 180 rpm.

2.5.3.3. Optimisation de la production des protéases par la souche codée NIJ

Au cours de cette partie du travail, nous nous sommes proposé d'évaluer la production de la protéase de la souche candidate NIJ. Au fait, nous avons au départ utilisé un milieu initial N (non optimisé) composé de : 15 g/L source de carbone ; 2 g/L source d'azote ; 0.5 g/L CaCl_2 ; 0.5 g/L K_2HPO_4 et 0.5 g/L KH_2PO_4 à pH 7,4. À partir de ce milieu nous avons alors cherché à optimiser les différents composants.

- **Nature de la source de C/et ou N** : Diverses sources de carbone (SC) et des sources d'azote (SN) ont été utilisées :

1) Source de carbone (5 g/L) : Caséine, gélatine, glucose, fructose, galactose, saccharose et maltose.

2) Source d'azote (2 g/L) : Extrait de bœuf, extrait de levure, peptone de levure, peptone de soja, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; chlorure d'ammonium, NH_4Cl ; nitrate de sodium et NaNO_3 et nous avons gardé 5 g/L de la caséine comme source de carbone.

- **Concentration de la source de C/et ou N:** Après étude, nous avons retenu comme meilleur source de carbone la caséine qui est ajoutée à 5, 10, 15 et 20 g/L dans le bouillon de production (ci-dessus les conditions) afin d'obtenir une production maximale. Idem pour la source d'azote qu'elles'agit de l'extrait de levure additionnée à différentes concentrations: 2, 4, 6, 8 et 10 g/L.

Le suivi de la production a été effectué par le dosage de l'activité protéolytique (activité protéase) (CF la section méthode de mesures, dosages et analytiques).

2.5.3.4. Extraction et purification de la protéase produite par la souche NIJ.

Nous avons adopté un protocole expérimental optimisé comme suit [156]:

- **Séparation de la protéase de la souche NIJ :** Les biomasses issues des cultures de 46h de la souche NIJ ont été éliminées par centrifugation à 9000rpm pendant 30 min et à +4 °C. Le surnageant récupéré, contenant l'activité protéolytique, est clarifié par filtration à travers une membrane de 0,45 µm et gardé en vue de la purification selon la procédure convenable.

- **Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium :** La précipitation fractionnée des protéines de l'extrait brut a été réalisée de la manière suivante : On ajoute au surnageant, en faible quantité sous une agitation douce et à froid, de sulfate d'ammonium solide jusqu'à 40% de saturation (242 g/L). On laisse sous agitation pendant 2h puis on centrifuge à 9000 rpm pendant 30 min, le surnageant recueilli est additionné de sulfate d'ammonium solide jusqu'à 70% de saturation (202 g/L). Après 2h d'agitation, on centrifuge de nouveau à 9000 rpm pendant 30 min. Le culot est repris immédiatement dans le minimum de tampon HEPES 50mM, additionné avec 2 mM CaCl_2 à pH 7,1 (nommée tampon B) puis on centrifuge à 9000 rpm pendant 30 min. Le surnageant obtenu est dialysé à +4 °C contre le tampon B pendant une nuit.

- **Traitement thermique :** L'extrait enzymatique obtenu après l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium subira un traitement thermique à 90 °C pendant 30 min, puis centrifugé pendant 30 min à 9000 rpm. Cette opération a pour but de précipiter une part

importante de protéines du surnageant par dénaturation thermique. Le surnageant récupéré contient l'activité protéolytique (protéase).

- **Chromatographie échangeuse de cations** : Le surnageant récupéré après l'étape de traitement thermique est alors déposé sur une colonne de UNO Q-6, utilisant le système FPLC « Fast Pressure Liquide Chromatography », préalablement équilibrée avec le tampon B. L'élution des protéines, avec le même tampon contenant une concentration croissante de NaCl de 0 à 500mM, se fait à un débit de 45 mL/h et est suivie par la lecture de la DO à 280 nm et le test d'activité protéasique.

- **Chromatographie d'exclusion diffusion sur ZORBAX PSM 300-HPLC** : L'échantillon est préparé dans le plus petit volume manipulable possible. Nous avons choisi d'utiliser une boucle d'injection de 500 µL dans laquelle nous injectons 100 µL, puis 500 µL en diluant si besoin pour ne pas dépasser 10 mg de protéine par injection. Le contenu de cette boucle est alors injecté sur la colonne et séparé avec un débit de 45 mL/min. La colonne utilisée a été calibrée en utilisant un kit standard renfermant des protéines de masses connues et distribuées commercialement par Bio-Rad, France, sous forme de poudre. 1 mg de poudre de kit est ainsi dissout dans 1 mL de tampon Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) contenant 2 mM CaCl₂ (nommée tampon C) utilisé pour purifier notre protéine d'intérêt, et centrifugé (10000 rpm pendant 30 min) pour éliminer tous les agrégats qui pourraient altérer la colonne.

- **Séparation des protéines sur gel d'acrylamide** : La pureté d'enzyme est estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) à 10%. Cette analyse des préparations enzymatiques par électrophorèse dans des conditions dénaturantes est réalisée selon la technique de **Laemmli**[233]. On dépose dans le puits 50 µg de protéines et l'électrophorèse est menée à 100 mV et à un ampérage constant.

2.5.3.5. Caractérisation moléculaire de la protéase SAPNIJ

- **Mise en évidence de la bande enzymatique correspondante à l'activité protéasique sur zymogramme** : Après migration sur gel de polyacrylamide, nous incorporons un substrat de protéase (azocaséine), dans des conditions dénaturantes. Le gel lavé dans l'eau distillée pendant 1h en présence de 2,5 % Triton X-100 afin de remplacer le SDS puis incubé pendant 3h à 40 °C en présence du tampon B. Une zone claire est visualisée sur le

gel traité, après fixation pendant 1h du TCA 20% (p/v) nous procédons à la coloration au bleu de Coomassie G-250 et décoloration par l'eau distillée/méthanol/acide acétique[157].

- Détermination des acides aminés des extrémités N-terminales par la méthode automatisée d'Edman : La séquence N-terminale de l'enzyménative(SAPNIJ) a été déterminée par la méthode automatisée d'Edman sur microséquenceur de protéines[234, 235].

Elle comporte les trois étapes classiques de séquençage, à savoir : le couplage, le clivage et la conversion(Cf. annexe5).L'alignement de la séquence obtenue avec les différentes séquences des présentes dans le GenBank est effectué en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment SearchTool) et les outils analytiques disponibles sur le site ExPASy .

2.5.3.5. Caractérisation biochimique de la protéase SAPNIJ

- Effet des inhibiteurs sur l'activité enzymatique : La protéase SAPNIJ est incubée en présence de différents inhibiteurs spécifiques pendant 1h à 40°C avec un rapport ratio inhibiteur/enzyme égale à 100. Les activités résiduelles sont mesurées aux conditions optimales de l'enzyme.

Les inhibiteurs de protéases utilisés sont:

- Inhibiteurs de protéases à sérine : le phénylméthylsulphonylfluoride PMSF, le diisopropylfluorophosphate DFP.
- Inhibiteurs de la chymotrypsine : le *N*α-*p*-tosyl-L-phenylalaninechlorométhyl cétone (TPCK),le*N*α-*p*-tosyl-L-lysine chlorométhyl cétone (TLCK)
- Inhibiteur de la trypsine : l'inhibiteur trypsine de Soja SBTI.
- Inhibiteurs compétitive de la trypsine : Benzamidine.
- Inhibiteurs de protéases à thiol : 2-ME ; DTNB;; *N*-éthylmaléimide (NEM); Iodoacétamide; Leupeptine.
- Inhibiteur des protéases acides : Pepstatine A.
- Inhibiteurs de métallo-protéases : l'acide éthylène diamine tétra-acétique EDTA; EGTA.

- **Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique :** L'activité protéolytique est testée à pH 11 et à 70°C, en absence (contrôle contenant 2 mM EGTA, agent chélateur) ou en présence de 2 mM de sels de métaux bivalents: Ca²⁺ (CaCl₂) ; Mn²⁺ (MnSO₄) ; Mg²⁺

(MgSO₄) ; Cu²⁺ (CuSO₄) ; Zn²⁺ (ZnSO₄) ; Co²⁺ (CoSO₄) ; Fe²⁺ (FeSO₄) ; Ni²⁺ (NiCl₂) et Hg²⁺ (HgCl₂) et Cd²⁺ (CdCl₂).

- **Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la protéase SAPNIJ** : Les réactions d'hydrolyse de la caséine, par la protéase SAPNIJ, sont réalisées à des pH allant de 2 à 13. Tous les tampons sont utilisés à des concentrations de 100 mM et en présence de 2 mM CaCl₂ : glycine-HCl pour les pH 2 à 5 ; acide 2-(N-morpholino) éthane sulfonique (MES) pour les pH 5 à 6 ; (HEPES) pour les pH 6 à 8 ; Tris-HCl pour les pH 8 à 9 ; glycine-NaOH pour les pH 9 à 11 ; bicarbonate-NaOH pour les pH 11 à 11,5 ; Na₂HPO₄-NaOH pour les pH 11,5 à 12 et KCl-NaOH pour les pH 12 à 13. La protéase SAPNIJ purifiée est pré-incubée pendant 6 h à 40°C à des pH variant de 7 à 12. Les activités résiduelles sont mesurées aux optimum de pH et de température de l'enzyme.

- **Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la protéase SAPNIJ** : Le milieu réactionnel est maintenu à une valeur optimale de pH (11) et en faisant varier la température de 40 à 100°C en présence ou en absence du calcium (2 mM).

La SAPNIJ a été incubée à 70, 80 et 90°C pendant 6h, en présence ou en absence du calcium (2 mM). Un échantillon est prélevé à des intervalles de temps réguliers pour doser les activités protéases résiduelles dans les conditions standard.

- **Effet des polyols sur la stabilité de la protéase SAPNIJ** : La SAPNIJ est pré-incubée pendant 6h à 90°C, en absence ou en présence de propylène glycol (PEG) 1000, de PEG 1500, de PEG 6000, de glycérol, de sorbitol, de mannitol et de xylitol puis les activités protéolytiques résiduelles sont mesurées aux conditions optimales de l'enzyme.

- **Effet combiné du CaCl₂ et du PEG 1500 sur la thermostabilité de la protéase SAPNIJ** : La SAPNIJ est pré-incubée pendant 6h à 90°C, en absence ou en présence de 100 g/L de PEG 1500 et 2 mM CaCl₂ puis les activités protéolytiques résiduelles sont mesurées aux conditions optimales de l'enzyme.

- **Effet de la nature du substrat sur l'activité enzymatique de la SAPNIJ** : Deux natures différentes de substrats protéiques sont utilisées. Des substrats naturels : Caséine, Albumine, Gélatine, kératine, et Ovalbumine et des substrats modifiés : azo-caséine, albumine azure, kératine azure et le collagène types I et II.

En plus, d'autres substrats protéiques sont utilisés tels que : les esters (BTEE ; ATEE ; BCEE ; BAEE et TAME) et les peptides synthétiques utilisés sont Succinyl-XXX ou XXXX-pNA avec XXX ou XXXX qui représentent FAAF, AAPF, AAVA, AAPM, AAPL, AAF, AAA, AAL, AAV, AAI et YLV, respectivement. Ces peptides ont été dissous dans 10% (v/v) DMF avant d'être dilués dans le tampon et ils

doivent être préparés extemporanément du fait que les substrats nitroanilides montrent des degrés variables de l'autolyse pendant le stockage.

Les activités enzymatiques ont été déterminées sur chaque support selon les conditions standards précédemment décrit par Zaraï Jaouadi et al. [236].

- Détermination des paramètres cinétiques : Les paramètres cinétiques ont été calculés à partir des taux d'activités des enzymes commerciales et purifiées aux pH et températures optimaux (pH 11 et 70 °C pour SAPNIJ ; pH 10 et 70 °C pour SAPHM ; pH 9 et 60 °C pour SAPRH ; et pH 8 et 60 °C pour Savinase™ 16L, type EX) en utilisant la caséine et peptide synthétique [N-succinyl-L-Ala-LAla- L-Pro-L-Phe-p-nitroanilide]. La réaction a été réalisée en triple sur différents substrats à des concentrations allant de 0 à 50 mM dans le tampon additionné de 10% (v/v) de diméthyle sulfoxyde (DMSO) et 1% (v/v) de Triton X-100. Les paramètres cinétiques ont été estimés par Lineweaver– Parcelles de Burk. Les constantes cinétiques, Michaelis – Menten (K_m) et la vitesse de réaction maximale (V_{max}) ont été calculées à l'aide du logiciel Hyper32, <https://hyper32.software.informer.com/T%C3%A9l%C3%A9charger/>.

2.6. Applications biotechnologiques

Deux applications biotechnologiques ont été ciblées dans notre étude de thèse, à savoir, la substitution des additifs chimiques et enzymes commerciales fréquemment utilisées dans la détergence par notre protéase, d'une part, et le traitement biologique d'un rejet complexe (contenant de la matière organique riche en hydrocarbures et en protéines) en utilisant en culture pure de notre souche candidate NIJ, d'autre part.

2.6.1. Application en détergence

Les enzymes purifiées (SAPNIJ-présente étude); SAPHM-Témoin ; SAPRH-Témoin, Savinase™-commerce 16L et type EX-commerce) ont été pré-incubés pendant 6h à 40 °C en présence d'agents de blanchiment (H_2O_2 et perborate de sodium), tensioactifs (SDS, LAS et sulfobétaïne), tensioactifs non ioniques (Tween 20, 40, 80 et Triton X-100), anti-rédiposition (Na_2CO_3 , STPP, TAED et Na_2CMC) et d'autres additifs détergents. L'activité résiduelle a été réalisée dans le pH optimal et la température de chaque enzyme par rapport à 100% sans aucun additif. H_2O_2 dans 100 mM borate- Le tampon NaOH a également été dosé puis les activités résiduelles ont été déterminées par rapport au témoin.

2.6.1.1. Stabilité et compatibilité des enzymes avec des détergents à lessive

Cinq cents (500) U/mL de chaque protéase purifiée et précédemment testés avec des détergents à lessive ont été agités (250 tr/min) pendant 1h à 40 °C en présence de détergents liquides et solides (dilués dans l'eau du robinet à une concentration finale de 7 mg/mL[237] et préalablement chauffés pendant 1h à 65 °C afin d'inactiver les protéases endogènes [238]), dont la liste est comme suit : liquide [Dipex et Ecovax (Klin Productions, Sfax, Tunisie), Classe (EJM, Sfax, Tunisie), Omino Bianco, Fairy et iSiSpril (Henkel, Algérie), et Skip (Unilever, France)], et solide [Ariel, Persil et Tide (Procter & Gamble, Suisse), OMO (Unilever, France), Dixan, Axion et Nadhif (Henkel, Tunisie), et Dét (Sodet, Sfax, Tunisie)]. Nous avons employé DMC comme substrat et l'activité résiduelle a été déterminée comme décrit précédemment.

2.6.1.2. Élimination des taches de protéines sur les tissus cotons

Les quatre protéases, y compris la cible (présente étude), ont été testées pour éliminer les taches de sang contenues sur des morceaux de tissu de coton (10 cm × 15 cm) émergés dans des béciers (1L) contenant un volume total de 100 mL sous différentes conditions :

- 1) 100 mL d'eau de robinet.
- 2) 100 mL d'eau de robinet + solution de détergent commercial Ariel ou iSiS-Pril à (7 mg/mL).
- 3) 100 mL d'eau de robinet + solution de détergent commercial Ariel ou iSiS-Pril à (7 mg/mL) additionnée à SAPRH (500 U/mL).
- 4) 100 mL d'eau de robinet + solution de détergent commercial Ariel ou iSiS-Pril à (7 mg/mL) additionnée à SAPHM (500 U/mL).
- 5) 100 mL d'eau de robinet + solution de détergent commercial Ariel ou iSiS-Pril à (7 mg/mL) additionnée à Savinase™ 16L, type EX (commercial enzyme, 500 U/mL)
- 6) 100 mL d'eau de robinet + solution de détergent commercial Ariel ou iSiS-Pril à (7 mg/mL) additionnée à SAPNIJ (500 U/mL).

Après cela, les lavages ont été incubés sous agitation (250 tr/min) à 40 °C pendant 30 min comparativement à des taches de sang non traitées sur des morceaux de vêtement. Après traitement, les morceaux de tissu ont été retirés, rincés à l’eaudistillée, séchés et soumis à une observation visuelle pour examiner effets d’élimination des enzymes sur la tâche (une simple comparaison avec le coton non traité).

2.6.2. Dépollution d’un rejet liquide complexe

2.6.2.1. Échantillonnage

Deux points de prélèvement ont été choisis : Un rejet d’abattoir de volailles de la wilaya de Blida (riche en protéines) et un lavage d’automobile de la wilaya de Blida (riche en hydrocarbures).

- **Conservation, transport et stockage des échantillons** : Les prélèvements ont été effectués dans des flacons bien propres en verre. Nous rinçons au moment de l’emploi avec de l’eau à analyser (trois fois maximum), puis les récipients seront remplis, étiquetés et conservés à +4°C, ensuite elles seront transportées dans une glacière jusqu’au laboratoire dans un laps de temps ne dépassant pas 24h.

- **Préparation des échantillons** : Au laboratoire, les échantillons sont décantés pendant 30 min, puis filtrés sur papier filtre de diamètre de 45µm pour réduire la DCO et la matière en suspension entre 25 - 30 % [239], ensuite stérilisés dans un autoclave pendant 20 min à température de 120°C. La stérilisation de rejet d’abattoir a donné deux phases : une phase supérieure liquide et une phase inférieure solide, les essais sont réalisés sur la phase liquide. Par ailleurs le rejet complexe est préparé au laboratoire par un mélange de 50% de rejet d’abattoir et 50% de rejet de lavage

- **Dépollution de rejet complexe** : La dépollution de rejet liquide est effectuée par ajout de 1% de la préculture de la souche NIJ dans des erlenmeyers de 500 mL remplis de 100 mL de rejet liquide puis les incubés à une température de 45 °C et sous une agitation de 150 tr.min⁻¹ pendant une semaine.

La performance de notre souche dans la dépollution de rejet liquide est suivie par le dosage et la mesure des paramètres standards de pollution suivants : Azote total (NT) - Phosphore totale (PT) - Demande chimique en oxygène (DCO) - Demande biochimique en oxygène (DBO5) - Mesure de pH - Matières en suspension (MES) - Mesure de la conductivité - Mesure de l’oxygène dissout. Les détails des protocoles expérimentaux sont donnés en annexes.

2.7. Méthodes de mesures, dosages et analytiques

Toutes les méthodes de mesure, dosage et analytiques utilisées au cours de différentes étapes de cette présente étude sont décrites selon l'ordre ci-dessous.

2.7.1. Méthodes de mesures et de dosages

2.7.1.1. Détermination de la tension superficielle

La méthode utilisée consiste à prélever un échantillon de culture de production incubée pendant 48 h. Ce procédé a été réalisé pour chaque souche bactérienne étudiée (7). Le bouillon de culture est centrifugé à 6000tr/min pendant 20 min afin de séparer la biomasse. Le supernageant séparé est le liquide dont lequel on mesure la tension superficielle. La mesure de la tension superficielle a été réalisée par la méthode de l'arrachement d'anneau en platine par un tensiomètre de marque KRUSS K6 à anneau[240].

2.7.1.2. Détermination de l'index d'émulsion E_{24}

Le test consiste à mélanger 2 mL du milieu de culture (de fermentation) ou le surnageant contenant le biosurfactant avec 2 mL des hydrocarbures (huile d'olive, huile de moteur, mazoute et kérosène) dans des tubes à essais stériles. Les tubes sont agités au vortex pendant 2min. Puis après homogénéisation des deux phases et un repos de 24h, on procède au calcul de l'index d'émulsion(E_{24}) selon la relation suivante[241] :

$$E_{24} = (he / ht) \times 100$$

_ **he** : hauteur de l'émulsion.

_ **ht** : hauteur totale du mélange.

2.7.1.3. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée selon une méthode caséinolytique modifiée [236] utilisant la caséine de Hammerstein (Merck, Darmstadt, Allemagne) en suivant les étapes ci-dessous.

- ✓ mélanger 0,5 mL d'une solution de caséine (10 g/L) dans le tampon glycine-

NaOH 100 mM à pH 11 en présence de 2 mM CaCl₂ (tampon A) avec 0,5 mL de la solution enzymatique préalablement diluée. Incuber la réaction enzymatique à 70 °C pendant 15 min.

- ✓ arrêter la réaction par addition de 2,5 mL de TCA à 200 g/L (le TCA précipite la caséine non hydrolysée).
- ✓ incuber au paillasse à une température ambiante (25°C±2°C) pendant 30 min.
- ✓ centrifuger le milieu réactionnel à 15000 rpm pendant 20 min.
- ✓ on mélange 0,5 mL surnageant clair, 2,5 mL Na₂CO₃ 500 mM et 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu, incubé 30 min dans la chambre thermique. L'absorbance est mesurée à 660 nm contre un contrôle à blanc et l'activité protéase est mesurée en détectant la tyrosine libérée lors de l'hydrolyse de la protéase par rapport à une courbe d'étalonnage.

Une unité (1 U) d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/mL/min dans ces conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage, de 0 à 100 µg/mL, de tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions à partir de laquelle nous avons déduit que 1 µg/mL de tyrosine correspond à une DO_{660 nm} de 0,0033. L'activité protéasique (U/mL) est déduite à partir de l'équation ci-dessous :

$$\text{ACTIVITE} = \frac{\text{DO} \times \text{D} \times \text{d}}{\text{t} \times 0,0033}$$

d : dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel.
D : dilution de l'enzyme.
t : temps de la réaction en minutes.

L'activité protéolytique présente dans le linge solution détergente a été évaluée, à 450 nm, par la méthode détaillée par BoulkourTouioui et al. [242] utilisant la caséine N,N-diméthylée (DMC) comme substrat et acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBSA) comme indicateur de couleur.

2.7.1.4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford [243]. Nous avons utilisé le kit (Bio-Rad Protein Assay) Bio-Rad, France, en mélangeant à chaque fois 200 µL de colorant,

le bleu de Coomassie G250, à 800 μL d'une solution diluée de la protéine. La densité optique est mesurée à 595 nm contre un blanc qui ne contient pas d'extrait enzymatique. Afin d'obtenir des résultats fiables, la densité optique des échantillons étudiés doit être comprise entre 0,2 et 0,7. Cette méthode nécessite aussi une courbe de référence (étalon) établie en utilisant l'albumine du sérum bovin comme protéine standard, ce qui nous permettra d'estimer la quantité de protéine.

2.7.2. Méthodes analytiques

2.7.2.1. Analyse par spectrophotomètre à transformée de Fourier IRTF

Les spectres infrarouges ont été obtenus en utilisant un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR, Jasco type IRTF-8900). Le précipité du biosurfactant a été dissous dans le tétrachlorure de carbone (CCl_4) et l'analyse a été effectuée aux longueurs d'onde comprises entre 500 et 4000 cm^{-1} à une résolution de 4 cm^{-1} [68].

2.7.2.2. Chromatographie d'exclusion diffusion sur ZORBAX PSM 300-HPLC pour

La purification de la protéase SAPNIJ

Cette technique est appelée encore chromatographie par perméation de gel ou filtration sur gel. Elle permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise pour cela des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières au niveau du volume mort (appelé V_0). Les petites et les moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'élution et le logarithme de la masse moléculaire.

2.7.2.3. Coloration au bleu de Coomassie pour la mise en évidence de la bande de la protéase sur gel d'agarose

Cette méthode colore les protéines de façon à peu près indépendante de la séquence. Après migration électrophorétique, le gel est plongé dans une solution de coloration [1 g de bleu de Coomassie R250 (BioRad) dans 50 mL d'acide acétique, 250 mL d'éthanol et 200 mL H_2O], le gel est ensuite transféré dans une solution de

décoloration (acide acétique 100 ml ; éthanol 350 ml et 650 ml H₂O). Le gel est stocké dans de l'eau avec 20% d'éthanol, ce qui achève la décoloration et évite la contamination par les bactéries, puis séché ou scanné.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3. Identification de la souche NIJ

Pour identifier la souche NIJ, nous avons eu recours à des approches morphologiques, physiologiques et moléculaires .



Figure 3.1: Photo de la souche NIJ sur milieu solide

3.1. Identification phénotypique

Nous avons effectué des tests bactériologiques préliminaires d'orientation (annexe 7) afin de choisir la galerie API adéquate. Cette analyse a prouvé qu'il s'agit d'une souche aérobique et Gram positive. Ainsi, en se référant aux résultats décrits dans le manuel de Bergey Systématique de la Bactériologie [254], il a été suggéré que la souche NIJ est une bactérie appartenant au genre *Bacillus*. À la lumière de ces résultats, nous avons choisi la galerie adéquate en l'occurrence la galerie API 50 CH (annexe 7).

La galerie API 50 CH (annexe 7) permet d'étudier le métabolisme de 49 substrats d'hydrates de carbone et ses dérivés ainsi que des activités enzymatiques, respectivement de la souche NIJ. La lecture s'effectue après incubation à 45 °C pendant 20h puis 48h. Le logiciel APILAB (bioMérieux) permettra ensuite d'obtenir, à un pourcentage admis, l'identité de la bactérie en comparaison à des profils typiques.

La lecture de la galerie API 50 CH confirme qu'il s'agit des souches du genre *Bacillus* et qu'elle métabolise plusieurs sucres carbohydratés et possède des activités enzymatiques caractéristiques des autres souches de *Bacillus* et que la détermination de l'espèce nécessite d'autres tests supplémentaires.

1.2. Taxonomie moléculaire (identification moléculaire par la technique de l'ARN 16S)

Dans le but d'identifier de manière plus précise l'espèce de la souche NIJ, nous avons utilisé la méthode d'identification moléculaire (l'ARN ribosomique : ARNr 16S). Cette méthode est considérée actuellement comme méthode rapide et plus fiable pour la détermination de l'espèce. En plus, elle permet la réalisation des études phylogénétiques comparées aux techniques classiques de la taxonomie [245, 246]. De ce fait, pour amplifier tout le gène de l'ARNr 16S par PCR, nous avons choisi un couple d'amorces (Directe, Oligo F-27 et Reverse, Oligo R-1525) dont les séquences appartiennent aux régions conservées flanquant ce gène. Ainsi, nous avons amplifié un fragment d'ADN de taille attendue estimée à ~1,5 kb (figure 3.2).

Oligo F-27 : 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' (Position 8 à 27 chez *E. coli*).

Oligo R-1525 : 5' AAGGAGGTGATCCAAGCC 3' (Position de 1541 à 1525 chez *E. coli*).

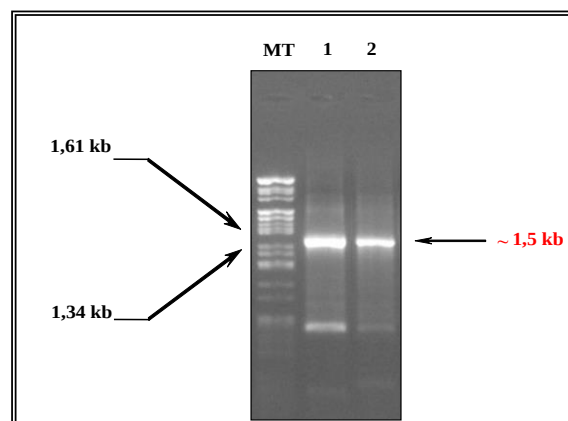


Figure 3.2: Analyse du produit PCR de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche NIJ

Piste 1: Produit PCR avec *Taq* polymérase ; **Piste 2:** Produit PCR avec *pfu* polymérase ;
Piste MT: Marqueur de taille λ -HincII (4,58 ; 3,51 ; 3,27 ; 2,84 ; 2,19 ; 1,96 ; 1,79 ; 1,67 ; 1,61 ; 1,34 ; 1,26 ; 1,1 ; 0,86 ; 0,73 ; 0,56 kb).

Ce fragment PCR (1507 pb) a été purifié puis cloné dans un vecteur approprié, en l'occurrence le pGEM-T (3015 pb), pour générer le plasmide pHL-16S de taille 4522 pb (figure 3.3).

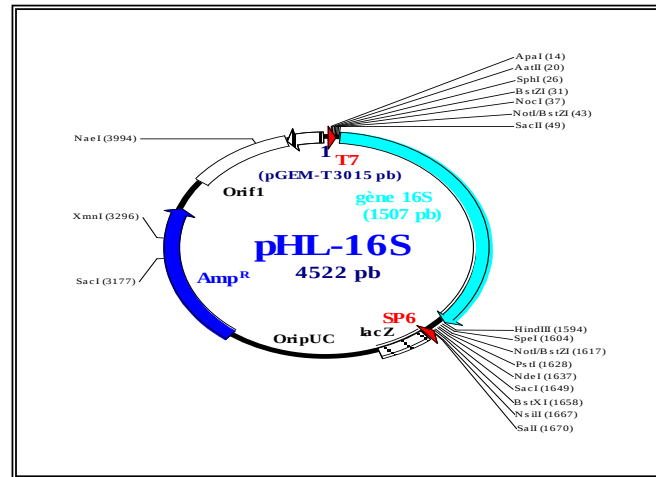


Figure 3.3: Carte de restriction du plasmide pHL-16S (4522 pb).

Par la suite, la séquence nucléotidique totale de ce fragment a été déterminée moyennant les techniques de séquençage automatique (figure 3.4). La séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche NIJ a été déposée dans la banque de données « GenBank BLAST » sous le numéro d'accèsion GenBank : **MG890424**.

```
GTGCTAAGACAGTTATTAATAACCAAAAAATTTTAAATTGGTCCTCCAAAAAATAGGCCTACCATATAAT
TCATTTTTTTTTCTATAATAAATTAACAGAATAATTGGAATAGATTATATTATCCTTCTATTTAAATTATTC
TGAATAAAGAGGAGGAGAGTGAGTAATGATGAGGAAAAAGAGTTTTTGGCTTGGGATGCTGACGGCCTTCA
TGCTCGTGTTACGATGGCATTTCAGCGATTCCGCTTCTGCTGCTCAACCGCGGAAAAATGTTGAAAAGGAT
TATATTGTCGGATTTAAGTCAGGAGTGAAAACCGCATCTGTCAAAAAGGACATCATCAAAGAGAGCGGCGG
AAAAGTGGACAAGCAGTTTAAATCATCAACGCGGCAAAAGCGAAGCTAGACAAAGAAGCGCTTAAGGAAG
TCAAAAATGATCCGATGTCGCTTATGTGGAAGAGGATCATGTGGCCCATGCCTTGGCGCAAACCGTTCCT
TACGGCATTCCTCTCATTAAGCGGACAAAGTGCAGGCTCAAGGCTTTAAGGAGCGAATGTAAAAGTAGC
CGTCCTGGATACAGGAATCCAAGCTTCTCATCCGACTTGAACGTAGTCGGCGGAGCAAGCTTTGTGGCTG
GCGAAGCTTATAACACCGACGGCAACGGACACGGCACACATGTTGCCGGTACAGTAGCTGCGCTTGACAAT
ACAACGGGTGTATTAGGCGTTGCGCCAAGCGTATCCTTGTACGCGGTTAAAGTACTGAATTCAAGCGGAAG
CGGATCATACAGCGGCATTGTAAGCGGAATCGAGTGGGCGACAACAAACGGCATGGATGTTATCAATATGA
GCCTTGGGGGAGCATCGGGCTCGACAGCGATGAAAACAGGCAGTCGACAATGCATATGCAAGAGGGGTTGTC
GTTGTAGCTGCAGCAGGGAACAGCGGATCTTCAGGAAACACGAATACAATTGGCTATCCTGCGAAATACGA
TTCTGTCATCGCTGTTGGTGCGGTAGACTCTAACAGCAACAGAGCTTCATTTTCCAGTGTGGGAGCAGAGC
TTGAAGTCATGGCTCCTGGCGCAGGCGTATACAGCACTTACCCAACGAACACTTATGCAACATTGAACGGA
ACGTCAATGGCTTCTCCTCATGTAGCGGGAGCAGCAGCTTTGATCTTGTCAAAACATCCGAACCTTTCAGC
TTCACAAGTCCGCAACCGTCTCTCCAGCACGGCGACTTATTTGGGAAGCTCCTTCTACTATGGGAAAGGTC
TGATCAATGTGCAAGCTGCCGCTCAATAACATATTCTAACAATAGCATATAGAAAAAGCTAGTGTTTTTTA
GCACTAGCTTTTTTCTTCTGATGAAGGTTGTTCAATATTTGAATCCGTTCATGATCGTCGGATGGC
CGTATTTAAAAATCTTGA
```

Figure 3.4: Séquence nucléotidique du gène d'ARNr 16S (4522 pb) de la souche NIJ.

L'alignement de cette séquence est réalisé avec la banque de données GenBank BLAST. Cette dernière est considérée plus sûre étant donné qu'elle englobe les séquences des bactéries de référence qui sont bien expertisées et revérifiées par des spécialistes. L'analyse des résultats obtenus montre que la souche NIJ présente une homologie de séquence de 0,939 et 0,941% avec les souches types du genre *Bacillus* et en particulier avec la souche de *Bacillus atrophaeus* BKS1-45 (HM585062) et la souche de *Bacillus atrophaeus* ATCC 51189 (EF188847).

La souche NIJ présente une identité très importante (97%) avec les gènes d'ARNr 16S des souches de *Bacillus* notamment celles de l'espèce *licheniformis* à savoir : *Bacillus aerophilus* JCM 13347^T (numéro d'accèsion GenBank : AJ831844), *Bacillus stratosphenicus* LAMA 585^T (numéro d'accèsion GenBank : AJ831841), *Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T (numéro d'accèsion GenBank : AB039328), *Bacillus licheniformis* NBRC 12197^T (numéro d'accèsion GenBank : AB680252) et *Bacillus aerius* 24K^T (numéro d'accèsion GenBank AJ831843).

Ces séquences ont été importées et alignées dans une version du logiciel MEGA 4.1. L'arbre phylogénétique a été ensuite construit (figure 3. 5) et les résultats en outre ont confirmé que la souche NIJ (numéro d'accèsion : **(MG890424)**) est étroitement liée aux autres souches de *Bacillus atrophaeus*.

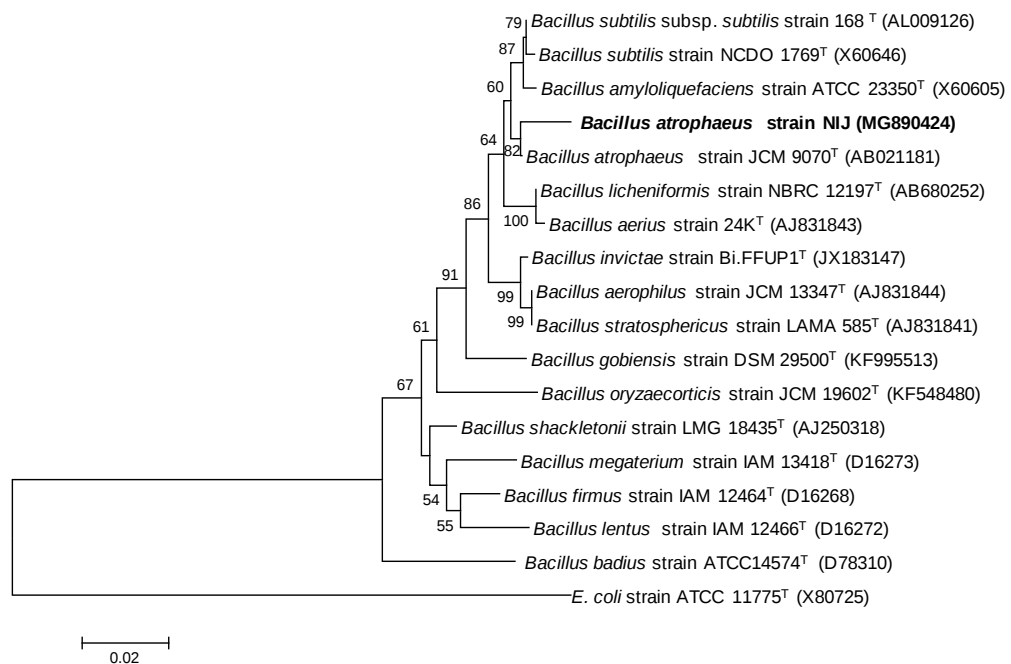


Figure 3. 5: Arbre phylogénétique obtenu après alignement du gène de l'ARNr 16S de la souche NIJ (numéro d'accèsion : MG890424) avec la banque de données GenBank BLAST.

L'utilisation des données phénotypiques et génotypiques permet une identification précise de bactéries. La souche codée NIJ était initialement attachée au genre *Bacillus* en se référant aux méthodes décrites dans le Bergey 's Manual of systematic Bacteriology [245] et prenant en compte les résultats suivants : forme bacille, aérobie, bâtonnets sporulés, Gram positif, catalase positif, l'oxydase positive, mobiles et les colonies sont rondes, ondulées, blanc mat et non luminescentes. La souche a métabolisé le citrate, le malate, le glycérol, le larabinose, ribose, galactose, fructose, mannose, inositol, mannitol, maltose, saccharose, D-turanose, D-tagatose, gluconate, lactate, L-aspartate et Lglutamate qui sont facilement utilisables comme sources d'énergie dans en plus d'autres sucres simples. Lactose, sorbitol, glycogène, L-xylose, D-lyxose, amidon, sorbose, érythritol, inuline, L-arabitol, acide caprique, acide adipique, l'acide phénylacétique, le propionate et la glycine ne sont pas utilisées comme sources d'énergie.

Un arbre phylogénétique basé sur le gène ADNr 16S (figure 3.5) a montré que les nouveaux isolats regroupés avec des membres de la genre *Bacillus*, le plus proche voisin étant *Bacillus atrophaeus* JCM 13347T avec une moyenne similarité de 99% (n° d'accession : AB021181). Sur la base des résultats obtenus au cours de la présente étude, nous suggérons l'attribution de cet isolat (n° d'accession MG890424) sous le nom : ***Bacillus atrophaeus* NIJ.**

3.2. Production de biosurfactant

3.2.1. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants

Sept souches bactériennes hydrocarbonoclastes ont été criblées afin de sélectionner une meilleure souche productrice de biosurfactant. Le criblage a été examiné par la mesure de la tension superficielle du surnageant dont les faibles valeurs ($<40 \text{ mN}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$) de TS indiquent la présence du biosurfactant dans le milieu de culture. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.6.

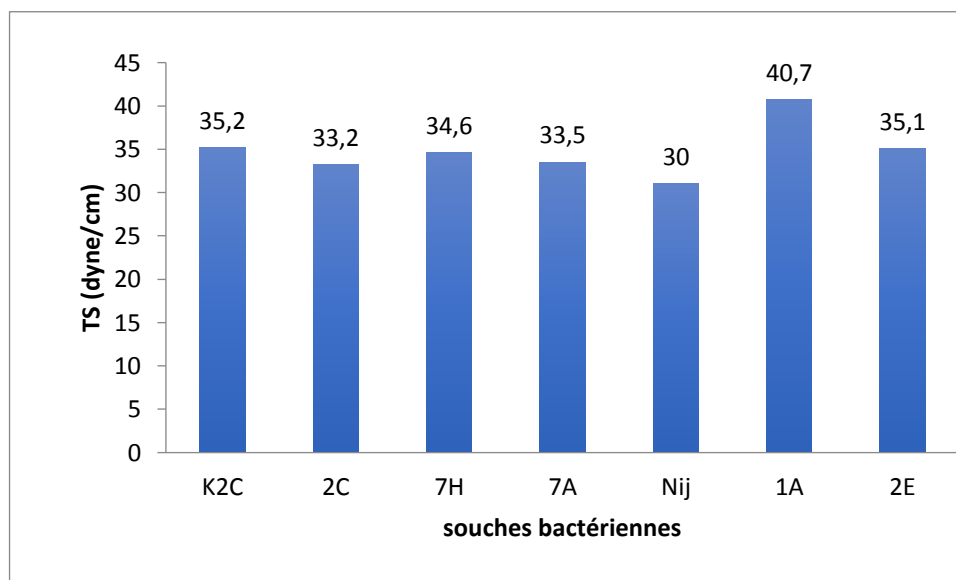


Figure 3.6: Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactant.

D'après ces résultats, la souche NIJ montre une capacité de production de biosurfactant très importante par rapport les autres souches. Notons qu'un biosurfactant plus actif peut réduire la tension de surface de l'eau de 72 à 30 dyne/cm et la tension interfaciale eau/hexadécane de 40 à 1 dyne/cm.

3.2.2. Criblage des hydrocarbures ou des huiles pour d'index d'émulsion

Le criblage d'un hydrocarbure ou l'huile permet de vérifier la capacité du biosurfactant d'émulsifier un hydrocarbure ou d'huiles, le criblage se fait par la mesure de l'index d'émulsion (E_{24}). le tableau 3.1 donne les valeurs de la E_{24} du surnageant pour les différents hydrocarbures et des huiles testées avec la souche NIJ après 24 heures.

Tableau 1.1: Valeurs de la E_{24} du surnageant pour chaque substrat ($T_{incub} = 45^{\circ}\text{C}$, pétrole brut (2%, v/v), $t_{incub} = 48$ h, 200 tr/min).

Substrats	Huile d'olive	Huile de moteur	Mazout	Kérosène
E_{24} (%)	41	85.57	4	0

D'après ces résultats, le meilleur hydrocarbure ou l'huile pour la production de biosurfactant comme agent émulsifiant par la souche NIJ est l'huile de moteur

($E_{24} = 85.5\%$). Par contre, les autres hydrocarbures et les huiles testées n'ont pas un pouvoir émulsifiant à cause de leurs E_{24} qui sont inférieures à 50%.

3.2.3. Optimisation des conditions de production du biosurfactant

3.2.3.1. Effet de la nature et la concentration de source de carbone

Le tableau 3.2 montre l'influence de la nature de la source de carbone sur la production du biosurfactant par la souche NIJ.

Tableau 3.2: Effet de la nature de la source de carbone sur la production du biosurfactant de la souche NIJ. (source de carbone : 2%, v/v, $T_{incub} = 45^\circ\text{C}$, $t_{incub} = 48 \text{ h}$, 200 tr/min)

Source de carbone	TS (mN.m^{-1})	E_{24} (%)
Pétrole brut	30,2	82
Gasoil	36	40
Huile d'olive	32	52,32
Héxadécane	37	20
Glucose	39	33

D'après les résultats obtenus, l'augmentation de la biomasse bactérienne signifie une augmentation de la production du biosurfactant (changement de la couleur de milieu de culture) est accompagnée aussi par une augmentation de l'index d'émulsion ($>50\%$) et d'une diminution remarquable de la tension superficielle. Par exemple, avec le pétrole brut une concentration de 2% (v/v) a réduit la TS jusqu'à une valeur de 30.2 mN.m^{-1} et l' E_{24} jusqu'à une valeur de 82%. Par contre, la souche NIJ produit un biosurfactant donnant une émulsion plus stable sur l'huile d'olive ($E_{24} = 52.32\%$). Pour Hexadécane, gasoil et glucose donnant une émulsion moins stable (inférieur ou égal à 40 %) il peut y avoir des interférences avec des métabolites secondaires produits lors de la dégradation de ces sources de carbone.

L'étape de l'optimisation a prouvé qu'il y a des conditions spécifiques pour produire le maximum de biosurfactant. La souche NIJ (tableau 3.2) donne une meilleure production de biosurfactant en présence du pétrole brut. D'après ces résultats, nous avons sélectionné le pétrole brut comme source de carbone et d'énergie la plus adéquate pour la souche NIJ.

Les résultats concernant l'effet de la source de carbone montrent clairement que le pétrole a une bonne production de biosurfactant qui se traduit par une réduction intéressante de la tension superficielle (30.2 mN.m^{-1}) avec un index d'émulsification très élevé (82%) (tableau 3.2).

A l'instar de ces résultats, nous pouvons dire que selon les études antérieures sur la production de biosurfactants insistent sur l'importance du choix de la source de carbone, qu'il s'agisse d'hydrocarbures, de glucides, ou d'huiles : l'hexadécane (Ferhat *et al*, 2011 ; Abousaoud, 2008) [244,247], l'huile d'olive (Eddouaouda *et al*, 2012 ; Khelouia, L., 2022)[248,249].

L'optimisation de la concentration de la source de carbone est une étape primordiale pour augmenter la quantité de biosurfactant. Le tableau 3.3 donne les valeurs mesurées de la TS et E₂₄ au cours de la production.

Tableau 3.3: production du biosurfactants avec des différentes concentrations du pétrole brut.

Concentration de pétrole (%)	TS (mN.m^{-1})	E ₂₄ (%)
0,5	44,62	18
1	29	83
2	30	80
3	33,25	53
4	37	30

Selon les résultats du tableau 3.3, une concentration de 1% (v/v) de pétrole brut a réduit la TS jusqu'à une valeur de 29 mN.m^{-1} et l'E₂₄ jusqu'à une valeur de 83%. Donc, en présence du pétrole brut, le biosurfactant produit montré un pouvoir exceptionnel de réduction de la TS et de la E₂₄. En conclusion, nous pouvons dire

que la nature et la concentration de la source de carbone jouent un rôle crucial dans l'amélioration de la production de biosurfactant.

3.2.3.2. Effet de la nature et la concentration de la source d'azote

Les résultats de l'effet de la source d'azote sont représentés dans le (tableau 3.4).

Tableau 3.4: Effet de la nature de la source d'azote sur la production des biosurfactants par la souche NIJ

Sources d'azote	TS (mN.m ⁻¹)	E ₂₄ (%)
NaNO ₃	37,65	20
NH ₄ NO ₃	40,21	60
NH ₄ Cl	29 ,2	82,31
Urée	37,9	58
Arginine	52	50

Le tableau 3.4 montre que la meilleur source d'azote est le NH₄Cl (TS=29,2 mN.m⁻¹ et E₂₄= 82, 31%). Par contre, pour la source NaNO₃, la tension superficielle atteint 37.65 mN.m⁻¹ avec un indice d'émulsification plus faible (20%) (tableau 3.5). Pour NH₄NO₃, urée et l'arginine la souche NIJ produit un biosurfactant donnant une émulsion plus stable (50 à 60%) mais les valeurs de la TS sont moins importantes. Ceci indique que la souche NIJ préfère une source d'azote inorganique plus assimilable de type NH₄Cl en termes de production d'un biosurfactant à double intérêt (tension active et émulsifiant).

L'optimisation de la concentration de la source d'azote est une étape indispensable pour augmenter la quantité en biosurfactant. D'après les précédents résultats nous avons fixé le NH₄Cl comme une meilleure source d'azote. Les résultats sur l'influence des concentrations de cette dernière sur la production de biosurfactant sont présentés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.5:Influence de la concentration de la source d'azote sur la production de biosurfactants par la souche NIJ.

Concentration de la Source d'azote (%)	TS (mN.m ⁻¹)	E ₂₄ (%)
2	46	20
3	36,5	45
4	29	82
5	40	15
6	41	20

D'après les résultats obtenus, une concentration de 4% (g/L) de NH₄Cl a réduit la TS jusqu'à une valeur de 29mN.m⁻¹ et l'E₂₄ jusqu'à une valeur de 82%.

3.2.3.3. Etude la cinétique de la production

Une étude cinétique préalable a été réalisée afin de déterminer le temps nécessaire pour l'obtention d'une bonne production de biosurfactant en fixant le pétrole brute (1%) comme source de carbone et NH₄Cl (4%) comme source d'azote. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.7.

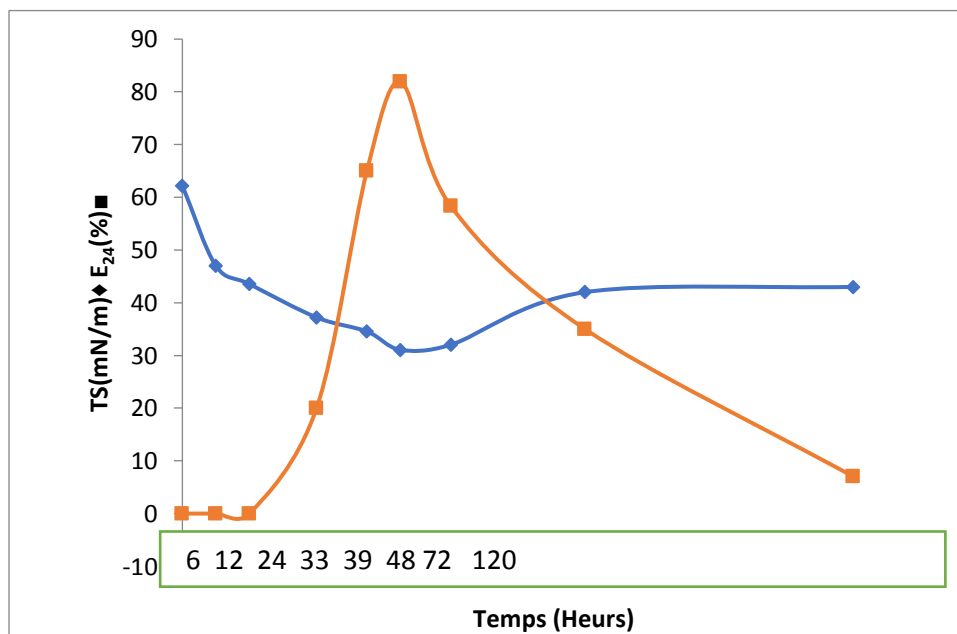


Figure 3.7: Cinétique de production de biosurfactant par la souche NIJ.

La production du biosurfactant commence dès les premières heures d'incubation, ce qui signifie que la phase de la latente de croissance est courte grâce à la préculture qui donne un inoculum initial adapté et plus important vis-à-vis les conditions optimales de fermentation qui favorisent la production de ce genre de biomolécule.

La production du biosurfactant atteint son maximum au bout de 39h (29.03mN/m) à 48h (30.1 mN/m) de fermentation comme le montre la figure 3.7. Après 48h, on obtient des émulsions stables avec $E_{24}=58\%$, la tension superficielle augmente et la production du biosurfactant commence à diminuer. Cela peut être dû à la production d'autres métabolites affectant l'activité du biosurfactant

Le suivi de pH montre une stabilité durant 120h d'incubation.

Le calcul du rendement de production de notre biosurfactant a donné une quantité de 1.65 g/L. Ce rendement est faible.

3.2.4. Caractérisation debiosurfactant (BS NIJ)

3.2.4.1. Caractérisation structurale

Les pics détectés par le spectrophotomètre infrarouge de transformée de Fourier sont résumés dans le tableau 3.6 et sur la figure 3.8.

Tableau 3.6:Groupements caractéristiques du biosurfactant.

Nombre d'onde	Groupe ment
3220	O-H
2920	-CH ₂ - ou -CH ₃ (alcane)
1685	N-H (Nitroalcane)
1100	C-O
873	C-H (C=C)

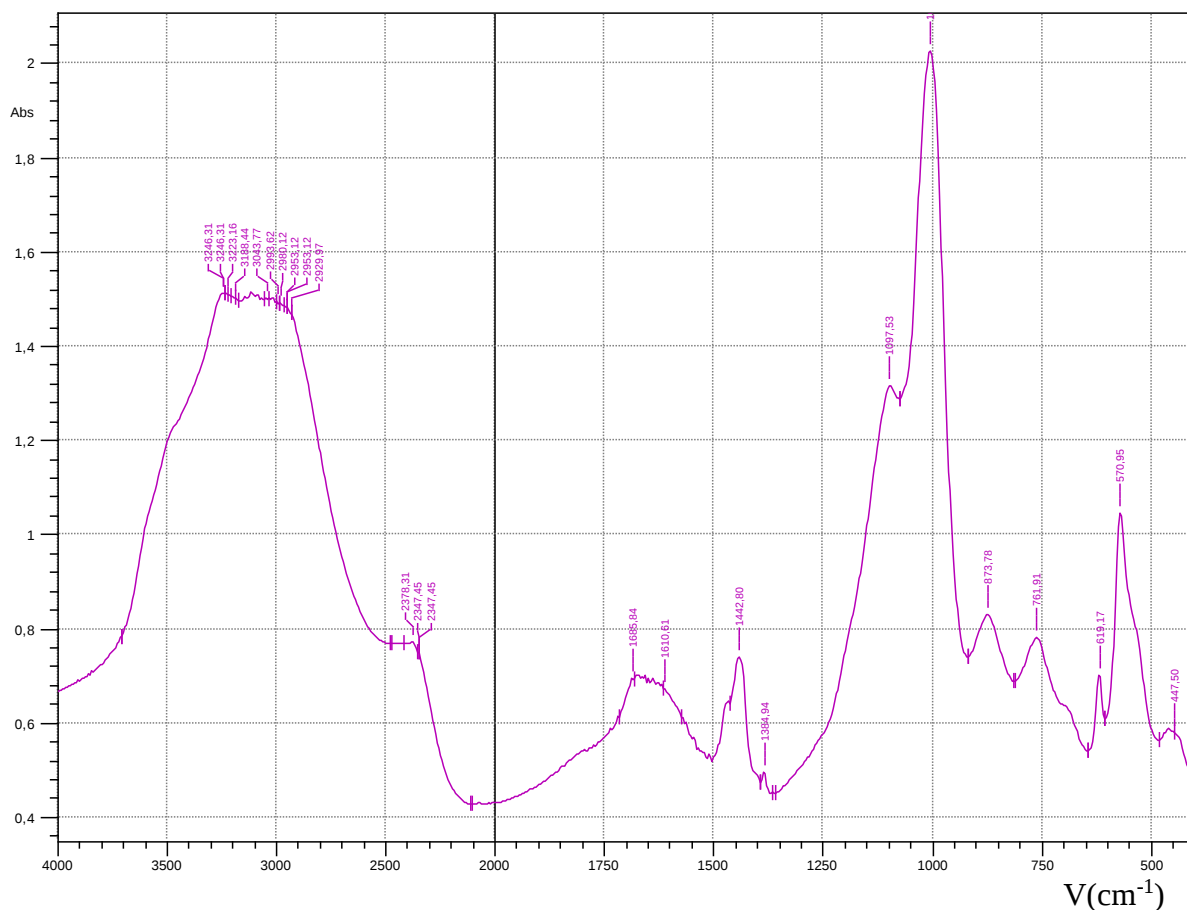


Figure 3.8: Spectre infrarouge du biosurfactant produit par la souche NIJ.

Les résultats obtenus montrent que :

- Les bandes situées à **3246.31, 3246, 3220 cm^{-1}** correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons O-H avec pont hydrogène.
- Les bandes situées à **2920 et 3043 cm^{-1}** sont attribuées aux vibrations d'élongation des liaisons des groupements (-CH₃-) ou (-CH₂-) d'alcane sachant que toutes les classes de biosurfactant en contiennent.
- Les deux pics situés à **1685 et 1610,14 cm^{-1}** résultent de vibrations de déformation des liaisons C-H dans les alcanes et Nitroalcane.
- Le pic d'élongation situé à **1010 cm^{-1}** est affecté aux liaisons de C-O dans les alcools.
- Les deux bandes **1097,23 et 10104,83 cm^{-1}** sont probablement dus aux vibrations déformation des liaisons C-O dans les alcools secondaires C-O-C dans les éthers.

- Le pic situé à 873 cm^{-1} correspond aux vibrations de déformation des liaisons C-H dans les alcènes (C=C).

D'après ces interprétations selon ces analyses préliminaires, le BSNIJ est probablement de nature glycolipides par rapport la présence degroupements hydroxyles et absence de liaisons peptidiques.Cependant, d'autres types d'analyses sont nécessaires pour une identification plus détaillée, telles que les analyses biochimique (identification des lipides, glucides et protéines) et LC-MS (détermination de la masse moléculaire du produit et des masses des fragments (ions)).

3.2.4.2.Caractérisation physico-chimique

➤ Stabilité thermique

Lafigure 3.9illustre les résultats obtenus de la TS après un traitement thermique à différentes températures :

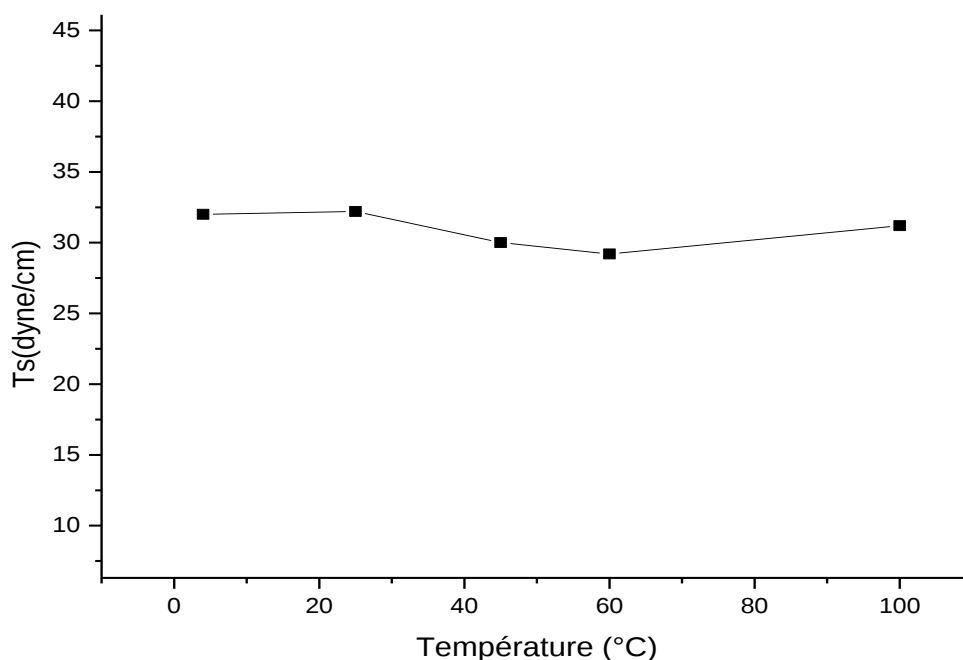


Figure 3.9 :Effet de température sur la stabilité de biosurfactant produit par la souche NIJ

Selon les résultats présentés dans la figure 20, nous avons observé que le biosurfactant présente une excellente stabilité dans la gamme de température variant de 4 à 100 °C. Dans cette gamme, la TS reste presque constante (aux

alentours de 30dyne/cm). Donc, on peut dire que ce biosurfactant maintient ses propriétés tensioactives dans la gamme de température de 4 à 100 °C.

Les résultats obtenus par Brown et al. [250] indiquent que l'exposition de biosurfactant, produit par une souche bactérienne (désignée par isolat 1165), à des températures extrêmes [0, 4, 100 et 120 °C] n'affecte pas la stabilité thermique de biosurfactant. D'autre part, Makkar et Cameotra [251] ont observé que la tension de surface conserve sa stabilité après l'exposition de biosurfactant produit par la souche *Bacillus subtilis* à une température de 100 °C.

➤ Stabilité chimique :

- Effet du pH

La figure 3.10 illustre les résultats des mesures de TS obtenus lors de la variation du pH du surnageant de culture contenant le BSNIJ.

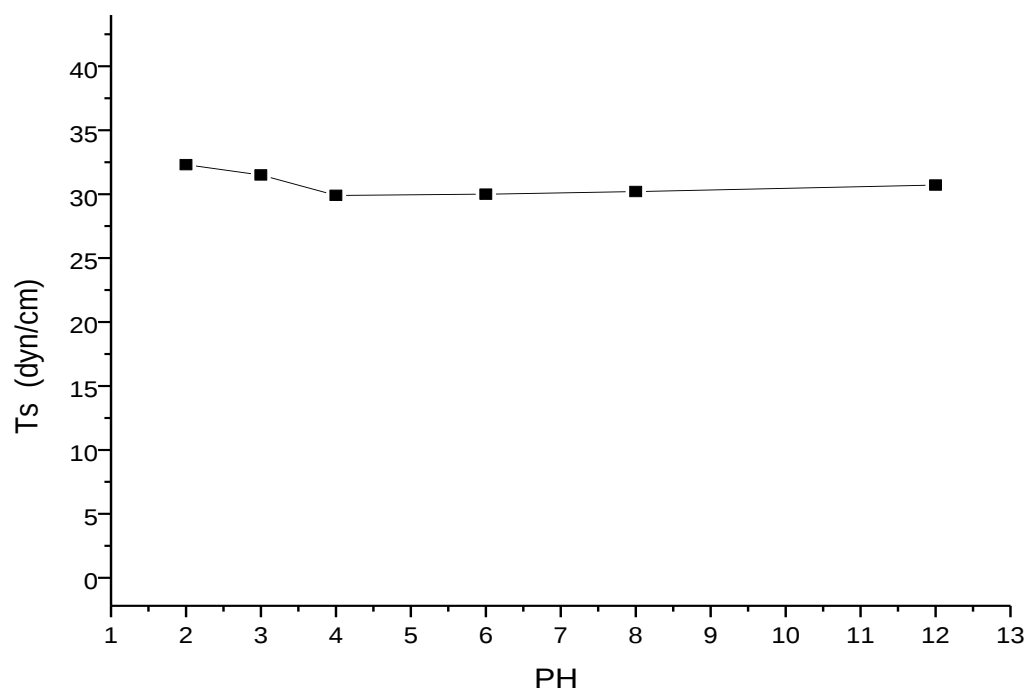


Figure 3.10 : Influence du pH sur la stabilité du biosurfactant produit par la souche NIJ

Selon les résultats obtenus (figure 3.10), notre biosurfactant montre une grande stabilité aux changements de pH de 2 à 12. A titre d'exemple les valeurs de la tension de surfaces aux pH : 3, 6 et 12, sont 31,5 ; 30 et 30,7 dyne/cm,

respectivement. Ces résultats montrent l'intérêt de son application dans des milieux acido-basiques.

En variant le pH de 2 à 12, le biosurfactant produit par la souche *Staphylococcus haemolyticus* 1Egarde son activité tensioactive (30 – 31,5 dyne/cm) [248].

- Effet de la salinité :

Pour tester la stabilité du biosurfactant produit par la souche NIJ dans les milieux salés, différentes quantités de NaCl ont été ajoutées au surnageant pour avoir différentes concentrations. Le tableau 3.7 illustre les résultats obtenus.

Tableau 3.7: Effet de la salinité sur l'efficacité du biosurfactant produit par la souche NIJ

Concentration en NaCl (g/l)	TS (dyne/cm)
5	32
15	31,5
50	31
80	29,9
100	30

D'après les mesures prises de la tension superficielle TS, on remarque une stabilité avec une légère variation pour le TS. Le biosurfactant est in affecté par la concentration élevée en sel. Des résultats semblables sur la stabilité de biosurfactant produit par la souche NIJ, ont été obtenus par d'autres auteurs [249].

Ces résultats montrent l'avantage de l'utilisation des tensioactifs biologiques par rapport aux leurs homologues chimiques.

- Détermination de la concentration micellaire critique (CMC) :

La tension de surface diminue avec des dilutions successives de biosurfactant, atteignant une valeur minimale à proximité de 29,56 mN/m pour une concentration du biosurfactant

supérieure ou égale à 2,5 mg/ml. Cette valeur définit la CMC pour le biosurfactant (Figure 3.11)

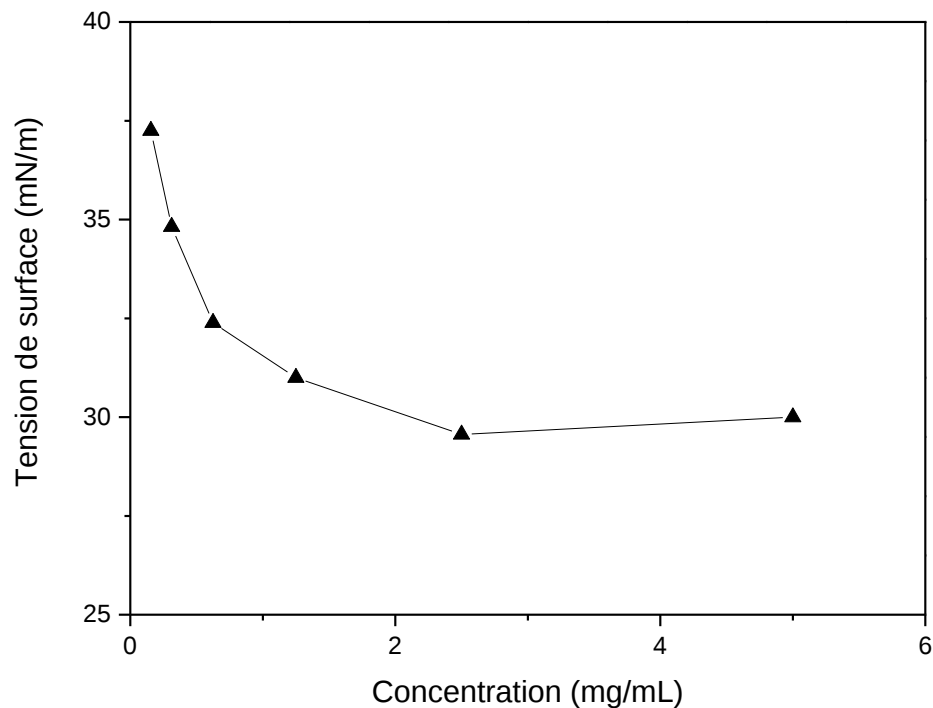


Figure 3.11 : La CMC du biosurfactant produit par la souche NIJ.

3. 3. Production d'enzyme « protéase »

3.3.1. Criblage des souches bactériennes sécrétrices de protéases

Au total, six d'isolats ont été criblés ayant l'origine un sol sableux contaminé par le pétrole brut prélevé de la région de Hassi Messaoud (Ouargla, sud d'Algérie), après plusieurs sous-cultures sur milieu à base de pétrole ces souches hydrocarbonoclastes thermotolérantes codées : 2C, K2C, 7A, 7H, K2N et NIJ ont été sélectionnés comme producteurs de protéases sur la base des rapports du diamètre de la zone claire (sur lait écrémé géloses) et celle de la colonie (> 4 mm) qui a servi d'indicateur pour la sélection des souches avec une capacité de production de protéase extracellulaire élevée. Parmi les six souches, NIJ présentait le plus haut rapport de 5,5 mm (figure 3.12).



Figure 3.12: Mise en évidence de l'activité protéolytique produite par la souche bactérienne NIJ sur gélose nutritive au lait.

En vue d'évaluer le niveau de production de protéase par la souche retenue et de vérifier sa capacité d'hydrolyser les protéines en milieu liquide. La souche NIJ a un pouvoir protéolytique élevé (5000 U/mL) dans un milieu liquide initial à base de caséine (BILM), ceci a permis de sélectionner cette souche pour la poursuite de nos travaux de thèse.

D'une manière générale, le niveau de la production des protéases par les souches protéolytiques peut être ajusté par la composition chimique des milieux de culture. Ainsi, cette production est fortement influencée par les composés du milieu. Plusieurs facteurs physiques tels que l'aération, la densité de l'inoculum, le pH, la température et le temps d'incubation affectent d'une manière considérable la production des protéases. En vue d'évaluer le niveau de production de protéase par la souche retenue et de vérifier sa capacité d'hydrolyser les protéines en milieu liquide, nous avons réalisé des cultures sur milieu initial à base de (10 g/L) de substrat carboné et (5 g/L) de source azotée à pH initial de 7,4. Le choix d'un tel pH découle du fait qu'on vise la recherche d'une souche productrice des protéases alcalines pouvant être éventuellement orientées vers une application en détergence.

3.3.2. Optimisation de la production de protéases par la souche NIJ

La production des protéases par les souches protéolytiques est influencée d'une part, par les conditions physiques à savoir la température, le pH et l'aération et d'autre part, par la composition chimique des milieux de culture [252, 236]. En fait, un milieu de culture doit contenir une source de carbone, une source d'azote et des sels minéraux exigés pour la croissance et pour l'induction de l'enzyme [253].

3.3.2.1. Effet de différentes sources de carbone sur la production de protéase

Afin d'obtenir une production maximale de protéase, il est également important de fournir aux microorganismes une source de carbone adéquate. La production de protéase par la souche NIJ a été testée sur le milieu de base additionné de différentes sources de carbone : Caséine, gélatine, glucose, fructose, galactose, saccharose et maltose à raison de 5 g/L. Le niveau de production de protéases, de la croissance de la souche NIJ ainsi que le pH final de la culture ont été déterminés et l'ensemble des résultats sont consignés dans le tableau 3.8.

Tableau 3.8: Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de protéase par la souche NIJ

Source de c (5 g/L)	Témoin sans addition	Caséine	Glucose	Galactose	Gélatine	Fructose	Maltose	Saccharose
Activité protéase (U/mL)	323	5000	590	2150	3000	559	958	510
Absorbance (600 nm)	3,22	7,11	4,23	7,14	7,05	6,03	5,88	6.02

L'analyse des résultats présentés sur ce tableau, met en évidence une bonne croissance de la souche NIJ sur les différents substrats carbonés testés. En effet, une meilleure production (environ 5000 U/ml) et une croissance significative (absorbance à 600 nm de 7,11) sont observées sur milieu à base de caséine. Par conséquent, la caséine représente la source de carbone la plus adéquate pour la production de protéase et la croissance de NIJ. Cette affinité vis-à-vis de la caséine peut être expliquée par l'existence de substances bioactives (polypeptides et acides aminés) et catalytiques issues de la protéolyse de la caséine qui favorisent la production de protéases par la souche NIJ.

3.3.2.2. Effet de la concentration de la caséine sur la production de protéase

Etant donné, que la meilleure production est obtenue sur le milieu initial additionné de caséine, nous étions amenés à optimiser la concentration en caséine (de 0 à 20 g/L) afin de déterminer la concentration optimale pour la production de protéase.

Les résultats sont donnés en tableau 3.9.

Tableau 3.9: Optimisation de la concentration de la caséine pour la croissance et la production de protéase par la souche NIJ.

Concentration de la caséine (g/L)	0	5	10	15	20
Activité protéase (U/mL)	416	5000	12500	8951	4660
Absorbance à 600 nm	3,61	7,11	7,95	8,05	7,72
pH final	6,26	6,42	6,64	6,21	6,4
Rendement (10^3 U protéase/g de la caséine ajoutée)	0	1000	1250	567	233

Les résultats présentés sur ce tableau montrent que la croissance bactérienne et la production de protéases par la souche NIJ augmentent presque d'une manière fonctionnelle avec la concentration en caséine. En effet, l'augmentation de la production est significative pour des concentrations supérieures à 5 g/L et atteint un maximum de 12500 U/mL à 10 g/L. Au-delà de 15 g/L, on observe une diminution de la production contrairement à la croissance qui continue d'augmenter même à 20 g/L.

En tenant compte du rendement ainsi que du niveau de la production de protéase par la souche NIJ, une concentration en caséine de 10 g/L a été retenue pour la suite de notre travail.

3.3.2.3. Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéase

Chez les microorganismes, l'azote organique ou inorganique est métabolisé pour produire essentiellement des acides aminés, des acides nucléiques, des protéines et certaines composantes des parois cellulaires. La production de protéases alcalines dépend considérablement de la disponibilité de la source de carbone et d'azote dans le milieu de culture. Les deux sources ont un effet régulateur sur la synthèse d'enzymes [254, 255].

L'effet de différentes sources d'azote (Extrait de boeuf, extrait de levure, peptone de levure, peptone de soja ; sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; chlorure d'ammonium (NH_4Cl) et nitrate de sodium (NaNO_3) sur la croissance et la production de la protéase par la souche NIJ a été étudié, à raison de 2 g/L. Les résultats obtenus ont été comparés à une culture témoin 0 g/L de source d'azote.

Les résultats sont donnés en tableau 3.10.

Tableau 3.10: Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéases par la souche NIJ.

Source d'azote (2 g/L)	Témoin sans addition	Extrait de bœuf	Extrait de levure	Peptone de soja	Peptone de viande	NH ₄ Cl	NaNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄
Activité protéase (U/ml)	750	13225	15500	3366	8055	895	1257	10528
Absorbance à 600 nm	4,52	7,99	8,15	5,56	6,65	5,01	5,22	7,02

L'analyse des résultats présentés sur le tableau 3.12 montre que l'extrait de levure était la meilleure source d'azote organique (15500 U/mL) suivi de l'extrait de bœuf (13225 U/mL). Comme source d'azote inorganique (NH₄)₂SO₄ (10528 U/mL) était le meilleur par rapport aux autres. Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux ayant montré que les sources d'azote organique sont meilleures pour la production d'enzymes par les bactéries du genre *Bacillus* [256, 257].

3.3.2.4. Effet de la concentration de l'extrait de levure sur la production de protéase

La concentration de l'extrait de levure comme meilleure source d'azote a été optimisée sur le milieu initial à des concentrations allant de 0 à 10 g/L (tableau 3.11).

Tableau 3.11: Optimisation de la concentration de l'extrait de levure sur la croissance bactérienne et sur la production de protéases par la souche NIJ.

Concentration d'extrait de levure(g/L)	0	2	4	6	8	10
Activité protéase (U/mL)	765	15550	18752	14124	10336	7950
Absorbance à 600 nm	4,95	8,15	8,35	8,22	8,01	7,78
Rendement (10 ³ U protéase/g de peptone de soja ajouté)	0	7750	4688	2354	1292	795

L'analyse des résultats montre qu'il y a une meilleure production de protéases qui atteint 18752 U/mL pour une concentration de 4 g/L d'extrait de levure. Ces résultats montrent également une augmentation de la biomasse (DO à 600 nm = 8,35) avec la concentration en extrait de levure jusqu'à 4 g/L.

À la lumière de cette optimisation à pH 7,4 un nouveau milieu de composition (en g/L) est proposé : 10 Caséine ; 4 extrait de levure ; 1 $CaCl_2$; 1,5 K_2HPO_4 ; et 1,5 KH_2PO_4 ; l'ajout d'oligo-éléments à 1% (v/v) et 1% (v/v) de pétrole significativement amélioré la production de protéases.

3.3.3. Cinétique de croissance et de production de protéase par la souche NIJ

Le suivi de la production de protéase et de la croissance bactérienne de la souche NIJ en fonction du temps, montre que la sécrétion de protéase commence après une phase de latence de 4 h et dès le début de la phase de croissance exponentielle. Elle évolue par la suite de façon concomitante avec la croissance bactérienne et atteint son maximum d'activité (31000 U/mL) après 46 h de culture avec une DO à 600 nm d'environ 8,75. Ainsi, le maximum de croissance coïncide avec le maximum d'activité enzymatique. Au-delà de cette période, la production commence à diminuer légèrement (figure 3.13). Cette diminution est probablement due soit à une instabilité de l'enzyme, soit à une auto-dégradation ou à l'action protéolytique d'autres protéases libérées lors de la lyse cellulaire et/ou la sporulation. Le phénomène d'instabilité de l'activité protéolytique lors de la fermentation a été également décrit chez d'autres souches comme *Bacillus subtilis* ATCC 14416[254] et *Erwinia chrysanthemi*[258].

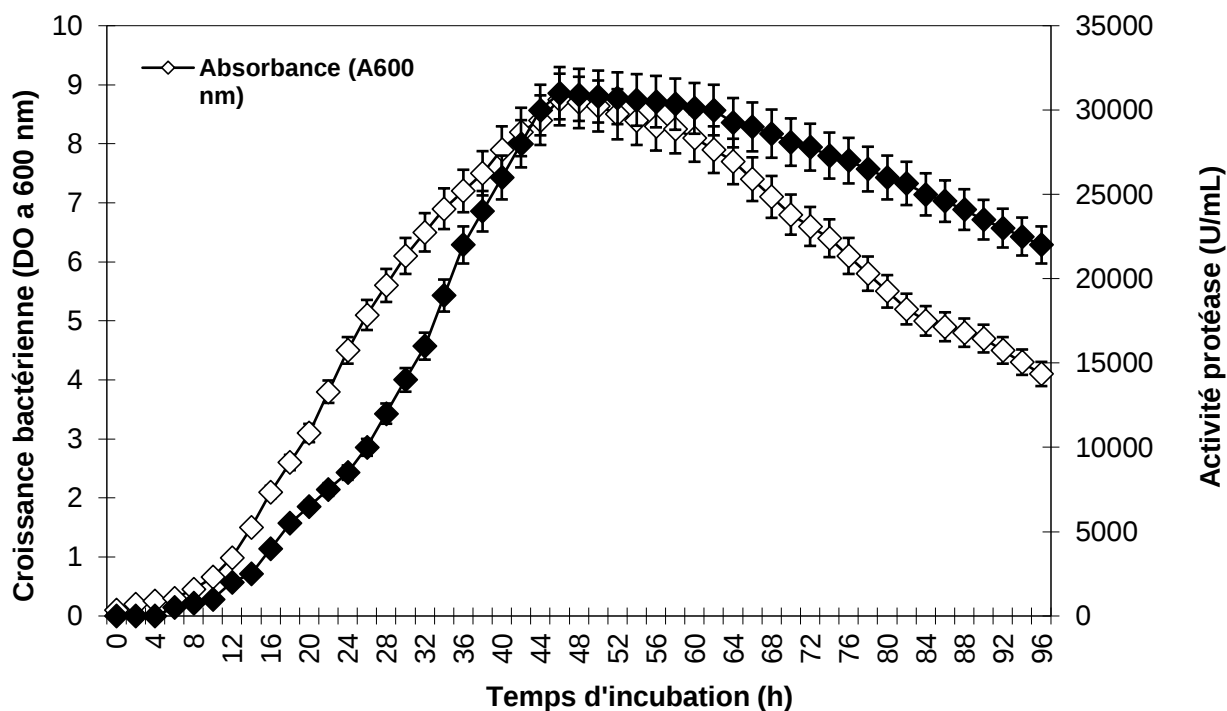


Figure 3.13: Cinétique de production de protéase et de croissance bactérienne de la souche NIJ.

L'ensemble de résultats obtenus montre clairement que la souche sélectionnée se développe très bien dans le milieu de culture optimisé. Toutefois, elle présente des niveaux de production de protéase variable avec de maximum d'activité attrapant après 46 h pour la souche NIJ. La différence des niveaux de production de protéase sur milieu liquide dépendrait de plusieurs paramètres tels que : les exigences nutritionnelles des souches (la composition du milieu, les concentrations des substrats) et les conditions de l'environnement (vitesse d'agitation, température, aération, temps d'incubation) [259]. On note que la production de l'enzyme évolue avec la croissance, les protéases sont secrétées dès le début de la croissance du microorganisme. La production continue jusqu'à la fin de la phase exponentielle et même pendant la phase stationnaire. Des résultats similaires ont été obtenus pour *B. cereus* MCM B-326 [260] et *B. cereus* BG1 [261].

En outre, nous remarquons que la souche NIJ s'adapte rapidement au milieu avec une phase de latence très courte, suivie d'une phase d'accélération pour atteindre la vitesse maximale. Au-delà de la période de croissance exponentielle la production commence à diminuer légèrement. Cette diminution est probablement due aux plusieurs phénomènes :

- Epuisement des éléments nutritifs dans le milieu de culture.

- Une dégradation par les enzymes endogènes libérés suite à la lyse cellulaire (les cathepsines).
- Inhibition par excès de surproduction d'enzymes.
- Instabilité de l'enzyme.

3.3.4. Purification de la protéase « nommée SAPNIJ » produite par la souche de *Bacillus* sp. NIJ

3.3.4.1. Extrait brut

Le surnageant de culture de 500 ml de la souche NIJ après 46 h sur le milieu optimisé constitue l'extrait enzymatique brut. Ce surnageant éyypresente une activité protéolytique de **31000 U/ml** et une activité spécifique de 6250 U/mg. Le protocole expérimental de purification de cette protéase comporte trois étapes : une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (40-70%), suivie d'untraitement thermique à 90°C pendant 30 min et une chromatographie sur gel filtration utilisant le système HPLC.

3.3.4.2. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium 40-70%

La précipitation est une technique sélective utilisée pour purifier partiellement et concentrer les protéines solubles dans un surnageant. Le sulfate d'ammonium à forte concentration entre en compétition avec les protéines pour réagir avec les molécules d'eau. Ceci entraîne une désolvatation suivie d'uneprécipitation. La précipitation fractionnée des protéines de l'extrait brut a été réalisée de la manière suivante : on ajoute au surnageant, en faible quantité sous une agitation douce et à froid, de sulfate d'ammonium solide jusqu'à40% de saturation (121 g). On laisse sous agitation pendant 2 h puis on centrifuge à 4500 rpm pendant 20 min. le surnageant recueilli est additionné de sulfate d'ammonium solide jusqu'à70% de saturation (101 g). Après 2 h d'agitation, on centrifuge à 4500 rpm pendant 20 min. le culot est repris immédiatement le minimum de tampon Tris-HCl 50 mM, additionné avec 2 mM de CaCl₂ et 20 mM NaCl à pH 7.5 (Tampon A)

3.3.4.3. Traitement thermique

Le surnageant obtenu subi un traitement thermique à 70°C pendant 20 min, puis centrifugés pendant 20 min à 4500 rpm. Cette opération a pour but de précipiter une part

importante de protéines du surnageant par dénaturation thermique. Le surnageant récupéré contient l'activité protéolytique.

3.3.4.4. Chromatographie d'exclusion diffusion sur Shodex HPLC

Le pool de fractions obtenue lors de l'étape précédente a été déposées sur une colonne de filtration sur gel Zorbax PSM 300 (26,2 mm × 250 mm) (Bio-Rad) préalablement équilibrée avec le tampon A en utilisant le système HPLC. L'élution des protéines est effectuée avec le même tampon avec un débit de 30 ml/h. Des fractions de 5 ml sont collectées et analysées par mesure de l'absorbance à 280 nm et de l'activité protéolytique sur la caséine.

La chromatographie liquide de haute performance (HPLC) (est largement utilisée comme technique analytique et préparative.

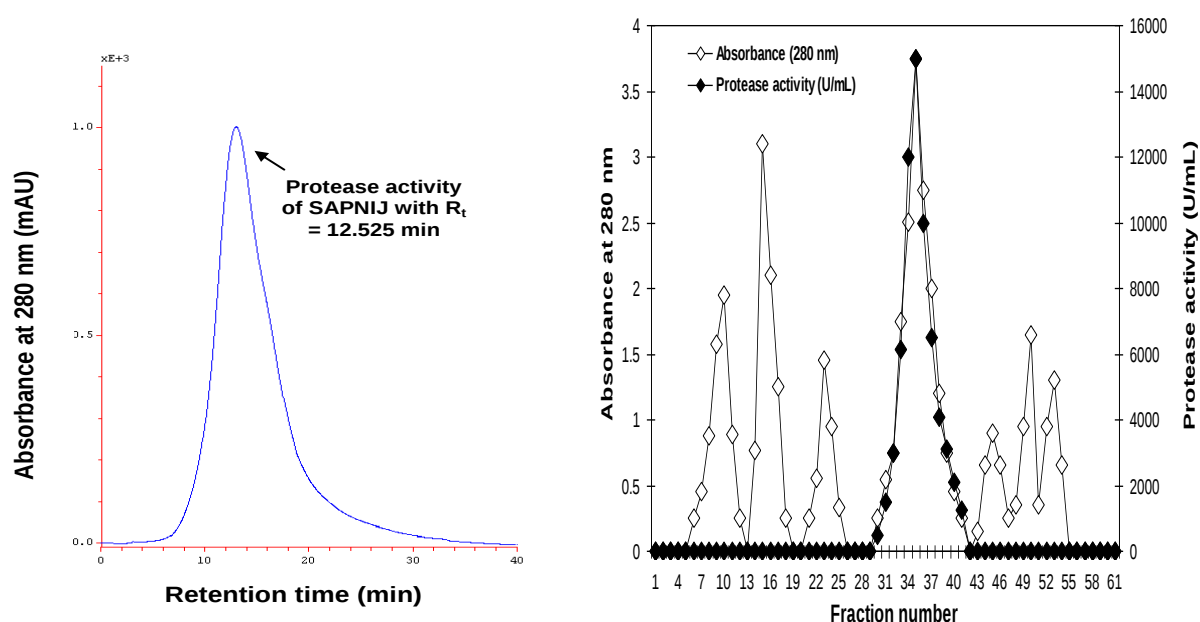


Figure 3.14 : Profil d'élution de la fraction active

(Temps de rétention = 12.525 min) après sortie d'une chromatographie sur une colonne Biorad de la collecte du pic 1 issue de la FPLC et concentrée sur la membrane amicon à 10 kDa. La colonne Zorbax PSM 300 (26,2 mm × 250 mm) est pré-équilibrée par le tampon B.

Le débit d'élution est de 1 ml/min et la détection des protéines se fait à 280 nm.

3.3.4.5. Bilan de la purification

Le bilan de purification de la SAPNIJ produite par la souche NIJ de *Bacillus atrophaeus*NIJ est représenté dans le tableau 3.12.

Tableau 3.12:Bilan de la purification à homogénéité de la protéase SAPNIJ

Etape de purification	Activité totale (U)× 10³	Quantité de protéines(mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification (fois)
Extrait cellulaire	15500 ± 95	6250 ± 55	2480	100	1
Précipitation fractionnée au (NH₄)₂SO₄ (40-70 %) avec dialyse	12865 ± 71	783 ± 37	16430	83	6,6
Traitement thermique (90 °C pendant 30 min)	7905 ± 64	125 ± 26	63240	51	25,5
HPLC (ZORBAX PSM 300)	3875± 25	45 ± 2	86111	25	34,7

D'après ces résultats, la protéase SAPNIJ de la souche NIJ de *Bacillus atrophaeus*, a été purifiée à homogénéité à partir du surnageant de culture en quatre étapes, avec un degré de pureté d'environ 34,7 fois.

L'activité spécifique obtenue (86111 U/mg) est plus importante que les activités des protéases récemment décrites par Jaouadi et *al.* [262], Zaraï-Jaouadi et *al.* [236], Ben Elhouli et *al.* [263] et Mechri et *al.* [264] qui présentaient des valeurs respectives de 21500 U/mg (SAPB), 45500 U/mg (SAPB-L31I/T33S/N99Y), 43750 U/mg (STAP) et 41250 U/mg (SPVP).

3.3.4.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Dans le même contexte de la purification de l'enzyme, nous nous sommes intéressés à déterminer la taille de la SAPNIJ ainsi que son activité sur gel (zymogramme). Les résultats de l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12% dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ainsi que ceux du zymogramme sont représentés dans la figure 3.15.

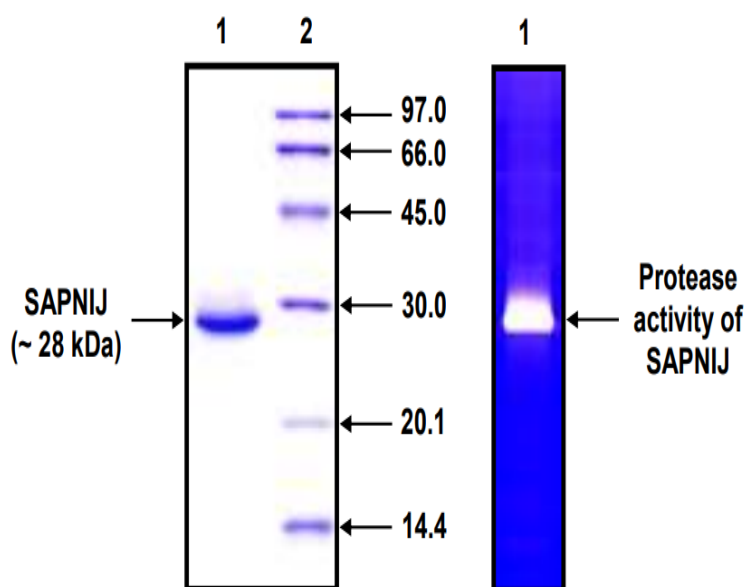


Figure 3.15 : Estimation de la taille de la protéase SAPNIJ sur SDS-PAGE à 12 %

. Piste 1: SAPNIJ (50 µg). Piste 2 à gauche: Marqueurs de taille. Piste 1 à droite : le profil du zymogramme sur caséine de la fraction pure 28 kDa.

Le profil électrophorétique montre que la protéase SAPNIJ se présente sous forme d'une seule bande pure et homogène de masse moléculaire apparente de 28 kDa. Ceci confirme que notre protéase est de structure monomérique active sur la caséine comme celles trouvées chez d'autres protéases de *Bacillus* [156,236,264].

Ces résultats montrent que l'enzyme SAPNIJ se présente sous forme d'un seul monomère, comme toutes les protéases déjà décrites, tout particulièrement celles provenant du genre *Bacillus* [265, 262].

Kumar et *al.* avaient rapporté que les masses moléculaires des protéases alcalines sont généralement comprises entre 15 et 30 kDa [184]. Depuis, d'autres protéases sont décrites avec des masses moléculaires plus importantes [266].

3.3.4.7. Séquençage de l'extrémité NH2-terminale de la SAPNIJ

Le séquençage de l'extrémité NH2-terminale de l'enzyme SAPNIJ fait apparaître 27 acides aminés dont la séquence est la suivante:

AQSVPYGISQIKGPAVHSQGYTGSDVKAQTVPYGIPLIKADKVQAQGFRGANV.

D'après l'alignement de cette séquence avec celles d'autres protéases microbiennes présentés dans le tableau 3.13, on remarque que les parties **AQTV** et **GIPLIKA** sont conservées dans toutes les séquences.

La protéase SAPNIJ se rapproche de la Subtilisine E produite par *Bacillus subtilis* 168 et la Subtilisin BM1 de *Bacillus mojavensis* A21 avec des pourcentages d'homologie de 90.48% et 88.89%, respectivement.

Tableau 3.13: Alignement de la séquence NH2-terminale de la protéase SAPNIJ avec celles d'autres protéases.

Enzyme	Origine	Séquence NH2-terminale amino acide ^a	Identité (%) ^b
SAPNIJ	<i>Bacillus atrophaeus</i> NIJ	AQSVPYGISQIKGPAVHSQGYTGSDVK	100.0
Subtilisin E	<i>Bacillus subtilis</i> 168	AQSVPYGISQIKAPALHSQGY	90.48
Subtilisin BM1	<i>Bacillus mojavensis</i> A21	AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVK	88.89
Subtilisin Novo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23844 ^T	AQSVPYGVTSQIKAPALHSQGY	85.71
SAPB	<i>Bacillus pumilus</i> CBS	AQTVPYGIPIQIKAPAVHAQGY	80.95
BPP-A	<i>Bacillus pumilus</i> MS-1	AQTVPYGIPIQIKAPAVHAQGY	80.95
DHAP	<i>Bacillus pumilus</i> UN-31-C-42	AQTVPYGIPIQIKAPAVHAQGY	80.95
APRMP1	<i>Bacillus licheniformis</i> MP1	AQTVPYGIPLIKAD	75.00
SAPRH	<i>Bacillus safensis</i> RH12	AQTVPYGIPIQIKAPAIHAEGYKGG	69.57
SAPDZ	<i>Bacillus circulans</i> DZ100	AQTVPYGMMAQIKDPAVHGQGYKGAN	68.00
SAPLF	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> C250R	VPSPGPYGPIDIKADKVIEDGFKMDEYF	63.64
Subtilisin Carlsberg	<i>Bacillus licheniformis</i> NCIB 6816 ^T	AQTVPYGIPLIKADKVQAQGF	56.52

SAPHM	<i>Bacillus licheniformis</i> K7A	AQITVPQGIPLIKAEKVQAQGFDGARV	52.17
SPVP	<i>Aeribacillus pallidus</i> VP3	APSGPYGPQGIIKADKVHAAQGFKGAN	50.00

3.3.5. Caractérisation biochimique des préparations enzymatiques

L'utilisation des protéases qui catalysent les réactions dans des conditions extrêmes présente une grande importance dans plusieurs applications industrielles [267, 268]. Ainsi, nous avons déterminé la température et pH optimum d'action des différentes préparations enzymatiques. De plus, nous avons étudié la stabilité thermique et l'effet des ions métalliques et les inhibiteurs sur la stabilité de l'enzyme SAPNIJ pure. Nous avons également étudié l'effet de polyols et l'effet de calcium sur la stabilité protéolytique de notre enzyme.

3.3.5.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de l'enzyme

L'activité de l'enzyme purifiée a été testée à différentes valeurs de pH (du 2 à 13). Les activités relatives comparées à l'activité optimale obtenue à pH 11, sont portées sur la figure 3.16. Les résultats présentés ci-dessous montrent que la protéase SAPNIJ est active dans une large gamme de pH entre 7 et 12 et que l'optimum d'activité est obtenu à pH 11. En effet, les activités relatives à pH 7 et 11 sont respectivement de 80 et 75%. Pour des pH supérieurs à 11, l'activité enzymatique décroît considérablement.

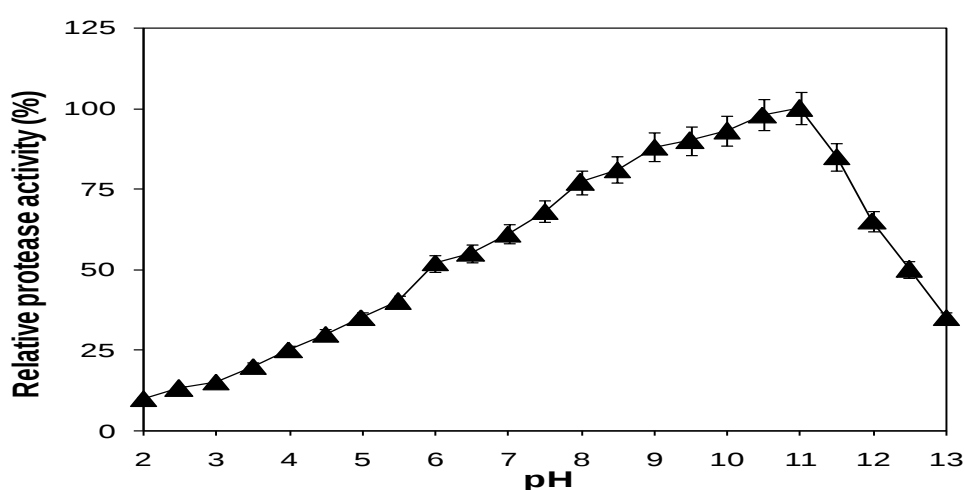


Figure 3.16: Effet du pH sur l'activité de l'enzyme SAPNIJ.

La stabilité de la protéase SAPNIJ a été étudiée en pré-incubant l'enzyme à des pH allant de 7 à 12 à 60 °C pendant 10h. L'ensemble des résultats est porté sur la figure 3.17. Nous notons que la protéase SAPNIJ semble être pratiquement stable à des pH allons de 8 à 11 puisqu'elle montre des activités résiduelles de l'ordre de 100%.

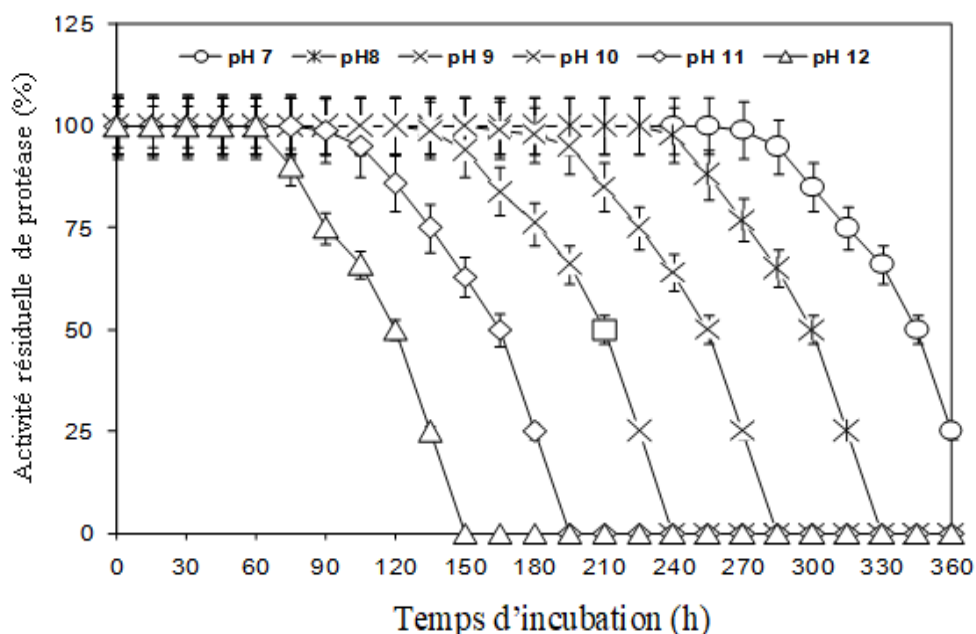


Figure 3.17: Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme SAPNIJ

L'enzyme était constamment active dans un large plage de pH (2-13) avec une activité maximale à pH 11 (Figure 3.12), en tenant compte de la relative activités 52% (pH 6) et 50% (pH 12,5), le pH intervalle de stabilité (7-12) (Figure 3.18) et la demi-vie fois à pH 7, 8, 9, 10, 11 et 12 étaient de 345, 300, 255, 210, 165 et 120 min, respectivement. SAPNIJ a été noté pour être plus efficace à pH alcalin en comparaison avec l'activité maximale des grands enzymes détergents commerciales, y compris Alcalase™ de *Bacillus licheniformis* (8 et 9) [269] et la Savinase, produite par *Bacillus lentus* (8 à 10) [269] et les enzymes microbiennes alcalines étudiés, 9 et 12 pour SAPRH [230] et SAPDZ [156], respectivement. Cela a confirmé les promesses potentiel de la SAPNIJ pour les futurs industriels application, qui nécessite une stabilité enzymatique dans large gamme de pH (9-11), notamment en détergence [270].

3.3.5.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme

Le dosage de l'activité protéolytique a été effectué à des températures allant de 40 à 100°C et les activités relatives ont été déterminées en absence et en présence de calcium à une concentration de (2 mM). Les résultats obtenus sont mentionnés sur la figure 3.18

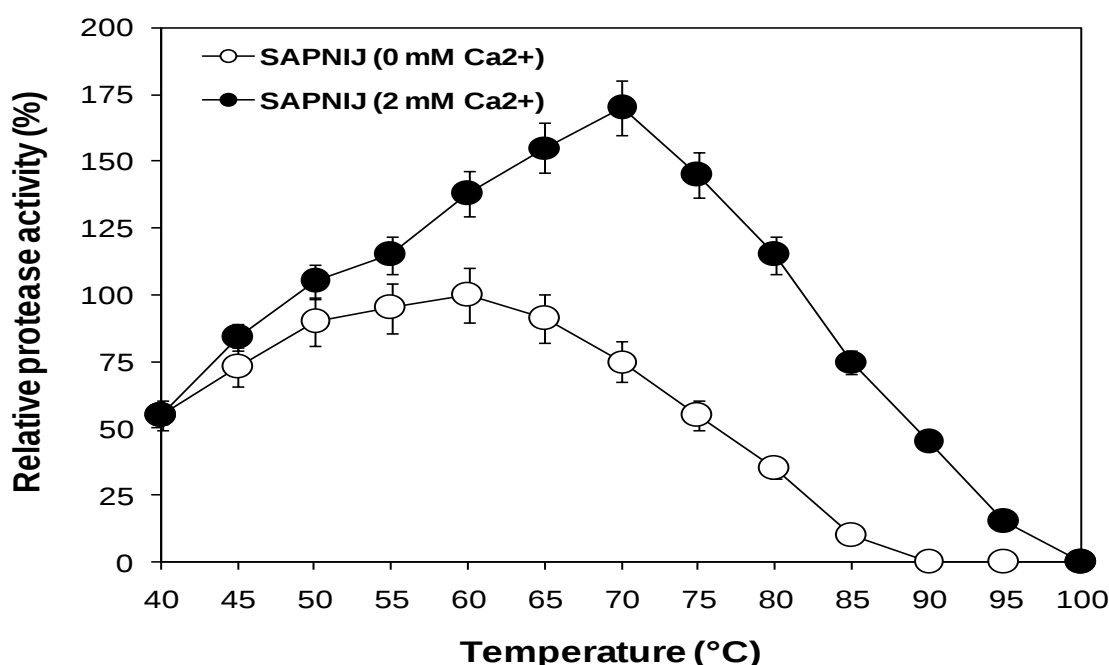


Figure 3.18: Effet de la température sur l'activité protéase SAPNIJ.

Nous remarquons que pour des températures inférieures à 40°C, les activités relatives sont comparables en absence ou en présence de CaCl_2 . Cependant, pour des températures supérieures à 40°C, le calcium à une concentration optimale de 2 mM améliore l'activité protéolytique. En absence de calcium, l'optimum est observé pour une température de 60°C, alors qu'en présence de calcium, l'activité optimale est déplacée à 70°C. A 80°C, l'activité relative est de 125% quand le calcium est ajouté, et elle n'est que de 55% en son absence. Ceci peut être expliqué par la tendance des protéases à subir une autoprotéolyse à des températures élevées [271]. Ceci suggère fortement que le calcium à 2mM est nécessaire pour la thermoactivité de l'enzyme.

Plusieurs travaux ont montré que la thermostabilité des enzymes pourrait être améliorée par l'addition de certains ions tels que les ions Ca^{2+} , qui sont connus comme éléments stabilisateurs de plusieurs enzymes aux températures élevées [242, 257, 262, 272].

La stabilité thermique de l'enzyme produite par la souche NIJ a été étudiée par pré-incubation de l'enzyme à différentes températures (70, 80 et 90°C) pendant 10h en présence du Calcium (2 mM). L'ensemble des résultats est illustré dans la figure 3.19.

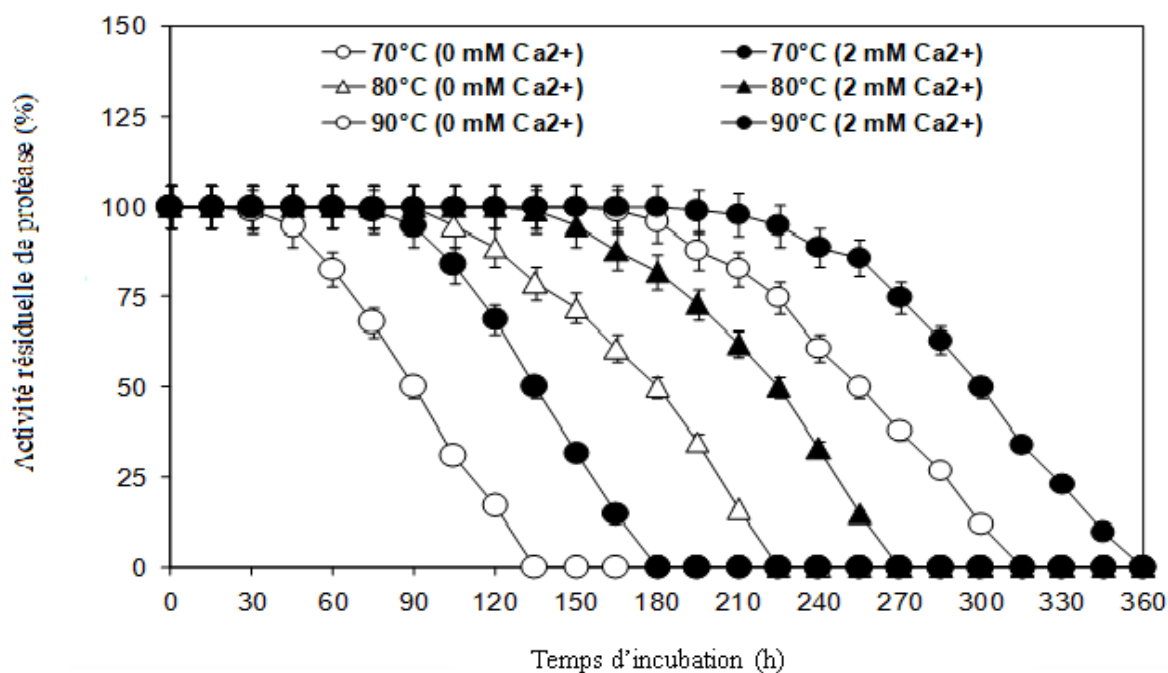


Figure 3.19 : Etude de la thermostabilité de l'enzyme SAPNIJ.

L'étude de la stabilité thermique de la SAPNIJ à différentes températures nous a permis de déduire que cette enzyme est totalement stable pendant 5h à des températures inférieures ou égales à 40°C avec ou sans ajout du calcium. A des températures supérieures à 50°C, l'étude de la thermostabilité en absence des ions Ca²⁺ a montré que la SAPNIJ possède des temps de demi-vie qui diminuent avec l'augmentation de la température. Ces valeurs se voient clairement augmenter avec l'ajout de 2 mM Ca²⁺ ; c'est ce qui prouve l'implication de ces ions divalents dans, également, l'amélioration de la thermostabilité de la SAPNIJ. En effet, les temps de demi-vie de la SAPNIJ à 50, 60 et 70°C sont respectivement de 330, 150, et 30 min en absence de Ca²⁺. Alors qu'en présence de 2 mM Ca²⁺ ces temps de demi-vie sont respectivement de l'ordre de 450, 240 et 90 min. Des résultats comparables ont été retrouvés avec la protéase de la souche de *Bacillus pumilus* CBS, qui demeure stable pendant 1h de 40 à 60°C [266]. Alors que la protéase de la souche de *Brevibacillus brevis* US575 a été affectée par des températures élevées (supérieures à 70°C). Ainsi, l'activité résiduelle n'est que 45% après une incubation de 30 min à 80°C [214].

Par ailleurs, la thermostabilité est un phénomène qui dépend de la structure conformationnelle de l'enzyme et du microclimat où elle se trouve le microorganisme producteur. En effet, le mécanisme d'inactivation des protéases produites par les différentes souches étudiées pourrait être expliqué par la destruction des liaisons non covalentes, responsables du maintien de la conformation active [273]. Ce dépliement est généralement irréversible, suivi d'une agrégation et une précipitation de l'enzyme lorsqu'elle est soumise à des températures élevées [274].

3.3.5.3. Effet des inhibiteurs et des agents réducteurs spécifiques de protéases sur l'activité de SAPNIJ

Nous nous sommes intéressés à déterminer le résidu clé impliqué dans l'activité catalytique de la protéase SAPNIJ. Pour cela nous avons testé l'effet de plusieurs réactifs chimiques spécifiques sur l'activité de cette protéase. Les résultats présentés dans le tableau 16 permettent de tirer les conclusions suivantes:

- Le PMSF et le DFP inhibent complètement l'activité protéolytique. Ceci confirme que la protéase SAPNIJ appartient à la famille des subtilisines ; d'où la nomination de l'enzyme « **SAPNIJ** : Serine AlkalineProteaseNIJ ».
- Les inhibiteurs à thiol (2-ME, DTNB, NEM, EPNP et Iodoacetamide), les inhibiteurs à acide aspartique (Leupeptin et Pepstatin A), les inhibiteurs de la chymotrypsine (TPCK, TLCK), les inhibiteurs de la trypsine (SBTI), les Inhibiteurs compétitifs de la trypsine (Benzamidine) et les inhibiteurs à cystéine n'ont aucun effet sur l'activité protéolytique de cette enzyme.
- Par contre, on remarque une légère diminution de l'activité en présence des inhibiteurs de métallo-protéases (EDTA et EGTA). Ceci suggère qu'un facteur métallique n'est pas impliqué dans l'activité protéolytique de cette enzyme. De nombreux autres travaux ont mis en évidence l'effet de l'EDTA sur l'activité des protéases de la famille des subtilisines [275-277].

À la lumière de ces résultats, nous pouvons déduire que l'enzyme SAPNIJ est un membre de la famille des protéases à sérine.

Tableau 3.14 : Effet de différents inhibiteurs et des agents réducteurs sur la stabilité de la SAPNIJ.

Inhibiteur/agent réducteur	Spécificité	Concentration	Activité protéase résiduelle (%)
Témoin		–	100 ± 2,5
PMSF	Inhibiteurs spécifiques des protéases à sérine	5mM	0 ± 0,0
DFP		5 mM	0 ± 0,0
SBTI	Inhibiteur spécifique de la trypsine	1 mg/mL	98± 2,5
TLCK	Inhibiteurs de protéase trypsine-like	1 mM	99 ± 2,5
TPCK	Inhibiteur spécifique de la chymotrypsine	1 mM	90± 2,2
Benzamidine	Inhibiteur compétitive des protéases à sérine	10 mM	103 ± 2,6
<i>LD</i>DTT	Agent réducteurs des ponts S-S (disulfures) et Inhibiteurs de protéases à cystéine ou à groupement thiol	10 mM	97 ± 2,4
2-ME		5 mM	96± 2,4
DTNB		5mM	95 ± 2,3
NEM		2mM	93 ± 2,2
Iodoacétamide		5mM	84 ± 2,1
Leupeptine	Inhibiteurs des acides aspartiques	50 µg/mL	92 ± 2,1
Pepstatine A		2 µg/mL	101 ± 2,5
EDTA	Inhibiteurs des métalloprotéases	10 mM	93 ± 2,2
EGTA	Inhibiteurs des métalloprotéases	2 mM	83 ± 2,1

3.3.5.4. Effet des ions métalliques sur l'activité de SAPNIJ

Plusieurs travaux ont montré que l'activité enzymatique de certaines protéases de microorganismes exige la présence de certains ions, tels que le calcium ou le magnésium [218, 288]. Ainsi l'effet des ions Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+} à une concentration de 2 mM a été étudié sur l'activité protéase à pH 11 et à 70 °C. Les résultats sont regroupés dans le tableau 3.15.

Tableau 3.15: Effet des ions métalliques sur la stabilité de la SAPNIJ.

Ion métallique (2 mM)	Activité protéase résiduelle (%)
Témoin	100 ± 2,5
Ca^{2+} (CaCl_2)	170 ± 4
Mg^{2+} (MgSO_4)	156 ± 3,5
Mn^{2+} (MnSO_4)	133 ± 3,1
Zn^{2+} (ZnSO_4)	85 ± 2,1
Co^{2+} (CoSO_4)	105 ± 2,6
Cu^{2+} (CuSO_4)	102 ± 2,5
Fe^{2+} (FeSO_4)	73 ± 1,9
Ni^{2+} (NiCl_2)	0 ± 0,0
Cd^{2+} (CdCl_2)	0 ± 0,0
Hg^{2+} (HgCl_2)	0 ± 0,0

Nous notons que les ions Mn^{2+} , Mg^{2+} et Ca^{2+} , activent l'enzyme avec une augmentation considérable de 133, 156 et 170 % de l'activité enzymatique, respectivement. Ces observations laissent supposer que ces ions divalents interviennent dans la stabilisation de l'enzyme. Ces ions métalliques exercent un effet protecteur sur l'enzyme contre la dénaturation thermique, jouant ainsi un rôle essentiel dans le maintien de sa conformation active à une température plus élevée [184]. Le rôle du Ca^{2+} est probablement lié à la stabilisation de la forme active du SAPNIJ et à la préservation de sa structure contre

l'autolyse. Odenwald et *al.* [278] ont montré que les ions Ca^{2+} jouent un rôle important dans la stabilité des protéases à sérine. Ces enzymes possèdent au moins un site de fixation pour le calcium.

En plus à l'exception l'activité protéolytique des ions bivalents (Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et Fe^{2+}), n'est pas affectée. Par contre, elle est inhibée respectivement par : Ni^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+} à des concentrations de 2 mM. Des résultats similaires ont été observés avec des alcalines protéases produites par des souches microbiennes [242, 257, 262, 263, 279].

3.3.5.5. Effet des polyols sur la thermostabilité de SAPNIJ

La thermostabilité des enzymes peut être améliorée par modification de leur microenvironnement par addition de sucres ou de polyols [280]. L'effet protecteur des polyols est lié à leurs groupements hydroxyles. L'ajout de certains polyols évite la dénaturation des molécules enzymatiques en renforçant les interactions hydrophobes à l'intérieur des molécules protéiques.

Ainsi, nous avons étudié l'influence de polyols sur la stabilité de la protéase SAPNIJ. En effet, les activités résiduelles après 6 h d'incubation à 90 °C étaient de 89, 81, 77, 71, 65, 45 et 32 % dans la présence de PEG 1500, PEG 1000, PEG 6000, sorbitol, glycérol, mannitol et xylitol, respectivement, alors que l'activité était de 50 % après 6 h d'incubation en l'absence de polyols. Dans le même contexte, glycérol, mannitol et polyéthylène glycol amélioré la stabilité thermique de l'alcaline protéase SAPRH de *Bacillus safensis* RH12 [230] et SAPLF de *Lysinibacillus fusiformis* C250R [264]. De même, la présence de CaCl_2 ou PEG 1500 a partiellement amélioré la thermostabilité.

A cet effet, l'amélioration de la stabilité thermique par l'ajout des polyols est due probablement au renforcement des interactions hydrophobes à l'intérieur des molécules enzymatiques qui deviennent plus résistantes à l'inactivation thermique [282].

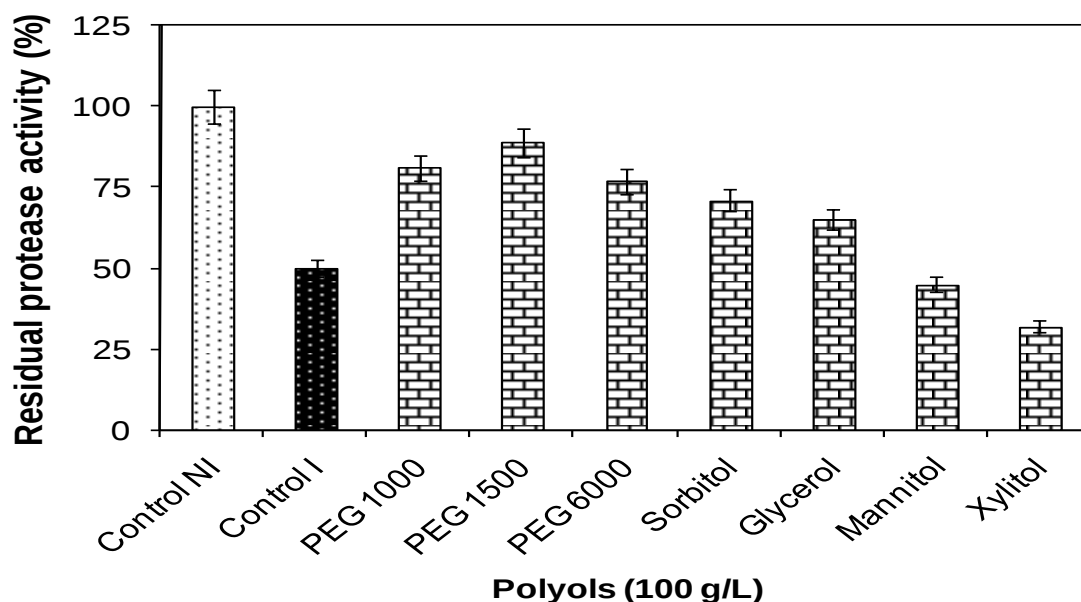


Figure 3.20 :Effet des polyols sur la thermostabilité de l'enzyme SAPNIJ.

3.3.5.6. Effet combiné du calcium et de sorbitol sur la thermostabilité de l'enzyme SAPNIJ

Les expériences précédentes ont montré le rôle du calcium et des polyols dans l'amélioration de la thermostabilité de la protéase SAPNIJ. Pour cela on a essayé de tester l'effet du calcium (2 mM) combiné au PEG1500 (10 %) sur la thermostabilité de la protéase SAPNIJ après pré-incubation de 12 h à 90 °C.

Le temps de demi-vie (en min) à 90 °C de l'enzyme non incubée, déterminée en absence du PEG1500 (10 %) et de CaCl_2 est considérée comme contrôle (figure 3.21).

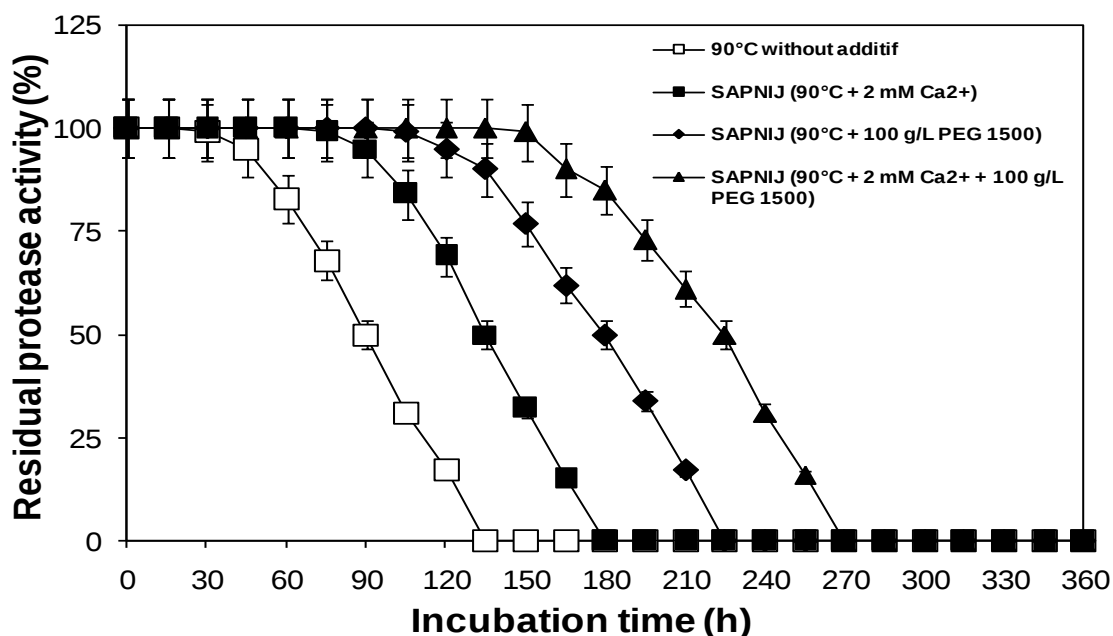


Figure 3.21: Effet combiné du calcium et de PEG1500 sur la thermostabilité de l'enzyme SAPNIJ.

A noter que l'effet du PEG 1500 seul est meilleur que celui de CaCl_2 uniquement, les temps de demi-vie étant de l'ordre de 180 et 135 min, respectivement (figure 3.21). Cependant, l'ajout des deux additifs simultanément, améliore la demi-vie à 90 °C pour être 225 min démontrant l'effet bénéfique de la combinaison de CaCl_2 et de PEG 1500 sur le thermostabilité du SAPNIJ purifié. L'ajout de polyols peut améliorer les thermostabilités des enzymes par l'effet protecteur de leurs groupes hydroxyle [283].

3.3.5.7. Profil de spécificité et cinétique du substrat pour la SAPNIJ

Les résultats présentés dans le tableau 3.16 montrent que SAPNIJ a pu dégrader les substrats naturels pour différents degrés. La caséine était le substrat naturel préféré de la SAPNIJ par rapport à l'albumine, gélatine, ovalbumine et kératine. Des résultats similaires ont été obtenus pour le SPVP produit par *Aeribacillus pallidus* VP3 [264]. Pour la protéase alcaline produite par *Brevibacillus brevis* US575, il n'y a pas de substrat préféré. Il s'est avéré actif pendant une large gamme de substrats tels que la kératine suivie par la gélatine, l'élastine, la caséine, la myoglobine et l'albumine [214]. SAPNIJ a montré un niveau élevé d'hydrolyse activité avec tous les substrats modifiés testés avec plus haute spécificité pour l'azo-caséine et l'albumine azur, cependant, ne montrant aucune activité envers de la collagène de types I et II-FITC (tableau 3.16). Il a été noté que l'enzyme purifiée présentait à la fois activités amidase et estérase sur le C-terminal protégé et L-tyrosine N-terminal tel

que BTEE et ATEE, mais pas sur N-terminal et C-terminal L-arginine et cystéine protégées : BAEE, BCEE, et TAME respectivement. Parmi les peptides synthétiques utilisés, le profil de spécificité de substrat suggère que l'enzyme SAPNIJ préfère largement les substrats hydrophobes, avec des résidus aromatiques occupant le P1 et les positions P4 des substrats pNA. En outre, l'activité relative de SAPNIJ est de 9% avec Suc-AA- V-pNA et 53% avec Suc-A-A-F-pNA lorsque le résidu alanine est placé en position P1. Ces comportements, également rapportés pour d'autres sérines de sont les origines pour le genre *Bacillus*[181, 264, 284] ayant indiqué que la protéase SAPNIJ était très similaire à la sérine protéase non seulement en termes de spécificité pour la position P1, mais aussi en ce qui concerne les effets des acides aminés résidus voisins du site de clivage. Au contraire, certaines différences ont été observées à l'intérieur spécificité de la chaîne à P2, ce qui pourrait vraisemblablement indiquer la présence d'un site actif étendu. La proline a également été notée pour favoriser l'hydrolyse à la position P2 dans l'enzyme SAPNIJ, une caractéristique spécifique de la subtilisine 168 [286]. Le SAPNIJ, le SAPHM, le SAPRH, et Savinase™ 16L, type EX ont montré la cinétique classique de Michaelis-Menten pour les deux substrats utilisés. Avec la caséine comme substrat naturel, les valeurs de k_{cat}/K_m présentées par SAPNIJ étaient de 10,70 4,26, et 1,34 fois plus élevées que ceux de Savinase™ 16L, type EX ;SAPRH; et SAPHM ; respectivement. Lorsque le Suc-(Ala)2-Pro-Phe-pNA a été utilisé comme substrat synthétique, SAPNIJ a également affiché des valeurs de k_{cat} / K_m qui étaient de 3,70, 2,12, et 1,37 fois supérieures à celles de la Savinase™ 16L, type EX;SAPRH;et SAPHM, respectivement (tableau 3.17)

Tableau 3.16:Spécificité de la protéase SAPNIJ vis-à-vis des substrats.

Substrat		Concentration	Absorbance (nm) ^a	Activité protéase relative(%) ^a
Protéine naturelle	Caééine	30 g/L	600	100 ± 2.5
	Albumine	30 g/L	600	89 ± 2.1
	Gélatine	30 g/L	600	55 ± 1.4
	Ovalbumine	30 g/L	600	35 ± 1.1
	Kératine	30 g/L	600	25 ± 0.9
Protéine modifié	Azo-caséine	25 g/L	440	100 ± 2.5
	Albumine azure	25 g/L	440	77 ± 2.1
	Kératine azure	25 g/L	440	26 ± 0.9
	Collagène type I	10 g/L	440	0 ± 0.0
	Collagène type II	10 g/L	440	0 ± 0.0
Ester	BTEE	10 mM	253	100 ± 2.5
	ATEE	10 mM	253	96 ± 2.4
	BAEE	10 mM	253	0 ± 0.0
	BCEE	10 mM	253	0 ± 0.0
	TAME	10 mM	253	0 ± 0.0
Peptide synthétique (pNA)	P4 - P3 - P2 - P1 -P '1			
	Suc-F-pNA	5 mM	410	58 ± 1.6
	Benz-Y-pNA	5 mM	410	41 ± 1.4
	Met-pNA	5 mM	410	35 ± 1.1

	Ac-L- <i>p</i> NA	5 mM	410	32 ± 1.0
	Pro- <i>p</i> NA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Ac-A- <i>p</i> NA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Benz-R- <i>p</i> NA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Suc-Y-L-V- <i>p</i> NA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Suc-A-A-A- <i>p</i> NA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Suc-A-A-V- <i>p</i> NA	5 mM	410	9 ± 0.3
	Suc-A-A-F- <i>p</i> NA	5 mM	410	53 ± 1.5
	Benz-F-V-R- <i>p</i> NA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Suc-A-A-P-F- <i>p</i> NA	5 mM	410	100 ± 2.5
	Suc-F-A-A-F- <i>p</i> NA	5 mM	410	99 ± 2.5
	Suc-A-A-V-A- <i>p</i> NA	5 mM	410	92 ± 2.3
	Suc-A-A-P-M- <i>p</i> NA	5 mM	410	80 ± 2.1
	Suc-A-A-P-L- <i>p</i> NA	5 mM	410	77 ± 2.1
	Suc-L-L-V-Y- <i>p</i> NA	5 mM	410	65 ± 1.6
	Ac-Y-V-A-D- <i>p</i> NA	5mM	410	0 ± 0.0

Tableau 3.17:Détermination des paramètres cinétiques de la protéase SAPNIJ.

Substrat	Enzyme	K_m (mM) ^a	V_{max} (U/mg) ^a	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)	Catalytic efficiency relative to SAPNIJ
Caséine ^b	SAPNIJ	0.362 ± 0.01	87,450 ± 315	58,300	161.050	1.00
	SAPHM	0.453 ± 0.02	81,560 ± 283	54,373	120,029	0.74
	SAPRH	0.621 ± 0.03	35,250 ± 515	23,500	37,842	0.23
	Savinase™ 16L, type EX	0.945 ± 0.09	21,332 ± 476	14,221	15,048	0.09
Met Suc- (Ala) ₂ - Pro-Phe- pNA ^c	SAPNIJ	0.577 ± 0.05	186,570 ± 950	124,380	215,563	1.00
	SAPHM	0.755 ± 0.06	178,200 ± 852	118,800	157,350	0.72
	SAPRH	0.787 ± 0.07	120,125 ± 890	80,083	101,757	0.47
	Savinase™ 16L, type EX	0.935 ± 0.08	81,595 ± 605	54,397	58,179	0.26

Ceci nous a amené à déduire les valeurs des paramètres cinétiques : constante de dissociation ou de Michaelis-Menten (K_m) et vitesse maximale (V_{max}), constante catalytique (k_{cat}) et l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) correspondante à chaque enzyme moyennant le programme Hyper32 (tableau 3.17).

3.4. Applications biotechnologiques de la souche NIJ

3.4.1. En détergences

3.4.1.1. Effets des additifs de détergent sur la stabilité de la protéase SAPNIJ

Les enzymes purifiées (SAPNIJ-Présente étude et commerciales SAPHM, SAPRH et Savinase™ 16L et type EX) ont été pré-incubés avec chaque additif détergent pendant 6h à 40 °C et les résidus l'activité ont été mesurées dans les conditions standards de chaque

dosage de chaque enzyme utilisée. L'activité s'exprime en pourcentage du niveau d'activité en l'absence d'additifs. Les résultats sont donnés dans le tableau 3.18.

A noter une stabilité remarquable de l'activité SAPNIJ a été obtenue dans le présence de 15% de Tween 20 et 40, ou de Triton X-100 et les tensioactifs anioniques forts, en particulier le SDS et LAS par rapport à ceux du SAPHM ; SAPRH; et Savinase™ 16L, type EX. Aussi, SAPNIJ a donné une excellente stabilité par rapport à ses homologues en conservant 200 et 99% de ses activités initiales après traitement avec 15% de peroxyde d'hydrogène et perborate de sodium à 5%, respectivement, 175 et 73 % pour le SAPHM ; 160 et 85% pour SAPRH; et 144 et 75% pour la Savinase™ 16L, type EX ; respectivement. Cette remarquable stabilité est similaire à certaines protéases comme KERAB dans le présence de 5% Tween 40, 1,5% SDS et 15% H₂O₂, [42], BM1 et BM2 en présence de 1% Triton X-100, 0,1 % SDS et 1 % H₂O₂[42]. La stabilité de l'eau de Javel a également été atteinte [275]. A cet effet, ce remarquable stabilité du SAPNIJ est intéressante car seuls quelques auteurs ont rapporté que les protéases de type sauvage stable aux oxydants, aux tensioactifs et à l'eau de Javel.

Tableau 3.18: Effet de certains détergents sur la stabilité enzymatique.

Additif	Concentration	Activité protéase résiduelle (%) ^a			
		SAPNIJ	SAPHM	SAPRH	Savinase™ 16L, type EX
None	–	100 ± 2.5	100 ± 2.5	100 ± 2.5	100 ± 2.5
Tween 20	10% (v/v)	155 ± 3.7	130 ± 3.4	127 ± 3.3	142 ± 3.8
	15%	140 ± 3.8	121 ± 3.3	119 ± 3.2	137 ± 3.6
Tween 40	10% (v/v)	145 ± 3.9	119 ± 3.2	138 ± 3.4	129 ± 3.3
	15%	133 ± 3.3	111 ± 2.7	129 ± 3.3	110 ± 2.7
Tween 80	10% (v/v)	130 ± 3.4	110 ± 2.7	117 ± 3.1	108 ± 2.7
	15%	122 ± 3.2	105 ± 2.6	108 ± 2.6	106 ± 2.6
Triton X-100	10% (v/v)	170 ± 4.0	162 ± 3.9	159 ± 3.7	130 ± 3.2
	15%	153 ± 3.7	144 ± 3.4	141 ± 3.4	120 ± 3.2
SDS	1% (w/v)	88 ± 2.4	75 ± 2.2	90 ± 2.3	80 ± 2.0
	5%	71 ± 2.1	50 ± 1.5	60 ± 1.5	61 ± 1.5
LAS	1% (w/v)	98 ± 2.5	81 ± 2.0	91 ± 2.2	96 ± 2.3
	5%	89 ± 2.2	66 ± 1.8	65 ± 1.7	73 ± 1.9
Sulfobetaine	50 mM	101 ± 2.5	86 ± 2.4	94 ± 2.3	105 ± 2.6
H ₂ O ₂ *	10% (v/v)	240 ± 6.5	198 ± 5.2	187 ± 4.1	155 ± 3.6
	15%	200 ± 5.5	175 ± 4.0	160 ± 3.7	144 ± 3.5
Sodium perborate	2% (w/v)	115 ± 2.8	80 ± 2.0	112 ± 2.6	89 ± 2.1
	5%	99 ± 2.5	73 ± 2.1	85 ± 2.3	75 ± 2.1
TAED	10% (w/v)	124 ± 3.2	119 ± 3.2	135 ± 3.3	114 ± 2.7
Na ₂ ·CO ₃	50 mM	99 ± 2.5	78 ± 2.0	98 ± 2.4	121 ± 3.2
Na ₂ ·CMC	10% (w/v)	97 ± 2.5	101 ± 2.5	112 ± 2.6	101 ± 2.5
STPP	25 mM	95 ± 2.4	83 ± 2.1	80 ± 2.0	92 ± 2.2
Zwittergent 3-12	15 mM	115 ± 2.7	105 ± 2.6	121 ± 3.2	113 ± 2.6
CHAPS	25 mM	96 ± 2.4	89 ± 2.2	103 ± 2.5	125 ± 3.2
CTAB	25 mM	103 ± 2.6	99 ± 2.5	116 ± 3.1	110 ± 2.7

TTAB	25 mM	108 ± 2.7	115 ± 2.8	105 ± 2.6	106 ± 2.6
Zeolithe	1% (w/v)	105 ± 2.6	88 ± 2.2	108 ± 2.7	90 ± 2.2
Perfume	1% (v/v)	121 ± 3.2	111 ± 2.7	105 ± 2.6	97 ± 2.5

3.4.1.2. Stabilité et compatibilité de protéase SAPNIJ vis-à-vis des détergents commerciaux liquides et solides testés

Les résultats présentés dans la figure 3.22 montrent que SAPNIJ est extrêmement stable et compatible avec les détergents à lessive commerciaux utilisés dans une concentration de 7 mg/mL, conservant 100% de son activité initiale avec Dixan, iSiSpril et Ariel (vs 88, 90 et de 100% pour SAPNIJ ;90, 100 et 95% pour Savinase™ 16L, pour le type EX ;et 61, 85, et 75% pour SAPRH, respectivement). Nous avons enregistré sur le même chiffre que SAPNIJ a montré une grande stabilité et plus de 90% avec Det (vs 77, 66 et 55% pour le SAPRH ;Savinase™ 16L, type EX et SAPHM, respectivement) même après 6h d'incubation à 40 °C. Incubés dans les mêmes conditions dans la présence d'Ariel, protéase VM10 [288] et protéase SSR1 [289] n'ont conservé que 42 et 37% de leur activités, respectivement.

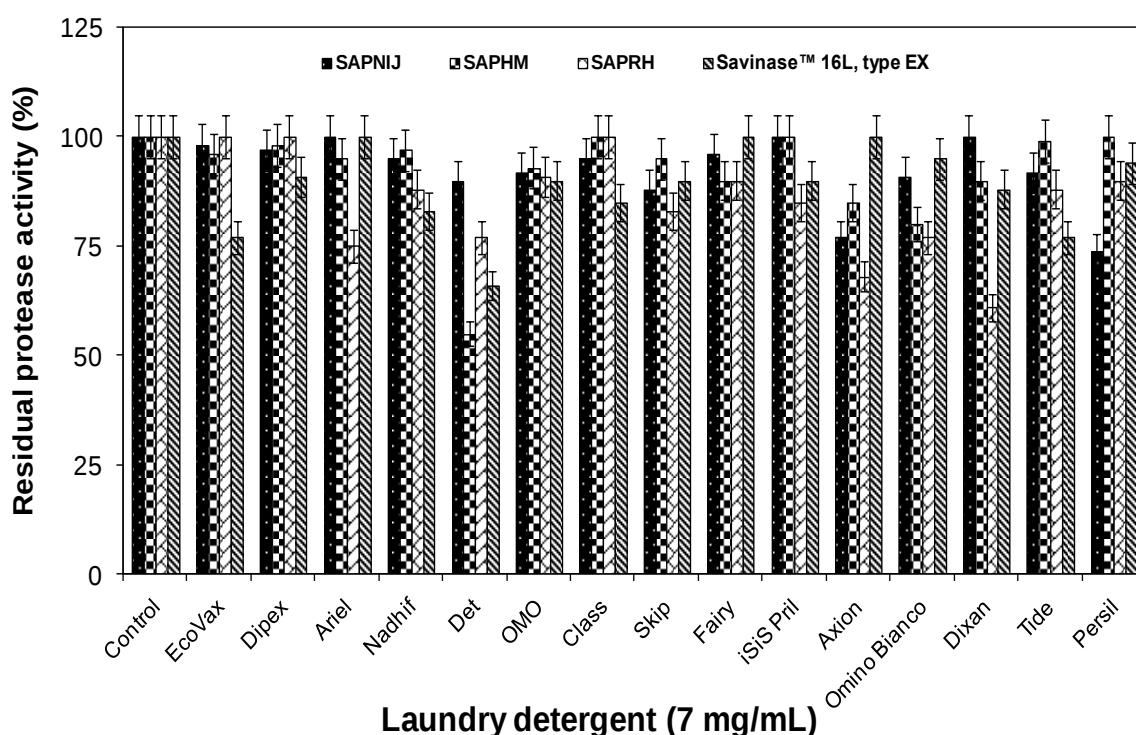


Figure 3.22 : Etude de la stabilité de la protéase SAPNIJ en présence des détergents

3.4.1.3. Tests de performance de lavage de la SAPNIJ

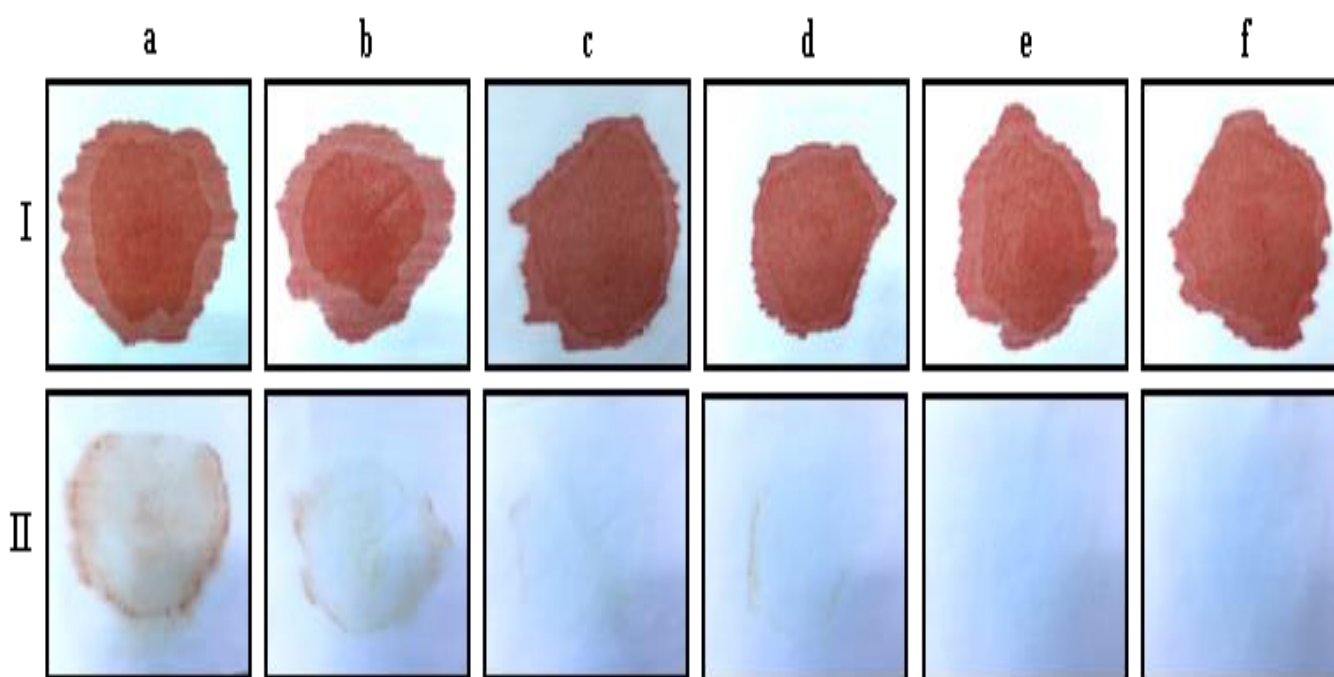


Figure 3.23: Performances des protéases SAPNIJ et Alcalase Ultra 2,5 L dans le détergent liquide commerciale Ariel à 7 mg/mL ; (a) traitement par l'eau de robinet ; (b) traitement par Ariel (7 mg/mL) ; (c) Traitement par SAPRH (500 U/mL) + Ariel (7 mg/mL) ; (d) SAPRH (500 U/mL) + Ariel detergent (7 mg/mL); (e) Savinase™ 16L, type EX (commercial enzyme, 500 U/mL) + Ariel detergent (7 mg/mL), and (f) SAPNIJ (500 U/mL) + Ariel detergent (7 mg/mL).

D'après la figure 3.23, on remarque que l'ajout de la protéase SAPNIJ à la solution détergente améliore les performances du détergent Ariel (7 mg/mL) dans le sens d'une meilleure décoloration des taches du sang. Des travaux similaires ont montré la capacité des protéases alcalines dans l'élimination des taches du sang, en tenant l'exemple de la protéase alcaline thermostable produite par la souche *Bacillus alveayuensis* CAS 5 qui a éliminé totalement le sang suite à sa combinaison avec un détergent à concentration de 5 mg/mL pendant 20 min [290].

Pour qu'une enzyme soit utilisée dans une formule de détergent, il faudrait qu'elle possède deux principales qualités: elle doit être active à des pH alcalins et doit être compatible avec les différents composants des détergents. L'utilisation principale des protéases compatibles dans les détergents concerne les formulations de lessives pour linge [291-294].

3.4.2. Application dans la dépollution d'un rejet complexe

Nous rappelons que dans cette application nous avons utilisé la souche NIJ à double production (ENZ-BS) dans la dépollution d'un rejet complexe riche en protéines et en substrats hydrophobes (hydrocarbures).

3.3.2.1.Évaluation des performances de NIJ de production de biosurfactant dans un rejet complexe

Dans le but de tester la capacité de souche NIJ à synthétiser de biosurfactants, à partir de deux milieux de production naturel l'un et un rejet d'abattoir l'autre est un rejet complexe saine sans ajout de nutriments (azote, phosphore, fer, etc.), une culture jeune de la souche est servie à l'inoculation de chaque milieu (1% v/v). La production de biosurfactant est suivie quotidiennement durant une période de trois jours. La figure 3.24 montre les résultats de la tension de surface, l'indice d'émulsification et le déplacement d'huile.

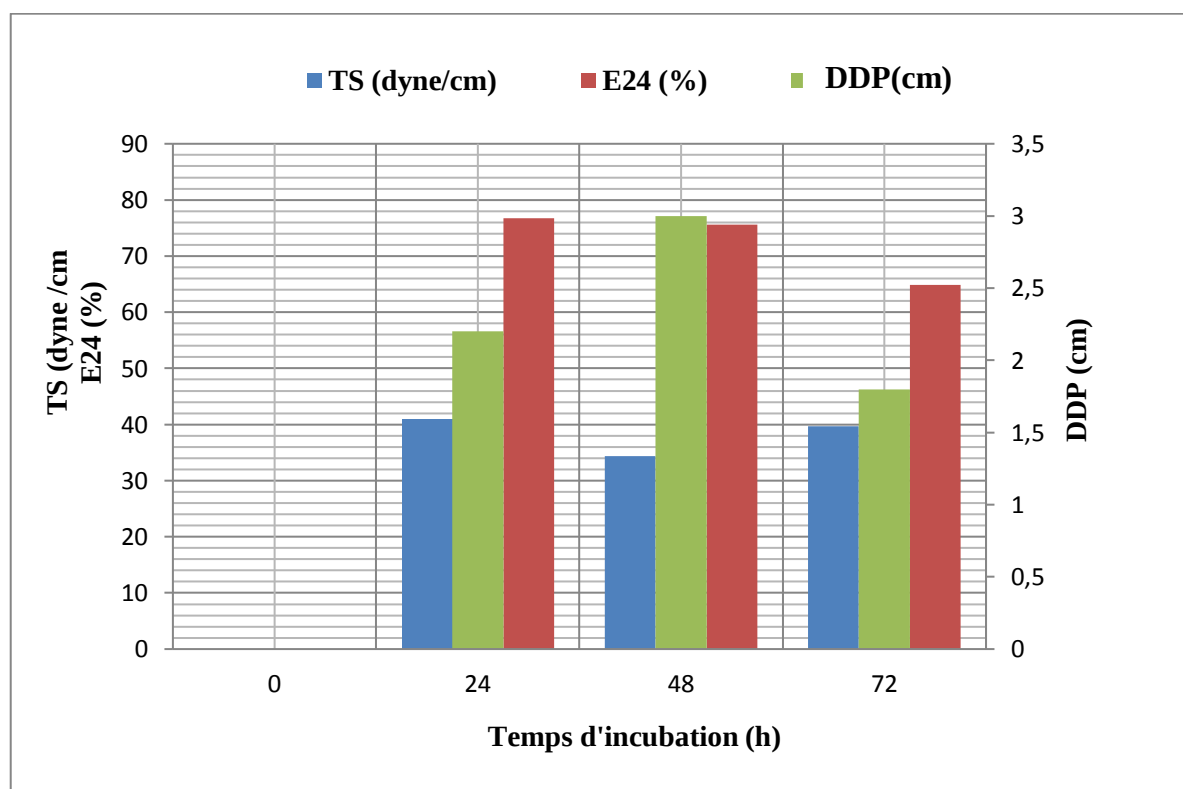


Figure 3.24: Cinétique de production de biosurfactant par *Bacillus atrophaeus* NIJ sur milieu complexe.

La figure 3.24 montre que la souche bactérienne supporte la croissance dans le rejet (bien que le taux de croissance soit inférieur à celui dans le milieu de production de protéase) avec une bonne production de biosurfactant dans le rejet complexe pour notre souche.

La tension de surface du surnageant dans le rejet complexe décroît avec le temps pour atteindre une valeur minimale de 34,5 dyne/cm au bout du 48h pour NIJ, puis augmente jusqu'au dernier jour, cette augmentation montre que la biosynthèse du biosurfactant a été arrêtée. Ceci est probablement dû à la formation des métabolites secondaires et à l'adsorption des molécules du biosurfactant à l'interface eau-huile [295].

Pour l'activité émulsifiante du surnageant de culture, nous remarquons qu'elle augmente rapidement pour atteindre un maximum de 72,5 % pour NIJ puis elle diminue au bout de 72h. Rappelant qu'une bonne activité émulsifiante conduisant à la formation d'une émulsion stable s'exprime par un indice d'émulsification E_{24} supérieur ou à 50 %.

3.4.2.2. Évaluation des performances de la souche NIJ dans un rejet liquide

3.4.2.2.1. Recherche d'un milieu de rejet pour la production optimale des protéases

Dans le but de déterminer le milieu optimum de production de protéase plusieurs études ont été suivies sur différents types de rejets : rejet complexe, rejet d'abattoir et rejet de laiterie.

Divers échantillons de chaque type de rejet provenant de la wilaya de Blida ont été soumis à un traitement thermique pendant 20 min à 120 °C afin d'éliminer tous types de cellules végétative microbiennes.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 3.19

Tableau 3.19 : Valeurs de l'activité protéolytiques, lacroissancebactérienne et la variation de pH, dans les rejets traités.

/	Temps (Heures)	DO à 280 nm	Activité protéase (U/mL)	Biomasse (DO à 600 nm)	pH
NIJ avec le rejet complexe	0	0	0	0	7.4
	24	0.279	1018.18	1.51	8.3
	48	1.076	3913.6	4.8	8.6
	72	0.018	64.20	0.09	8.4
NIJ avec le rejet d'abbatoir	0	0	0	0	7.4
	24	0.0291	106.12	0.19	8.4
	48	0.155	565.48	0.97	8.5
	72	0.057	0.97	0.25	8.2
NIJ avec le rejet laiterie	0	0	0	0	7.2
	24	0.201	731.81	1.02	7.65
	48	0.294	1070	1.63	7.9
	72	0.034	124.54	0.21	7.86

La différence des niveaux de production de protéases sur milieu liquide dépendrait de plusieurs paramètres tels que : les exigences des souches, la composition du milieu, les concentrations des constituants et les conditions de production (vitesse d'agitation, température, aération, temps d'incubation).

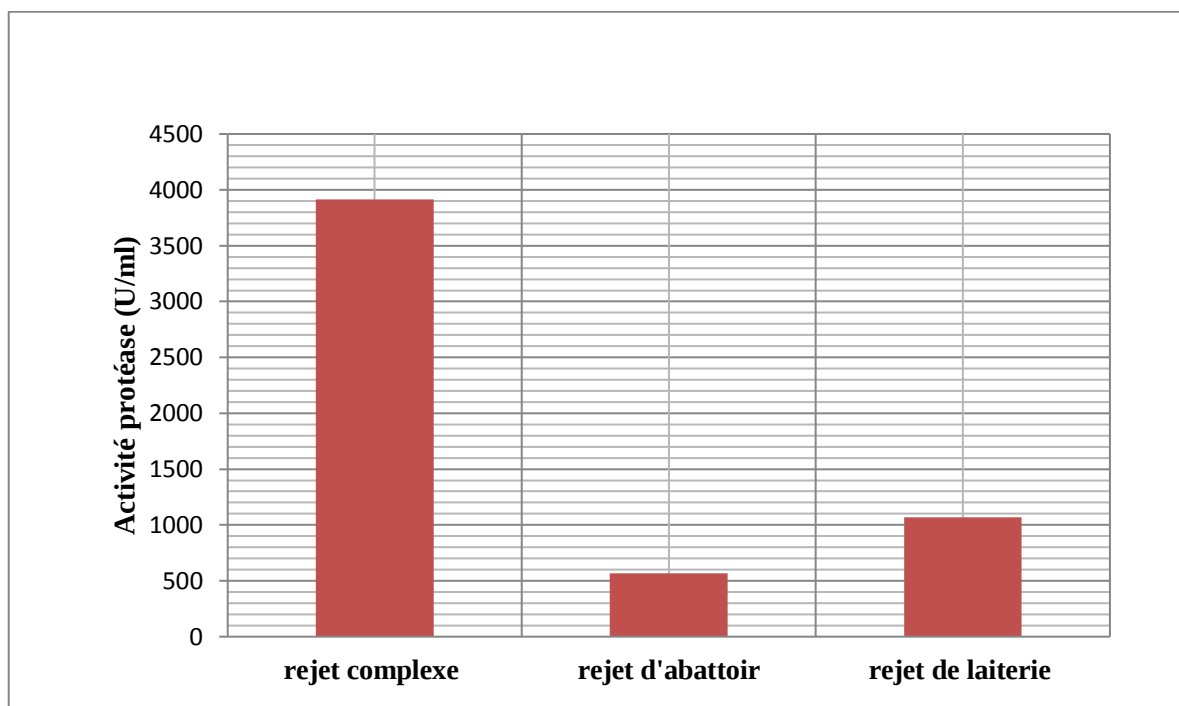


Figure 3.25 : Production de protéase par la souche *Bacillus atrophaeus* NIJ dans le rejet complexe, rejet d'abattoir et rejet de laiterie

L'ensemble des résultats obtenus montrent clairement que la souche sélectionnée se développe très bien dans le rejet complexe. Toutefois, elles présentent des niveaux de production de protéases variables avec des maximums d'activités atteints après 48 h pour la souche NIJ. En plus, nous remarquons que les valeurs du pH ont légèrement varié par rapport à celui de départ (pH 7.4).

À cet effet, les résultats obtenus nous ont cependant permis d'appliquer la souche sélectionnée sur le rejet complexe qui est le plus convenable pour le traitement biologique.

3.4.2.2.2. Résultats des Analyses physico-chimiques

Les eaux de rejet complexe sont acheminées vers la station d'épuration de Beni Mared à la wilaya de Blida où elles ont subi plusieurs analyses pour la caractérisation physico-chimique de rejet avant et après traitement. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.20

Tableau 3.20: Analyses physico-chimiques des eaux de rejet d'abattoir du lavage

Paramètres	Unité	Eau brute	Eau épurée 1NIJ	R (%)
pH	/	7,44	8,7	/
O ₂ dissout	mg/L	7,23	0,73	/
Conductivité	µs/cm	12,01	9,55	/
Matières en suspension	mg/L	450.2	130	71,13
Demande chimique en oxygène	mg/L	2146	453	78,9
Demande Biochimique en oxygène	mg/L	1470	231	84,3
Rapport DCO/DBO ₅	/	1,5	/	/
Azote total	mg/L	670	445	33,6
Phosphore total	mg/L	17.7	77.8	/

En premier lieu pour confirmer que le traitement biologique paraît tout à fait convenable, les résultats de rapport DCO/DBO₅ constituent une indication de l'importance des matières polluantes peu ou pas biodégradables [296]. Les eaux de rejet complexe présentent un ratio DCO/DBO₅ de 1.5 (Tableau 24), donc nous pouvons conclure que même si les eaux de ce rejet présentent une charge organique élevée, elles sont facilement biodégradables. Ces résultats concordent avec celles reportés par Gnagne et Brissaud [297] et Zerhouni [298].

○ Le pH

Le pH influence la plupart des mécanismes chimiques et biologiques dans les eaux. Ce paramètre est un élément important pour l'interprétation de la corrosion dans les canalisations des installations de l'épuration. Le Tableau 24 représente les valeurs du pH de l'échantillon d'eau prélevé qui sont neutres (pH 7.44), ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par El Guamri et Belghity [299]. Après le traitement avec la souche NIJ, on remarque que le pH augmente légèrement il devient légèrement alcalin ceci est due probablement à l'activité bactérienne présente dans les eaux épurées.

○ **La Demande chimique en oxygène DCO**

Les résultats sont présentés sur la figure 3.26.

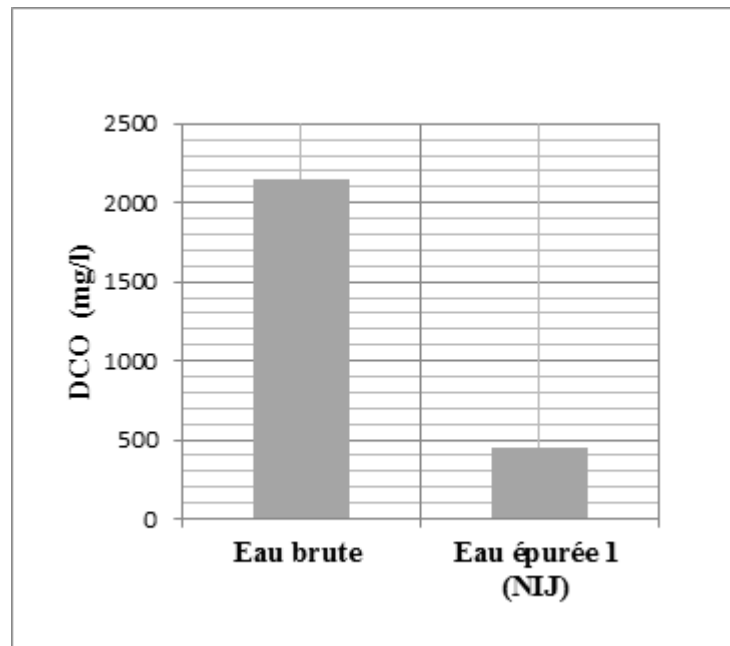


Figure 3.26: Variation de la valeur de la DCO avant et après traitement avec les souches NIJ

La figure 3.26 représente les résultats obtenus de la DCO des échantillons de rejet complexe. Une forte concentration de la DCO a été enregistrée au niveau de l'eau brute d'une valeur de 2146 mg/L. Une diminution significative a été enregistrée pour l'échantillon traité par la souche NIJ d'une valeur de 453 mg/L pour la souche NIJ.

La Demande biologique DBO₅

Les résultats sont présentés sur la figure 3.27

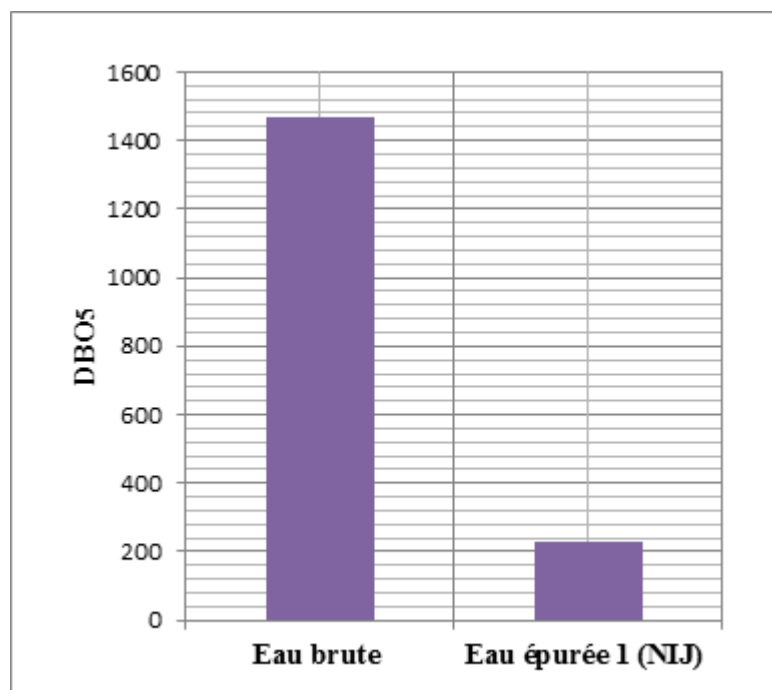


Figure 3.27 : Variation de la valeur de la DBO₅ avant et après traitement avec les souches NIJ

D'après la figure 3.2, la valeur élevée de la DBO₅ de l'eau brute pourrait être expliquée par l'abondance de la matière organique mais après le traitement la valeur a été diminuée jusqu'à 231 mg/L pour la souche NIJ.

○ **L'azote total et le phosphore totale**

La charge minérale de cet effluent à l'état brut montre des concentrations moyennes de phosphore total et de l'azote total respectives de 17.7 mg/L et de 1000 mg/L, ces concentrations sont liées à la charge en sang présentée dans le rejet complexe, et peuvent entraîner l'eutrophisation du milieu récepteur. Après le traitement nous remarquons une réduction de la concentration de l'azote total et une augmentation de la concentration de phosphore total par rapport à la souche, ceci peut être dû à la libération des formes phosphatées lors de l'autolyse bactérienne.

○ **La matière en suspension MES**

D'une manière générale, la MES intervient dans la composition de l'eau par son effet d'échanges d'ions ou d'absorption aussi bien sur les éléments chimiques à l'état de traces que sur les microorganismes, par ailleurs cette valeur moyenne en MES dans l'échantillon brut est élevée d'une valeur de 450.2 mg/l et grâce à un prétraitement que nous avons

appliqué sur cette échantillon on remarque que la valeur moyenne en MES diminue jusqu' à 130 mg/l pour l' eau épuré 1.

- **L'oxygène dissous**

La signification de paramètre de l'oxygénation des eaux est très claire puisque la présence d'oxygène dissous conditionne les réactions de dégradation -aérobie- de la matière organique et plus généralement l'équilibre biologique des milieux hydriques. La quantité de l'oxygène diminué dans l'eau épurée d'une valeur de 7.23mg/l jusqu'à 0.73mg/l pour NIJcar elle a été consommé par la souche pour la dégradation des matières organiques présentes dans l'effluent.

- **La conductivité**

Selon les résultats du tableau la conductivité de rejet complexe est de 12,01 $\mu\text{S.cm}^{-1}$, Après l'utilisation de traitement avec la souche NIJ , cette valeur a été réduite.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de cette présente thèse, nous avons initié un nouveau projet visant la recherche d'une souche bactérienne à double production « biosurfactant + protéase ». Ces deux biomolécules seront capables d'agir dans des conditions extrêmes selon les différents procédés industriels ciblés, notamment, en détergence et la dépollution d'un rejet complexe.

Concernant la première partie sur le criblage, une seule souche codée NIJ à double production a été retenue et identifiée sur la base des critères phénotypiques et moléculaires par détermination de la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARNr 16S. Les résultats obtenus ont permis de rattacher cette souche à l'espèce *Bacillus atrophaeus*.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à l'étude de biosurfactant et de protéase produites par la souche NIJ. Les résultats obtenus montrent que :

- Le type et la quantité du biosurfactant produit varient en fonction de la composition du milieu de culture (source de carbone et source d'azote) et les conditions de culture (température, pH et salinité).
- La source de carbone est l'un des principaux paramètres influençant la production des biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite.
- La production de biosurfactant par la souche NIJ a été réalisée dans un milieu optimisé à base de sels minéraux supplémenté de 1% (v/v) de pétrole comme seule source de carbone et d'énergie, NH_4Cl ($0,4 \text{ g.L}^{-1}$), pH 7, salinité 100 g.L^{-1} et 48h d'incubation sous agitation de 200 tr.min^{-1} .
- Le surnageant de culture contenant le biosurfactant a permis une réduction significative de TS à 29 mN.m^{-1} , E_{24} de 82%.
- Le rendement de $1,65 \text{ g.L}^{-1}$ du biosurfactant est obtenu avec une concentration micellaire critique (CMC) de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ après extraction par acétone.
- Le biosurfactant produit a montré une bonne stabilité dans des conditions extrêmes : pH (2 – 12), salinité ($10 - 100 \text{ g.L}^{-1}$), et températures (4 – $100 \text{ }^\circ\text{C}$).
- La biomolécule obtenue est de nature glycolipide en se basant sur l'analyse de ses groupements fonctionnels révélés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

- La protéase SAPNIJ produite par *Bacillus atrophaeus* NIJ est purifiée à homogénéité avec un facteur de 34,7 fois et un rendement d'environ 25% et montre une activité spécifique de 31000 U/mg.
- L'analyse de l'enzyme pure, montre qu'elle est sous forme d'un seul monomère ayant une taille estimée à 28 kDa par filtration sur gel, PAGE et SDS-PAGE. En plus, le séquençage de l'extrémité NH₂-terminale (27 acides aminés), montre une forte homologie avec une identité de 99% en comparaison avec les protéases de référence.
- La caractérisation biochimique de l'enzyme purifiée nous a permis de conclure que les optima de pH et de température qui sont de 11 et 70 °C, respectivement. Il s'agit d'une enzyme à sérine appartenant à la famille des protéases à sérine vue qu'elle est totalement inhibée par le PMSF et le DFP. Le calcium à 2 mM améliore considérablement sa thermoactivité et sa thermostabilité. Cependant, le cadmium, le nickel et le mercure l'inhibent totalement.
- L'étude de la spécificité de la protéase NIJ vis-à-vis des substrats a montré que la caséine et la caséine azure sont les plus efficacement hydrolysées par SAPNIJ. Par ailleurs, nous avons également montré au cours de ce travail que la protéase SAPNIJ a une bonne activité, stabilité et tolérance en présence de certains solvants organiques.

Dans la troisième partie nous avons étudié la possibilité de réaliser deux applications :

- Dépollution des rejets des eaux usées dont les résultats ont prouvé que la souche NIJ se développe très bien dans un rejet complexe (rejet d'attribution+ rejet de lavage) et permettra un bon traitement biologique. Nous avons remarqué une diminution nette dans les paramètres de dépollution : DCO = 150 vs 2146 mg/L, DBO₅ = 231 vs 1470 mg/L et MES = 130 vs 450 mg/L.
- Par application en détergence, la protéase SAPNIJ présente une stabilité remarquable en présence des surfactants (SDS), des tensioactifs (Tween 20 et 80 et Triton x-100), des agents de blanchiments (perborate de sodium, H₂O₂) et certains détergents commerciaux liquides et solide. Les caractéristiques intéressantes de la SAPNIJ nous permettent de conclure que cette enzyme est convenable pour une éventuelle application industrielle en détergence.

En guise de perspective, nous envisagerons de poursuivre le travail sur :

- L'identification complète de biosurfactant produit par la souche NIJ
- L'étude de la relation structure-fonctions de l'enzyme SAPNIJ.
- Optimiser un milieu unique de double production (protéase-biosurfactant) et produire des quantités importantes de biosurfactant et d'enzyme à l'échelle fermenteur en utilisant de milieux à base de substrats de bon marché.
- Appliquer à l'échelle industrielle la protéase SAPNIJ comme bio-additif en association avec le détergent commercial.
- L'évaluation des performances communes (en même temps) des enzymes et des biosurfactants dans d'autres applications biotechnologiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. MED POL / MED PAS, Plan d'Action National pour la réduction de la pollution marine due à des activités menées à terre. Ministère de l'Aménagement Territoire et de l'Environnement (MATE) , (2005).
2. Lotfabad, T.B., Shourianc, M., Roostaazada, R., Najafabadib, A.R., Adelzadeha, M.R. et Noghabic, K.A., An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran Coll. Surf. B: Biointerf, V. 69, n° 2, (March 2009), 183-193.
3. Pepi, M., Cesaro, A., Liut, G. et Baldi, F., An antarctic psychotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipids. FEMS Microbio. Ecol., V. 53, n° 1, (June 2005), 157-166.
4. Ellaiah, P., Prabhakar, T., Sreekanth, M., Taleb, A.T., Raju, P.B., Saisha, V., Production of glycolipids containing biosurfactant by *Pseudomonas* species. Exp. Biol., V.40, n° 9, (September 2002), 1083–1086.
5. Corsaro, M.M., Lanzetta, R., Parrilli, E., Parrilli, M., Tutino, M.L. et Ammarino, S., Influence of growth temperature on lipid and phosphate contents of surface polysaccharides from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. Bacteriol., (January 2004), V. 186, n° 1, 29–34
6. Calvo, C., Toledo, F.L., Pozo, C., Martinez-Toledo, M.V. et Gonzalez-Lopez, J., Biotechnology of bioemulsifiers produced by microorganisms. Fd. Agric. Environ., (September 2004), V. 2, n° 3-4, 238-243.
7. Desai, J.D. et Banat, I.M., Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol Molec Biol. Reviens., V. 61, n° 1, (March 1997), 47-64.
8. S.Mechri, M.Kriaa, M.BenElhoul, M.Berrouina, N.OmraneBenmrads, H.ZaraïJaouadi, K.Rekik, A.Bouacem, A.Bouanane-Darenfed, S.Chebbi, M.Sayadi, S., Optimized production and characterization of a detergent-stable protease from *Lysinibacillus fusiformis* C250R. International Journal of Biological Macromolecules 101 (2017) 383-397
9. Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B. 2002a. , An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Appl Microbiol Biotechnol, 60(4), 381-395.
10. Jaouadi, B., Ellouz-Chaabouni, S., Rhimi, M., Bejar, S. 2008. , Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. Biochimie, 90(9), 1291-1305.
11. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. , Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62(3), 597-635.
12. Kumar, A.G., Nagesh, N., Prabhakar, T.G., Sekaran, G. 2008., Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. BioresourT echnol, 99(7), 2364-2372.
13. Claus, D., Berkeley, R.C.W. 1986., Genus *Bacillus* In : P.H.A. Sneath et al. (eds.), Bergey s Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. Vol. 2. Cohn 1872, pp. 1105-1139
14. Ronimus, R.S., Parker, L.E., Morgan, H.W. ,The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. FEMS Microbiol Lett,

- 147(1), (1997) 75-9.
15. Ash, C., Farrow, J.A.E., Dorsch, M., Stackebrandt, E., Collins, M.D., Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol* 41, (1991) 3436
 16. Fritze, D. ,Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore- forming bacteria. *Phytopathology*, 94(11), (2004) 1245-8.
 17. Wagar, E.A. ,Defining the unknown: molecular methods for finding new microbes. *J ClinLab Anal*, 10(6), (1996) 331-4.
 18. Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59(1), (1995) 143-69.
 19. Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., Janssen, P.H., Hippe, H., Stackebrandt, E., *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology*, 142 (Pt 8), (1996) 2087-95.
 20. Stackebrandt, E., Ludwig, W., Weizenegger, M., Dorn, S., McGill, T.J., Fox, G.E., Woese, C.R., Schubert, W., Schleifer, K.H., Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round-spore-forming bacilli and non-spore-forming relatives. *J Gen Microbiol*, 133(9), (1987) 2523-9
 21. Joung, K.B., Cote, J.C., Evaluation of ribosomal RNA gene restriction patterns for the classification of *Bacillus* species and related genera. *J Appl Microbiol*, 92(1), (2002) 97-108.
 22. Gibbons, Henry; et al. (25 Mar 2011). , "Genomic signatures of strain selection and enhancement in *Bacillus atrophaeus* var. *globigii*, a historical bio-warfare simulant". *PLoS ONE*. 6 (3): e17836.
 23. Greenberg, DL; Busch, JD; Keim, P; Wagner, DM (1 September 2010)., "Identifying experimental surrogates for *Bacillus anthracis* spores: a review." *Investigative genetics*
 24. Zhelev, DV; Hunt, M; Le, A; Dupuis, C; Ren, S; Gibbons, HS (December 2012)., "Effect of the *Bacillus atrophaeus* subsp. *globigii* Spo0F H101R mutation on strain fitness.". *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (24): 8601–10.
 25. Nakamura, L.K. 1989., Taxonomic relationship of black pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 39:295-300.
 26. Wedum, Arnold. , "Special Report No. 185 (Declassified)" (PDF). Defense Technology Information Center. United States Chemical Corps. Retrieved 25 February 2015.
 27. HAYWARD, AE; MARCHETTA, JA; HUTTON, RS (July 1946)., "Strain variation as a factor in the sporulating properties of the so-called *Bacillus globigii*". *Journal of Bacteriology*. 52: 51–4.
 28. Morelli J., G  rald Szajer , « Analyse des tensioactifs : Partie I » (01 octobre 2000)
 29. Desai, J.D., Banat, I.M. , « Microbial production of surfactants and their commercial potential ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, (1997) 61(1), 47-64.
 30. Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., Sarubbo, L., "Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century". *International Journal of Molecular Sciences*, (2016) 17(3), 401.

31. West, C.C. and J.H. Harwell., Surfactants and subsurface remediation. *Environmental Science & Technology*, 1992. 26(12): p. 2324-233
32. Mehta, S., et al., Biomimetic amphiphiles: Properties and potential use, in *Biosurfactants* 2010, Springer. p. 102-120
33. Marchant, R. and I.M. Banat, Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology letters*, 2012. 34(9): p. 1597-1605.
34. Rebello, S., et al., Surfactants: chemistry, toxicity and remediation, in *Pollutant Diseases, Remediation and Recycling* 2013, Springer. p. 277-320.
35. Markets and Markets, 2016. Accessed March 8, (2018)., <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactantsmarket-493.html>. Accessed March 8, (2018).
36. Senthil Balan S, Ganesh Kumar C, Jayalakshmi S. Physicochemical, “structural and Biological evaluation of Cybersan (trigalactomargarate), a new glycolipid biosurfactant produced by a marine yeast, *Cyberlindnera saturnus* strain SBPN-27”. *Process Biochemistry*.(2019);80:171-80.
37. Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S., « Environmental applications of biosurfactants »: recent advances. *Int J Mol Sci* (2011). 12633-54
38. Shueb E, Akhlaq F, Badar U, Akhter J, Imtiaz S (2013)., Classification and industrial Applications of biosurfactants. Part-I: Natural and Applied Sciences 4 (3): 243-252.
39. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R (2010)., Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (2): 427-444
40. Fracchia L, Cavallo M, Martinotti MG, Banat IM (2012)., Biosurfactants Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials. *Biomedical Science, Engineering and Technology*, Prof. Dhanjoo N. Ghista (Ed.).
41. Kapadia Sanket G, Yagnik BN (2013)., Current Trend and Potential for Microbial Biosurfactants. *Asian Journal of Experimental and Biological Science* 4 (1): 1-8.
42. Pacwa-Plociniczak M, Plaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS (2011)., Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 633-654.
43. Rosenberg E. and Ron E.Z., "High- and low-molecular-mass microbial surfactants", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, (1999), 2154 – 162.
44. Jesus Cortes-Sanchez, A., Hernández-Sánchez, H., Jaramillo-Flores, M.E., « Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives”. *Microbiological Research* (2013). 168, 22-32
45. Varjani, S.J., Upasani, V.N., « Critical Review on Biosurfactant Analysis, Purification and Characterization Using Rhamnolipid as A Model Biosurfactant”. *Bioresour. Technol.* 232, (2017) 3893-97. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.2.047>
46. Jarvis, F.G. et Johnson, M.J., “A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*”. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V. 71, n° 12, (December 1949), 4124–412
47. Asselineau, C. et Asselineau, J., ‘Trehalose containing glycolipids’. *Prog. Chem. Fats Lipids*, V. 16, n° 1, (February 1978), 59–99
48. Kretschmer, A., Bock, H. et Wagner, F., “Chemical and physical characterization of interfacial active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkane”. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 44, n° 4, (October 1982), 864–870.

49. Lang, S., Philip, J.C., "Surface-active lipids in rhodococci". *Antonie van Leeuwenhoek* V. 74, n° 1-3, (October 1998), 59–70.
50. Cooper, D. G. et Paddock, D. A., "Production of biosurfactants from *Torulopsis bombicola*" *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 48, n° 4, (October 1984), 173
51. Hommel, R.K., "Formation and function of biosurfactant for degradation of water insoluble substrates". In: Ratledge, C. (Ed.). *Biochem. Microbial degradat* Dordrecht, Boston. Kluwer Acad. Publis., (1994), 63-87
52. Hu, Y. et Ju, L.K., "Purification of lactonic sophorolipids by crystallization". *J Biotechnol.*, V. 87, n° 3, (May 2001), 263–272.
53. Arima, K., Kakinuma, A. et Tamura, G., "Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterisation and its inhibition of fibrin clot formation". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, V. 31, n° 3, (May 1968), 488–494.
54. McInerney, M.J., Javaheri, M. et Nagle, D.P., "Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2.I.J". *Microbiol. Biotechnol.*, V. 5, n° 1, (September 1990), 95–102.
55. Cirigliano, M.C. et Carman, G.M., "Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica* . " *Appl. Environ. Microbiol.* V. 50, n° 4, (October 1985), 846–850
56. Kappeli, O. et Finnerty, W. R., "Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane grown *Acinetobacter*". *J. Bacteriol.*, V. 140, n° 2, (November 1979), 707-712
57. Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C. et Gutinck, D.L., "Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties". *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 37, n° 3, (March 1979), 402–408
58. Zosim, Z., Guntick, D. L. et Rosenberg, E., "Properties of hydrocarbon in water emulsion". *Biotechnol. Bioeng.*, V. 24, n° 1, (October 1982), 281– 292
59. Cirigliano, M.C et Carman, G.M., "Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipodytica*". *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 48, n° 4, (October 1984), 747–750
60. Fatako, D.M. et Novak, J.T., "Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbon". *Wat. Environ. Resea.*, V. 64, n° 1, (October 1992), 163-169.
61. Pereira JFB, Gudiña EJ, Costa R, Vitorino R, Teixeira JA, Coutinho JAP, Rodrigues LR (2013), Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* 111 (2013) 259-268.
62. Cameotra SS, Makkar RS (2004), "Recent applications of biosurfactants as biological And immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology* 7: 262-266
63. Moura de Luna J, Sarubbo L and de Campos-Takaki GM (2009) . , A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52 (4):785-793.
64. Senthilkumar M, Swarnalakshmi K, Govindasamy V, Lee YK, Annapurna K (2009) . , Biocontrol Potential of Soybean Bacterial Endophytes Against Charcoal Rot Fungus, *Rhizoctonia Bataticola*. *Current Microbiology* 58: 288-293
65. Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK and Sivachidambaram P (2008). , Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science* 94: 736-747.

66. Wang M, You S, Zhang S, Qi W, Liu Z, Wu W, Su R, He Z (2013)., Purification, characterization, and production of β -mannanase from *Bacillus subtilis* TJ-102 and its application in gluco-mannooligosaccharides preparation. *European Food Research and Technology* 237: 399-408.
67. Zennati, B., Chebbi, A., Badis, A., Eddouaouda, K., Boutoumi, H., El Hattab, M., Hentati, D., Chelbi, M., Sayadi, S., Chamkha, M., Franzetti, A. « A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement ». *Ecotoxicol Environ Saf* (2018). 154 100-107
68. Eddouaouda K., Mnif S., Badis A., Ben Younes S., Cherif S., Ferhat S., Mhiri N., Chamkha M. and Sayadi S. , “Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on bioremediation of hydrocarbons contaminated sites”. *Journal of Basic Microbiology*. (2012), V. 52 (4), pp. 408 – 418.
69. Briandet R, Fechner L, Naïtali M, Dreanno C., « Biofilms, quand les microbes s’organisent ». Editions Quae. (2012). P : 164. ISBN 2759217647, 9782759217649.
70. Alain B., « Microbiochimie et alimentation ». (2012).Educagri Editions. P: 146.
71. Bodour, A.A., Drees, K.P., Maier, R.M., “Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils”. *Appl. Environ. Microbiol.* (2003) 69, 3280-3287
72. Konishi M, Yoshida Y, Horiuchi J., “Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate médium. *J Biosci Bioeng*”. (2015); 119(3):317–322.
73. Mulligan C.N., "Environmental application for biosurfactants", *Environmental Pollution*, 133, (2005), 183 - 198.
74. Rouse J., Sabatini D., Suflita J. and Harwell J., "Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds", *Criti. Rev. Environ. Sci. Technol.* 24, (1994), 325 - 370.
75. Mohan P.K., Nakhla G. and Yunful E.K., "Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions", *Water Research*, 40,(2006), 533 - 540.
76. Velikonja J. and Kosaric N., "Biosurfactant in food application", In N. Kosaric (Ed), New York: Marcel Dekkar. *Biosurfactant :Production, properties and applications*, (1993). 419 - 449.
77. Cooper D.G. and Paddock D.A., "Torulopsis petrophilum and surface activity", *Applied and Environmental Microbiology*, 46, (1983), 1426 – 1429.
78. Panagoda G.J., Ellepola A.N. and Samaranayake L.P., "Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity", *Mycoses*, 44, (2001), 29 -35.
79. Singleton D.R., Furlong M.A., Rathbun S.L. and Whitman W.B., "Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67,(2001), 4374 - 4376.
80. Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savage K.N., Knapp R.M. and McInerney M.J., "Comparison of Methods to Detect Biosurfactant Production by Diverse Microorganisms", *Journal Microbiological Methods*. 56,(2004), 339 - 347.
81. Moran A.C., Martinez M.A. and Sineriz F., "Quantification of Surfactin in Culture

- Supernatant by Hemolytic Activity", *Biotechnol Lett.* 24,(2002), 177 - 180.
82. Johnson M.K. and Boese-Marrazzo D., "Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*", *Infect. Immun.* 29 (3), (1980), 1028 – 1033.
 83. Huszcza E, Burczyk B (2003) Biosurfactant Production by *Bacillus coagulans*. *Journal of Surfactants and Detergents* 6: 61-64.
 84. Cao X-H, Liao Z-Y, Wang C-L, Yang W-Y, Lu M-F (2009) Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 373-379.
 85. Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1323-1336.
 86. Guerra-Santos, L.H., Kapelli, O. et Fiechter, A., "Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors' '. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (September 1986), V. 24, n° 6, 443-448.
 87. Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S. et Khamis, A., "Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus bacterium*". *World J. Microbiol. Biotechnol.*, V. 7, n° 1, (October 1991a), 53–61.
 88. Sylatk, C., Lang, S., Matulovic, U. et Wagner, F.Z., "Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* sp". *DSM 2874. Z. Naturforsch.*, V. 40, n° 1-2, (February 1985), 61–67.
 89. Saharan BS, Sahu RK, Sharma D (2011). , A review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal* 29: 1-14.
 90. Peypoux F, Bonmatin J-M, Labbeh H, Grangemardi I, Das BC, Ptak M, Wallach J, Michel G (1994) ., [Ala4] Surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. *European Journal of Biochemistry* 224: 89-96.
 91. Karanth NGK, Deo PG, Veenanadig NK (1999). , Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current science* 77: 116-126.
 92. Hommel RI, Huse K (1993). , Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. *Biotechnology Letters* 15: 853-858.
 93. Čipinyté V, Grigiskis S, Šapokaitė D, Baškys E (2011). , Production of biosurfactant by *Arthrobacter* sp. N3, a hydrocarbon degrading bacterium. *Proceedings of the 8th International Scientific and Practical Conference; Rēzeknes Augstskola, Rēzekne, RA Izdevniecība* 1: 68-75.
 94. Suwansukho P, Rukachisirikul V, Kawai F, H-Kittikun A (2008) . , Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 30: 87-93.
 95. Amaral PFF, Coelho MAZ, Marrucho IM, Coutinho JAP (2010) Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. In: *Biosurfactants*. Sen, R. (ed.), Springer Science 236-249.
 96. Abushady HM, Bashandy AS, Aziz NH, Ibrahim HMM (2005) . , Molecular Characterization of *Bacillus subtilis* Surfactin Producing Strain and the Factors Affecting its Production. *International Journal of Agriculture and Biology* 3: 337-344.

97. Huszcza E, Burczyk B (2003). , Biosurfactant Production by *Bacillus coagulans*. *Journal of Surfactants and Detergents* 6: 61-64.
98. Ohno O, Ikeda Y, Sawa R, Igarashi M, Kinoshita N, Suzuki Y, Miyake K, Umezawa K (2004). , Isolation of Heptadepsin, a Novel Bacterial Cyclic Depsipeptide that Inhibits Lipopolysaccharide Activity. *Chemistry & Biology* 11: 1059-1070.
99. Parra, J.L., Manresa, M.A., Robert, M.E., Comelles, F. et Bosch, M.P., "Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants" ' . *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V. 66, n° 1, (January 1989), 141-145.
100. Reiling, H.E., Thanei-Wyss, U., Guerra-Santos, L.H., Hirt, R., Kappeli, O. et Fiechter, A., "Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*". *Appl. Environ. Microbiol.* V. 51, n° 5, (May 1986), 985-989.
101. Banat I.M., Satpute S.K., Cameotra S.S., Patil R and Nyayanit N.V. « Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production ». *Frontiers in Microbiology*. (2014). 5: 1-18.
102. Bognolo G. , "Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces*" A: *Physico-Chemical and Engineering Aspects*, (1999) 152, (1-2), 41-52.
103. Van Dyke M.I., Couture P., Brauer M., Lee H. et Trevors J.T. "Pseudomonas aeruginosa UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil", *Can. J. Microbiol.*, (1993). 39, 1071-1078
104. Fiechter A., "Biosurfactants: moving towards industrial application", *Tibtech*, (1992). 10, 3-12.
105. Sheldon, R.A., Woodley, J.M. 2017., *Role of biocatalysis in sustainable chemistry*. *Chem Rev*, 118(2), 801-83.
106. Sajid, M., McKerrow, J.H. 2002. , Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitol*, 120(1), 1-21.
107. Mukherjee, A.K., Adhikari, H., Rai, S.K. 2008. , Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Bioch Eng J*, 39(2), 353-361.
108. Reddy, L., Wee, Y.-J., Yun, J.-S., Ryu, H.-W. 2008. , Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour Technol*, 99(7), 2242-2249.
109. Wilkesman, J., Kurz, L. 2009., Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents. *Rec Patents Biotech*, 3(3), 175-184.
110. Rao, M.B., et al., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998. 62(3): p. 597-635.
111. Gupta, R., Q.K. Beg, and P. Lorenz., Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002. 59(1): p. 15-32.
112. Beg, Q. and R. Gupta, Purification and characterization of an oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenis*. *Enzyme Microb. Technol.*, 2003. 32: p. 294-304.
113. Maurer, K.-H., Detergent proteases. *Current opinion in Biotechnology*, 2004. 15(4): p. 330-334.
114. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol Biol Rev*, 62(3), (1998a) 597-635.

115. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(3), (1998b) 597-635.
116. Azarkan, M., Garcia-Pino, A., Dibiani, R., Wyns, L., Loris, R., Baeyens-Volant, D. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a protease inhibitor from the latex of *Carica papaya*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 62(Pt 12), (2006) 1239-42.
117. Taussig, S.J., Batkin, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. *J Ethnopharmacol*, 22(2), (1988) 191-203.
118. Brandelli, A., Daroit, D.J., Riffel, A., Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85(6), (2010) 1735-50.
119. Chitpinityol, S., Goode, D., Crabbe, M.J., Studies on the binding of alpha-crystallin to recombinant prochymosins and chymosin. *Mol Vis*, 4, (1998) 1.
120. Kappeler, S.R., van den Brink, H.J., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhán, Z., Hansen, E.B., Johansen, E., Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem Biophys Res Commun* 342(2), (2006) 647-54.
121. Derkx, F.H., Bouma, B.N., Schalekamp, M.A., Prorenin-renin conversion by the contact activation system in human plasma: role of plasma protease inhibitors. *J Lab Clin Med*, 103(4), (1984) 560-73.
122. Takaoka, M., Takenobu, Y., Miyata, Y., Ikegawa, R., Matsumura, Y., Morimoto, S., Pepsin, an aspartic protease, converts porcine big endothelin to 21-residue endothelin. *Biochem Biophys Res Commun*, 166(1), (1990) 436-42.
123. Brattsand, M., Egelrud, T. Purification., molecular cloning, and expression of a humanstratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Bi Chem*, 274(42), (1999) 30033-40.
124. Wysocka, M., Spichalska, B., Lesner, A., Jaros, M., Brzozowski, K., Legowska, A., Rolka, K., Substrate specificity and inhibitory study of human airway trypsin-like protease. *Bioorg Med Chem*, 18(15), (2010) 5504-9.
125. Johnson, D.A., Travis, J. , Rapid purification of human trypsin and chymotrypsin I. *Ana Biochem*, 72, (1976) 573-61
126. Agasthya, A.S., Sharma, N., Mohan, A., Mahal, P., Isolation and molecular characterisation of alkaline protease producing *Bacillus thuringiensis*. *Cell Biochem Biophys*, 66(1), (2013) 45-51
127. Bezawada, J., Yan, S., Tyagia, R.D., Surampalli, R.Y., Comparison of protease activities in different *Bacillus licheniformis* strains using wastewater sludge and synthetic soy medium as raw material. *Environ Technol*, 31(1), (2010) 63-72
128. Agasthya, A.S., Sharma, N., Mohan, A., Mahal, P., Isolation and molecular characterisation of alkaline protease producing *Bacillus thuringiensis*. *Cell Biochem Biophys*, 66(1), (2013) 45-51.
129. Agrahari, S., Wadhwa, N., Isolation and characterization of feather degrading enzymes from *Bacillus megaterium* SN1 isolated from Ghazipur poultry waste site. *Prikl Biokhm Mikrobiol*, 48(2), (2012) 199-205.
130. Banik, R.M., Prakash, M., Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiol Res*, 159(2), (2004) 135-40.
131. Deivasigamani, B., Alagappan, K.M., Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins. *J Environ Biol*, 29(6), (2008) 933-6.

132. Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., Hadj Ali, N., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S., Nasri, M., Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiol Res*, 163(3), (2008) 299-306.
133. Tronchin, G., Esnault, K., Sanchez, M., Larcher, G., Marot-Leblond, A., Bouchara, J.P. Purification and partial characterization of a 32-kilodalton sialic acid-specific lectin from *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 70(12), (2002) 6891-5.
134. Hajji, M., Hmidet, N., Jellouli, K., Vallaes, T., Nasri, M., Sellami-Kamoun, A. Gene cloning and expression of a detergent stable alkaline protease from *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochem*, 45(10), (2010) 1746-52.P
135. Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M., Gharsallah, N., Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochem*, 42(5), (2007) 791-7.s
136. Boyce, A., Walsh, G., Identification of fungal proteases potentially suitable for environmentally friendly cleaning-in-place in the dairy industry. *Chemosphere*, 88(2), (2012) 211-8.
137. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>.
138. Cavasin, M.A., Rhaleb, N.-E., Yang, X.-P., Carretero, O.A. 2004. , Prolyl oligopeptidase is involved in release of the antifibrotic peptide Ac-SDKP. *Hypertension*, 43(5), 1140-1145
139. Walsh, P.N., Ahmad, S.S. 2002., Proteases in blood clotting. *Essays in Biochem*, 38, 95-112.
140. Van der Hoorn, R.A. 2008., Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 191-223
141. Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A. 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol Biotechnol*, 44(2), 211.
142. Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 23(4), 411-456.
143. Yang, J., Quail, J.W. 1999. Structure of the *Rhizomucor miehei* aspartic proteinase complexed with the inhibitor pepstatin A at 2.7 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Bio Crystallogr*, 55(3), 625-630.l
144. Souza, P.M.d., Bittencourt, M.L.d.A., Caprara, C.C., Freitas, M.d., Almeida, R.P.C.d. Silveira, D., Fonseca, Y.M., Ferreira Filho, E.X., Pessoa Junior, A., Magalhães, P.O. 2015. A, biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian J Microbiol*, 46(2), 337-346.
145. Barrett, A.J., Woessner, J.F., Rawlings, N.D. 2012. , Handbook of proteolytic enzymes. Elsevier.
146. Ekici, Ö.D., Paetzel, M., Dalbey, R.E. 2008., Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Science*, 17(12), 2023-2037.
147. Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P. 2002a., Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiol Biotechnol*, 59(1), 15-32.
148. Antranikian G., Vorgias C.E., Bertoldo C. 2005., Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. in: *Marine Biotechnol*, Springer, pp. 219-262
149. Toplak A., Nuijens T., Quaedflieg P.J.L.M., Wu B., Janssen D.B. Peptide synthesis in neat organic solvents with novel thermostable proteases., *Enzyme Microb Technol*, 73-74 (2015) 20-28.

150. Lin, X., Lee, C.G., Casale, E.S., Shih, J.C. 1992., Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (10), 3271-3275.
151. Burlini, N., Magnani, P., Villa, A., Macchi, F., Tortora, P., Gueritore, A. 1992., A heat-stable serine proteinase from the extreme thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1122(3), 283-292.
152. Tamura, N., Lottspeich, F., Baumeister, W., Tamura, T. 1998. , The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. *Cell*, 95(5), 637-648.
153. Khan, A.R., Nirasawa, S., Kaneko, S., Shimonishi, T., Hayashi, K. 2000., Characterization of a solvent resistant and thermostable aminopeptidase from the hyperthermophilic bacterium, *Aquifex aeolicus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1), 83-88.
154. Tsunasawa, S., Nakura, S., Tanigawa, T., Kato, I. 1998., Pyrrolidone carboxyl peptidase from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: cloning and overexpression in *Escherichia coli* of the gene, and its application to protein sequence analysis. *Journal of Biochemistry*, 124(4), 778-783.
155. Fusek, M., Lin, X. L., Tang, J. 1990. , Enzymic properties of thermopsin. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 1496-1501
156. Benkiar, A., Zraï-Jaouadi, N., Badis, A., Rebzani, F., Boulkour-Touioui, S., Rekik, H., Naili, B., Ferradji, F.Z., Bejar, S., Jaouadi, B. 2013., Biochemical and molecular characterization of a thermo-and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 83, 129-138.
157. Ben Elhouli, M., Zraï-Jaouadi, N., Rekik, H., Bejar, W., Boulkour-Touioui, S., Hmidi, M., Badis, A., Bejar, S., Jaouadi, B. 2015. , A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 871-882.
158. Dudhgara, P.R., Sunil, B., 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.
159. Hamada, J.S. 1992. , Effects of heat and proteolysis on deamidation of food proteins using peptidoglutaminase. *J Agricul Food Chem*, 40(5), 719-723.
160. Wang, J.-s., Wei, Z.-y., Li, L., Bian, K., Zhao, M.-m. 2009., Characteristics of enzymatic hydrolysis of thermal-treated wheat gluten. *J cereal sci*, 50(2), 205-209.
161. Benchehra, H., Haddad, D., Madani, K.E. 2013, Extraction et caractérisation des composés phénoliques de *Myrtus communis* L en vue de leur incorporation dans la margarine.
162. Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A. 2008, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4(2), 151-175.
163. Nitschke M, Costa SGVAO (2007), Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science and Technology* 18: 252-259.d
164. Pacwa-Plociniczak M, Plaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS (2011), Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 633-654.f.

165. Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK and Sivachidambaram P (2008), Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science* 94: 736747.
166. Kanlayavattanakul M, Lourith N (2010) , Lipopeptides in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science* 32: 1-8.l.
167. Bafghi MK and Fazelipour MH (2012), Application of Rhamnolipid in the Formulation of a Detergent. *Journal of Surfactants and Detergent* 15 (6): 679-684.
168. Sajna KV, Sukumaran RK, Jayamurthy H, Reddy KK, Kanjilal S, Prasad RBN, Pandey A (2013), Studies on biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 and their potential application as laundry detergent additives. *Biochemical Engineering Journal* 78: 85-92.
169. Nguyen T.T., Youssef N.H., McInerney M.J., Sabatini D.A. Rhamnolipid, biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Res.* 2008;42:1735–1743.
170. Mulligan CN, Gibbs BF., Types, production and applications of biosurfactants. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.* 2004;1:31–55.
171. Déziel E., Paquette G., Villemur R., Lépine F., Bisaillon J.G. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62:1908–1912.
172. Bai G.Y., Brusseau M.L., Miller R.M. , Biosurfactant enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *J. Cont. Hydrol.* 1997;25:157–170.
173. HAINES, Roland J., *Ferme à la fourchette une stratégie intégrale pour la salubrité des viandes en ontario*. Toronto, Imprimeur de la Reine pour l’Ontario, 2004. 654p. ISBN : 0- 7794- 6428- 1.
174. Bachi, O.E.K., «la valorisation de quelques plantes du gardind’épuration de station du vieux ksar Témacin». Mémoire présenté en vue de l’obtention du diplôme de magister. Ouargla, 105p. (2010).
175. <http://www.aide.be/accueil/epuration/la-pollution-des-eaux>.
176. Eckenfelder W.W, (1982), *Gestion des eaux usées urbaines et industrielles*. Ed. Lavoisier. Paris, 503p.
177. Franke-Whittle, I.H. & Insam, H., Treatment alternatives of slaughterhouse wastes, and their effect on the inactivation of different pathogens: a review. *Critical reviews in microbiology*, (2013). 39(2): p.139–51.
178. Gabriel I, Mallet S, and Sibille P., The digestive microflora of poultry. Factors of variation and consequences for the animal. *INRA. Anim*, 2005. 18(5): p.309-322.
179. <https://www.franceenvironnement.com/sous-rubrique/traitement-des-eaux-de-lavage..>
180. Eddouaouda.k ., «Étude du potentiel biodegradatif de souches isolées du sol de Hassimessaoud contaminé par du pétrole : criblage, biodégradation de HAP et production de biosurfactant». Thèse de doctorat en chimie industrielle. BLIDA. Université SAAD DAHLAB – BLIDA, (2012).

181. RaziqaHadjidj et al., Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114: p.1033-1048.
182. www.FreedoniaGroup.com.
183. Kumar, A., Sharma, J., Mohanty, A.K., Grover, S., Batish, V.K. 2006., Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Comp Biochem Physio Biochem Mol Biol*, 145(1), 108-113l
184. Kumar, C.G., Takagi, H. 1999, Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv*, 17(7), 561-594.
185. Ghani, M. 2001, Protein-containing granules and granule formulations, Vol. Patent WO01/29170 A1.
186. Nardello-Rataj, V., Ho Tan Tai, L., Aubry, J.-M. 2003, Les lessives en poudre: Un siècle d'innovations pour éliminer les taches. *Actualité chimique* 3-10.
187. Mienda, B., Yahya, A., Galadima, I., Shamsir, M. 2014, An overview of microbial proteases for industrial applications. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, 5(1), 388-396.
188. Olsen, H.S., Falholt, P. 1998, The role of enzymes in modern detergency. *Journal of Surfactants and Detergents*, 1(4), 555-567.f
189. Salihi, A., Asoodeh, A., Aliabadian, M. 2017. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International journal of biological macromolecules*, 94, 827-835.
190. Maurer, K.-H. 2004, Detergent proteases. *Current Opinion Biotechnol*, 15(4), 330-334.
191. Jain, D., Pancha, I., Mishra, S.K., Shrivastav, A., Mishra, S. 2012, Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: a potential additive for laundry detergents. *Bioresour Technol*, 115, 228-36.
192. Mukherjee, A.K., Adhikari, H., Rai, S.K. 2008., Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperat cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of a enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*, 39(2), 353-361.
193. Guo, C., Ma, Q., Zhang, L. 2008. , Spatio-temporal saliency detection using phase spectrum of quaternion fourier transform.
194. Godfrey, T. and S. West, Textiles., *Industrial enzymology*, 1996: p. 360-371.
195. Gupta, R., et al., Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 1999. 21(2): p. 135-138.
196. Bech, L.M., et al., Oxidation stable detergent enzymes. 1993, Google Patents
197. Kumar, C., Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Letters in applied microbiology*, 2002. 34(1): p. 13-17.
198. Kravetz, L. and K. Guin, Effect of surfactant structure on stability of enzymes formulate into laundry liquids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1985. 62(5): p. 943-949d
199. Crutzen, A. and M. Douglass, Detergent Enzymes: A challenge! *Surfactant science series*, 1999. 82: p. 639-690.
200. Patkar, S., et al., Purification of two lipases from *Candida antarctica* and their inhibito by various inhibitors. *Indian journal of chemistry. Sect. B: Organic*

- chemistry, including medical chemistry, 1993. 32(1): p. 76-80.
201. Delaney, B., et al., Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food and Chemical Toxicology*, 2008. 46: p. S71-S97.
 202. Aehle, W., et al., Rational protein engineering and industrial application: Structurprediction by homology and rational design of protein-variants with improved 'washin performance'—the alkaline protease from *Bacillus alcalophilus*. *Journal of biotechnology*, e.
 203. Oberoi, R., et al., Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2001. 17(5): p. 493-497.
 204. Showell, M., Enzymes, detergent. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, 1999.
 205. Banik, R.M., Prakash, M. 2004., Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological research*, 159(2), 135-140.
 206. Tindbaek N., Svendsen A., Oestergaard P.R., Draborg H. Engineering a substrate specific cold-adapted subtilisin. *Protein Eng Des Sel*, 17 (2004) 149-156.
 207. Sivasubramanian, S., Manohar, B.M., Rajaram, A., Puvanakrishnan, R. 2008. Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere*, 70(6), 1015-1024.
 208. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus Nilegaonkar*, S., *cereus* MCM B326. *Bioresource Technology*, 98(6), 1238-1245. Zambare, V., Kanekar, P., Dhakephalkar, P., Sarnaik, S. 2007.
 209. Macedo, A.J., da Silva, W.O.B., Gava, R., Driemeier, D., Henriques, J.A.P., Termignoni, C. 2005. ,Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 594-596.
 210. Cai, C.G., Chen, J.S., Qi, J.G., Yin, Y., Zheng, X.D. 2008. , Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Zhejia University Science B*, 9(9), 713-720.
 211. Prakash, P., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K. 2010. , Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2: partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(7), 1909-1920.
 212. Ismail, A.M. S., Housseiny, M.M., Abo-Elmagd, H.I., El-Sayed, N.H., Habib, M. 2012. Novel keratinase from *Trichoderma harzianum* MH-20 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 70, 14-19.
 213. Paul, T., Das, A., Mandal, A., Halder, S.K., DasMohapatra, P.K., Pati, B.R., Mondal, K.C. 2014. Biochemical and structural characterization of a detergent stable alkaline serine keratinase from *Paenibacillus woosongensis* TKB2: a potential additive for laundry detergent. *Waste and Biomass Valorization*, 5(4), 563-574.
 214. Zarái Jaouadi, N., Rekik, H., Badis, A., Trabelsi, S., Belhoul, M., Yahiaoui, A.B., Aicha, H.B., Toumi, A., Bejar, S., Jaouadi, B. 2013. Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities. *PloS One*, 8(10), e76722.
 215. Gajju, H., Bhalla, T., Agarwal, H. 1996. , Thermostable alkaline protease from thermophilic *Bacillus coagulans* PB-77. *Indian Journal of Microbiology*, 36, 153-156.
 216. Joshi, S., Satyanarayana, T. 2013. , Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*.

- Bioresour Technol, 131, 76-85.
217. Atsumi, T., Ueha, T. 1983. , Protease, collagenase, fibrinolytic activities and vascular permeability of a cytoplasmic extract of *Veillonella alcalescens*, a Gram-Negative bacterium. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*, 25(3), 526-34.
 218. im, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I., Lee, S. 1996., Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2482-8.
 219. Kudrya, V., Simonenko, I. 1994., Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(5), 505-509.
 220. Suzuki, T., Moraes, T.J., Vachon, E., Ginzberg, H.H., Huang, T.T., Matthay, M.A., Hollenberg, M.D., Marshall, J., McCulloch, C.A., Abreu, M.T., Chow, C.W., Downey, G.P. 2005., Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells. *American Journal Respiratory Cell and Molecular Biology*, 33(3), 231-47
 221. Selvam, K., Vishnupriya, B. 2012. , Biochemical and molecular characterization of microbial keratinase and its remarkable applications. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 3(2).
 222. Prasong, S., Yaowalak, S., Wilaiwan, S. 2009., Characteristics of silk fiber with and without sericin component: a comparison between *Bombyx mori* and *Philosamia ricini* silks. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(11), 872-6.
 223. Smith, E.L., Markland, F.S., Kasper, C.B., DeLange, R.J., Landon, M., Evans, W.H. 1966. The complete amino acid sequence of two types of subtilisin, BPN' and Carlsberg. *Journal of Biological Chemistry*, 241(24), 5974-6.
 224. More, S., Khandelwal, H., Joseph, M., Laxman, R. 2013. Enzymatic degumming of silk with microbial proteases. *Journal of Natural Fibers*, 10(2), 98-111.
 225. Takagi, H., Kondou, M., Hisatsuka, T., Nakamori, S., Tsai, Y.C., Yamasaki, M. 1992. Effects of an alkaline elastase from an alkalophilic *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(12), 2364-2368.
 226. Wilson, S.-A., Young, O., Coolbear, T., Daniel, R. 1992. The use of proteases from extreme thermophiles for meat tenderisation. *Meat Science*, 32(1), 93-103.
 227. Neklyudov, A., Ivankin, A., Berdutina, A. 2000. Properties and uses of protein hydrolysates (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(5), 452-459.
 228. Anbu, P., Hilda, A., Gopinath, S.C. 2004. Keratinophilic fungi of poultry farm and feather dumping soil in Tamil Nadu, India. *Mycopathologia*, 158(3), 303-9
 229. Forgacs, G., Alinezhad, S., Mirabdollah, A., Feuk-Lagerstedt, E., Horvath, I.S. 2011. Biological treatment of chicken feather waste for improved biogas production. *Journal of Environmental Sciences*, 23(10), 1747-53.
 230. Rekik, H.; Zraï Jaouadi, N.; Gargouri, F.; Bejar, W.; Frikha, F.; Jmal, N.; Bejar, S.; Jaouadi, B., Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. *International Journal of Biological Macromolecules* 121 (2019)1227-1239.
 231. Zajic, J E. et Seffens, W., Biosurfactants. *CRC Crit. Rev. Biotech.*, V. 1, n° 2, (January 1984), 87-107.
 232. Yin, H., Qiang, J., Jia, Y., Ye, J., Peng, H., Qin, H., Zhang, N. et He, B., characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oilcontaining wastewater *Proc. Biochem.*, V. 44, n° 3, (March 2009), 302-308

233. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-685.
234. Hewick, R.M., et al., A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *Journal of Biological Chemistry*, 1981. **256**(15): p. 7990-7997.
235. Hunkapiller, M.W. and L.E. Hood, Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a nonprotein carrier (polybrene), and high pressure liquid chromatography. *Biochemistry*, 1978. **17**(11): p. 2124-2133.
236. Zarái Jaouadi, N.; Jaouadi, B.; Aghajari, N.; Bejar, S., The overexpression of the SAPB of *Bacillus pumilus* CBS and mutated sapB-L31I/T33S/N99Y alkaline proteases in *Bacillus subtilis* DB430: New attractive properties for the mutant enzyme. *Bioresource Technology* 105(2012) 142-51.
237. L. Vojcic, C. Pitzler, G. Körfer, F. Jakob, M. Ronny, K.H., . Maurer and U. Schwaneberg. *Advances in protease engineering for laundry detergents*. *New Biotechnology* 32 (2015) 629-634.
238. Vojcic, L.; Pitzler, C.; Körfer, G.; Jakob, F.; Ronny, M.; Maurer, K. H., Schwaneberg, U. *Advances in protease engineering for laundry detergents*. *New Biotechnology* 6 (2015) 629-634.
239. Singh A.K., Chhatpar H.S., Purification, characterization and thermodynamics of antifungal protease from *Streptomyces* sp. A6. *J Basic Microbiol*, 2010. 51(4): p. 424-32.
240. <http://www.sonatrach-dz.com/nos-activitees.html>
241. Francy, D.S., Thomas, J.M., Raymond, R.L. et Ward, C.H., “Emulsification of hydrocarbon by surface bacteria”. *J Industrial Microbiol*, V. 8, n° 4, (November 1991), 237-245.
242. Touiou, S.B., et al., Purification and biochemical characterization of two detergent-stable serine alkaline proteases from *Streptomyces* sp. strain AH4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015. **31**(7): p. 1079-1092.
243. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254.
244. Ferhat, S., « La production de biosurfactants par des souches de *Brevibacterium* Et *Ochrobactrum* isolées localement à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut », Blida ,(Novembre 2012).
245. Claus, D. and R.C.W. Berkeley, *Genus Bacillus* 1986: In : P.H.A. Sneath et al. (eds.), *Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. Vol. 2. Cohn 1986, pp. 1105-1139.
246. Gurtler, V. and V. Stanisich, New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 1996. 142: p. 3-16.
247. Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. ET Nabi, I., “Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*”. *Desalin*, V. 223, n° 1 et 3, (March 2008), 143-151.
248. Eddouaouda K., Mnif S., Badis A., Ben Younes S., Cherif S., Ferhat S., Mhiri N., Chamkha M. and Sayadi S. “Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on bioremediation of

- hydrocarbons contaminated sites". *Journal of Basic Microbiology*. (2012), V. 52 (4), pp. 408 – 418.
249. Khelouia, L.; «Étude d'une production d'un biosurfactant issu d'une souche bactérienne thermophile isolée localement à partir d'une région polluée par les hydrocarbures : Application », Blida, (Juin 2022).
 250. Brown M.J., "Biosurfactants for cosmetic applications", *International Journal of Cosmetic Science*, 13, (1991), 61 - 64.
 251. Makkar, R.S. and Cameotra, S.S., "An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications", *Applied and Microbiological Biotechnology*, 58,(2002), 428 - 434.
 252. Souissi, N., et al., Preparation and use of media for protease-producing bacterial strains based on by-products from Cuttlefish (*Sepia officinalis*) and wastewaters from marine-products processing factories. *Microbiol Res*, 2008. **163**(4): p. 473-80.
 253. Ku, T.W., R.L. Tsai, and T.M. Pan, A simple and cost-saving approach to optimize the production of subtilisin NAT by submerged cultivation of *Bacillus subtilis* natto. *J Agric Food Chem*, 2009. **57**(1): p. 292-6.
 254. Chu, I.-M., C. Lee, and T.-S. Li, Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992. **14**(9): p. 755-761.
 255. Moon, S.H. and S.J. Parulekar, A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and bioengineering*, 1991. **37**(5): p. 467-483.
 256. Sen, S. and T. Satyanarayana, Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40. *Indian Journal of Microbiology*, 1993. **33**: p. 43-43.
 257. Ghorbel-Frikha, B., et al., Production and purification of a calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2005. **32**(5): p. 186-194.
 258. Wandersman, C., et al., Characterization of *Erwinia chrysanthemi* extracellular proteases: cloning and expression of the protease genes in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 1987. **169**(11): p. 5046-5053.
 259. Schechter, I. and A. Berger, On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1967. **27**(2): p. 157-162.
 260. Kristinsson, H.G. and B.A. Rasco, Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 2000. **36**(1): p. 131-139.
 261. Zwickl, P., F. Lottspeich, and W. Baumeister, Expression of functional *Thermoplasma acidophilum* proteasomes in *Escherichia coli*. *FEBS letters*, 1992. **312**(2-3): p. 157-160.

262. Jaouadi, B., et al., Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Biochimie*, 2008. **90**(9): p. 1291-1305.
263. Elhoul, M.B., et al., A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650. *International journal of biological macromolecules*, 2015. **79**: p. 871-882.
264. Mechri, S., et al., Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest. *International journal of biological macromolecules*, 2017. **94**(Part A): p. 221-232.
265. Kumar, C., Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Letters in applied microbiology*, 2002. **34**(1): p. 13-17.
266. Waghmare, G.V., M.D. Vetel, and V.K. Rathod, Ultrasound assisted enzyme catalyzed synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate. *Ultrasonics sonochemistry*, 2015. **22**: p. 311-316.
267. Beg, Q.K., R. Saxena, and R. Gupta, Kinetic constants determination for an alkaline protease from *Bacillus mojavensis* using response surface methodology. *Biotechnology and bioengineering*, 2002. **78**(3): p. 289-295.
268. Oberoi, R., et al., Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2001. **17**(5): p. 493-497
269. Bouacem, K.; Bouanane-Darenfed, A.; Laribi Habchi, H.; Ben Elhoul, M.; Hmida-Sayari, A.; Hacene, H.; Ollivier, B.; Fardeau, M. L.; Jaouadi, B.; Bejar, S., Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. *International Journal of Biological Macromolecules* 81 (2015) 299-307.
270. Beg, Q.; Gupta, R. , Purification and characterization of an oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003) 294-304.
271. Jeong, Y.K., et al., Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2001. **17**(1): p. 89-92.
272. Habbeche, A., et al., Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2014. **117**(4): p. 413-421.
273. Vieille, C. and G.J. Zeikus, Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2001. **65**(1): p. 1-43.
274. Shirley, B.W. and H.M. Goodman, An *Arabidopsis* gene homologous to mammalian and insect genes encoding the largest proteasome subunit. *Molecular and General Genetics MGG*, 1993. **241**(5): p. 586-594.

275. Haddar, A., et al., Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojaviensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technology*, 2009. **100**(13): p. 3366-3373.
276. El Hadj-Ali, N., et al., Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007. **40**(4): p. 515-523.
277. Jellouli, K., et al., Molecular and biochemical characterization of an extracellular serine-protease from *Vibrio metschnikovii* J1. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2009. **36**(7): p. 939-948.
278. Odenwald, W.F. and S.J. Morris, Identification of a second synexin-like adrenal medullary and liver protein that enhances calcium-induced membrane aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1983. **112**(1): p. 147-154
279. Elhoul, M.B., et al., Biochemical and molecular characterization of new keratinolytic protease from *Actinomyces viridilutea* DZ50. *International journal of biological macromolecules*, 2016. **92**: p. 299-315.
280. Bouacem, K., et al., Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. *International journal of biological macromolecules*, 2015. **81**: p. 299-307.
281. Steuer, C., et al., Optimization of Assay Conditions for Dengue Virus Protease: Effect of Various Polyols and Nonionic Detergents. *Journal of biomolecular screening*, 2009. **14**(9): p. 1102-1108.
282. Joo, H.S. and C.S. Chang, Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. *Journal of applied microbiology*, 2005. **98**(2): p. 491-497.
283. Omrane Benmradi, M.; Mechri, S.; Zraï Jaouadi, N.; Ben Elhoul, M.; Rekik, H.; Sayadi, S.; Bejar, S.; Kechaou, N.; Jaouadi, B. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. *BMC Biotechnology* (2019) 19:43.
284. Mechri, S.; Kriaa, M.; Ben Elhoul Berrouina, M.; Omrane Benmradi, M.; ZraïJaouadi, N.; Rekik, H.; Bouacem, K.; Bouanane-Darenfed, A.; Chebbi, A.; Sayadi, S.; Chamkha, M.; Bejar, S.; Jaouadi, B. Optimized production and characterization of a detergent-stable protease from *Lysinibacillus fusiformis* C250R. *International Journal of Biological Macromolecules* 101 (2017) 383-397
285. Javed, S.; Azeem, F.; Hussain, S.; Rasul, I.; Siddique, M. H.; Riaz, M.; Afzal, M.; Kouser, A.; Nadeem, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 132(2017) 23-34.
286. Kim, J., J.W. Grate, and P. Wang, Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, 2006. **61**(3): p. 1017-1026.
287. Radha, S.; Gunasekaran, P. Sustained expression of keratinase gene under *PxylA* and *PamyL* promoters in the recombinant *Bacillus megaterium* MS941. *Bioresource Technology* 99 (2008) 5528-5537.

288. Venugopal, M.; Saramma, A. V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry* 41 (2006) 1239-1243.
289. Singh, J.; Batra, N.; Sobti, R. C. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry* 36 (2001) 781-785.
290. Annamalai, N., M.V. Rajeswari, and T. Balasubramanian, Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveyuensis* CAS 5 using marine wastes. *Food and Bioproducts Processing*, 2014. **92**(4): p. 335-342.
291. Kirk, O., T.V. Borchert, and C.C. Fuglsang, Industrial enzyme applications. Current opinion in biotechnology, 2002. **13**(4): p. 345-351.
292. Jaouadi, B., et al., Excellent laundry detergent compatibility and high dehairing ability of the *Bacillus pumilus* CBS alkaline proteinase (SAPB). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2009. **14**(4): p. 503-512.
293. Joo, H.S. and C.S. Chang, Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. *Journal of applied microbiology*, 2005. **98**(2): p. 491-497.
294. Gençkal, H. and C. Tari, Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006. **39**(4): p. 703-710.
295. Persson A, Österberg E et Dostalek M. 1988., Biosurfactant Production by *Pseudomonas Fluorescens*378: Growth and Product Characteristics. *Applied microbiology and Biotechnology*. ,29 (1): 1–4.
296. J. Rodier.1996. ,« l'analyse de l'eau naturelle, eau résiduaires, eau de mer », 8èmedition, Dénod. (Paris). 1383p.
297. Gnagne T et Brissaud F. 2003. Étude des potentialités d'épuration d'effluents d'abattoirpar infiltration sur sable en milieu tropical . *Sud Sciences &Technologies*. 11 : 4-11.
298. Zerhouni R.A. 2003., « Flore algale des eaux usées de la ville de Fès et étude de la capacité de certaines espèces à éliminer la charge azotée, phosphatée et quelques métaux lourds (Chrome et Cadmium) ». Thèse de Doctorat Fac.Sci. Dhar El Mahraz. Fès. Université Sidi Mohamed benAbdellah, Maroc. 146p.
299. El Guamri Y, Belghyti D, El Kharrim Kh, Raweh S, Sylla I, Et Ben Yakhlef M.2008 ., Étude physico-chimique des eaux usées brutes de l'abattoir municipal de Kénitra (Maroc) en vue dela mise en oeuvre d'untraitement convenable .*Sud Sci. Technol.*16 : 36-43.

ANNEXES

Annexe 1 : Matériels et produits utilisés

- a) **Incubateur (SHiker)** : c'est un incubateur électrique qui fonctionne sous agitation continue avec une température maximale de 65 °C.
- b) **Etuve** : appareil de séchage de température maximale de 120°C.
- c) **pH-mètre** : de type INOLAB muni d'une cellule WTW Sen Tix 41 qui peut mesurer le pH de 1 à 14 à une température de 0 à 80°C.
- d) **Autoclave** : C'est un autoclave électrique permettant de stériliser, par utilisation de la chaleur et de la vapeur d'eau sous pression.
- e) **Tensiomètre** (à anneau)-KRUS K6 : pour mesurer la tension superficielle.
- f) **Plaque chauffante agitateur** : pour chauffer et agiter les milieux préparés.
- g) **Bec –benzen** : utilisée pour stériliser la zone de milieux.
- h) **Spectrophotomètre FTIR-8400** : c'est un spectrophotomètre infra rouge à transformée de Fourier (FTIR) adapté aux mesures des bandes d'absorption entre 400 et 4000 cm⁻¹, de type SHIMADZU-Japon.
- i) **Microscope optique**-OPTICN :
- j) **centrifugeuse** : de type LM 312.06.DB 005001, NertZ : 230 V/50 Hz/2.8 kw.
- k) **Secoueur vortex** : utilisé pour déterminer la teneur en eau dans une substance chimique (poudre, solvant), de type METROHM 633.
- l) **Incubateur** : utilisé pour le développement des souches à 37°C et 42°C, de type LABCO.
- m) **Balance** : pour peser le produit chimique.

1. Enzymes

- a) Enzymes de restriction

Elles sont utilisées selon les instructions du fournisseur.

- b) ARNase pancréatique (ARNase)

Elle est solubilisée dans l'eau distillée à une concentration de 10 mg/mL puis traitée thermiquement pendant 15 min à 100°C. La solution refroidie est répartie en aliquotes et conservée à -20°C.

- c) Protéinase K

La protéinase K est dissoute dans l'eau distillée stérile à raison de 5 mg/mL puis elle est répartie en aliquotes 1mL et gardé à -20°C.

2. Marqueurs de taille et de masse moléculaire

Les marqueurs de taille pour ADN utilisés sont préparés par une simple digestion de l'ADN du phage Lambda (λ) par les enzymes de restriction *HincIII* ou *HincII*. On a utilisé également le marqueur de taille 1 kbp DNA Ladder.

3. Vecteur de clonage

▪ pGEM-T Easy (3015 pb) : Ce vecteur porte un gène de résistance à l'ampicilline en plus du gène *lacZ*. Il diffère du vecteur pCR 2.1 par la présence d'une dTTP à chaque extrémité 3' lui permettant le clonage des fragments PCR ayant un dATP à l'extrémité 3'. Ceci lui permet l'utilisation des amorces universelles et inverses M13 ainsi que les amorces SP6 et T7 s'hybridant de part et d'autre du site de clonage ce qui permet le séquençage de la séquence insérée.

4. Oligonucléotides

Les oligonucléotides sont utilisés dans cette étude sont représentés dans le tableau III.2. Ces amorces sont utilisées pour l'identification de la souche retenue, les amplifications d'ADN génomique (ADNg) ainsi que pour le séquençage d'ADN.

Les séquences des différents oligonucléotides utilisés dans cette étude : Pour les amplifications du gène de l'ARNr 16S (externes : Oligo D-S73 et Oligo R-S74 et internes : Oligo D-S156 et Oligo R-S157).

Tableau 1. Les séquences des différents oligonucléotides utilisés

Oligonucléotide	Séquences d'oligonucléotide	Taille (pb)	T (°C)
Oligo D-S73	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'	20	48
Oligo R-S74	5'AAGGAGGTGATCCAAGCC3'	18	51
Oligo D-S156	5'ATTCCACGTGTAGCGGTG3'	18	52
Oligo R-S157	5'ATCTCACGACACGAGCTG3'	18	52

5. Solutions et tampons

5.1. Solutions

Les solutions utilisées au cours de ce travail sont :

- Solution I : 45 mL glucos ²A e 20%, 25 mL Tris-HCl 1 M et 20 mL EDTA 0,5 M à pH 8,0 ;
- Solution II : NaOH 0,2 Net 1 % SDS (p/v) ;
- Solution III : d'acétate de potassium 3 M et d'acide acétique glacial 2 M à pH 4,8 ;
- Solution d'acide trichloracétique TCA (20 %) ;
- Réactif de Biorad pour le dosage des protéines solubles ;
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) à 10 % ;
- Solution d'acrylamide (29,2 %)/ bisacrylamide (0,8 %) ;
- Solution de coloration du gel, de bleu de Coomassie : 0,25 g bleu de Coomassie, 45 % éthanol, 45 % eau et 10 % acide acétique glacial ;
- Solution de décoloration : éthanol 20 %, eau 70 % et acide acétique 10 %.

5.2. Tampons

- Tampon A : tampon Tris-HCl 100 mM, additionné avec 5 mM CaCl₂ à pH 7,4.
- Tampon B : tampon 20 mM HEPES contenant 2 mM CaCl₂ à pH 7.
- Tampon C : tampon Tric-HCl 100 mM (7,5) contenant 2 mM.
- Tampon glycine 100 mM ;
- Tampon I: 50 mM glucose anhydre, 25 mM Tris-base et 10 mM EDTA à pH 8,0 ;
- Tampon II: 10 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA et 1% du dodécyl sulfate de sodium (SDS) à pH 8,0 ;
- TE 1 : 100 mM Tris-base et 10 mM EDTA à pH 8,0 ;
- TAE 1 : 40 mM Tris-acétate et 5 mM EDTA ;
- TBE 1 : 90 mM Tris-borate et 20 mM EDTA ;
- Tampon CaCl₂-MOPS-glucose : 100 mM CaCl₂ ; 10 mM MOPS et 0,5 % glucose ;
- Tampon acétate 100 mM ;

- Tampon Tris HCl 100 mM ;
- Tampon de dépôt : Tris-HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 1mM ; SDS 2,5 % ; β -mercaptoéthanol 5 % ; Glycérol 10 % et Bleu de bromophénol 0,05 % ;
- Tampon de migration : Tris-HCl 25 mM ; Glycine 14,4 g/l et SDS 1 % ;
- Tampon CaCl_2 -MOPS-glucose : 100 mM CaCl_2 , 10 mM MOPS et 0,5 % glucose.

Annexe 2 : Principe d'utilisation de l'ARN 16S.

En 2003, Kimura a émis le concept d'horloge "évolutionnaire" : la vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement de conséquences phénotypiques, mais elles sont étroitement corrélées avec le temps. Dans ces conditions, il est possible de construire un arbre généalogique (phylogénique) en utilisant des méthodes mathématiques et en respectant quelques règles [309].

Le principe de base consiste à comparer des gènes homologues c'est-à-dire descendant d'un ancêtre commun et ayant conservé une fonction identique au cours du temps. Le choix des séquences à comparer a posé un problème car il était difficile de trouver une molécule qui soit présente et homologue chez tous les organismes et qui présente des niveaux successifs d'information. En effet, pour comparer des organismes très éloignés il faut utiliser des séquences qui restent sensiblement conservées durant des centaines de millions d'années, tandis que la comparaison d'organismes proches requiert l'étude de séquences où des mutations se seront accumulées en quelques millions d'années.

Le séquençage des ARN 16S peut être automatisé et les données concernant ces molécules s'accumulent en permanence. L'utilité du séquençage des ARN 16S est reconnue par tous les taxonomistes mais, comme cette technique n'analyse qu'une faible partie du génome, elle ne permet pas de différencier les espèces proches les unes des autres. En revanche le séquençage des ARN 16S est très utile pour classer les bactéries dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce.

Lorsqu'il existe moins de 97% d'homologie entre les séquences des ARN 16S de deux souches, ces souches appartiennent à des espèces différentes. Par contre, si le pourcentage d'homologie est égal ou supérieur à 97%, le placement de deux souches dans une unique espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats des hybridations ADN-ADN.

Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine (dosage de protéases).

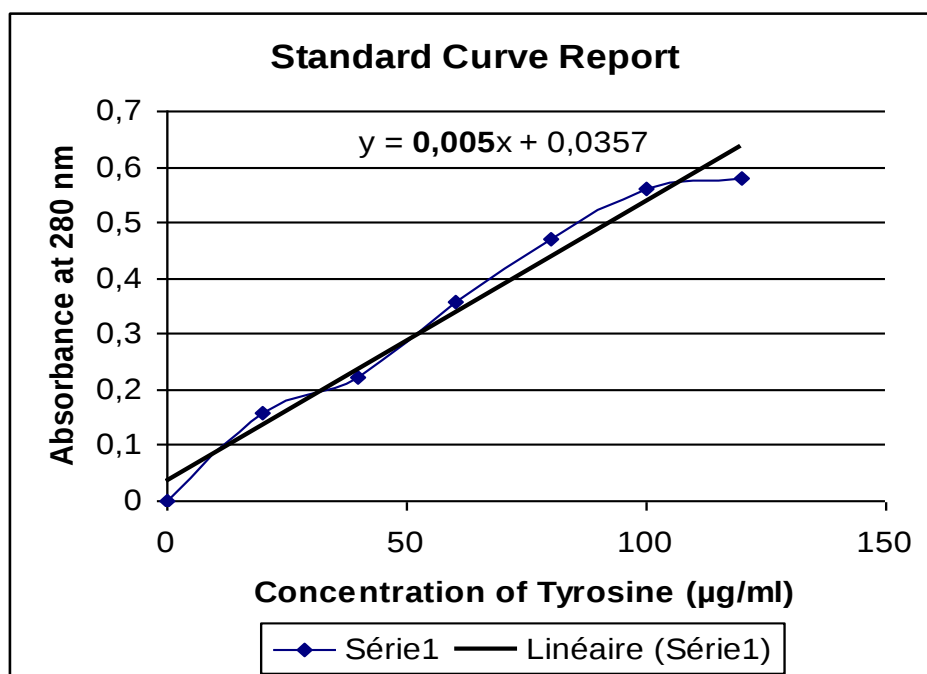
Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/ml/min dans les conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage (0-120 µg/ml) tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions. Nous en avons déduit que : 1 µg/ml de tyrosine correspond à une DO₂₈₀ de 0,0055.

$$\text{Activité (UI)} = \frac{\text{DO} \times d \times D}{T \times 0,0055}$$

Avec :

D : dilution de l'enzyme ;

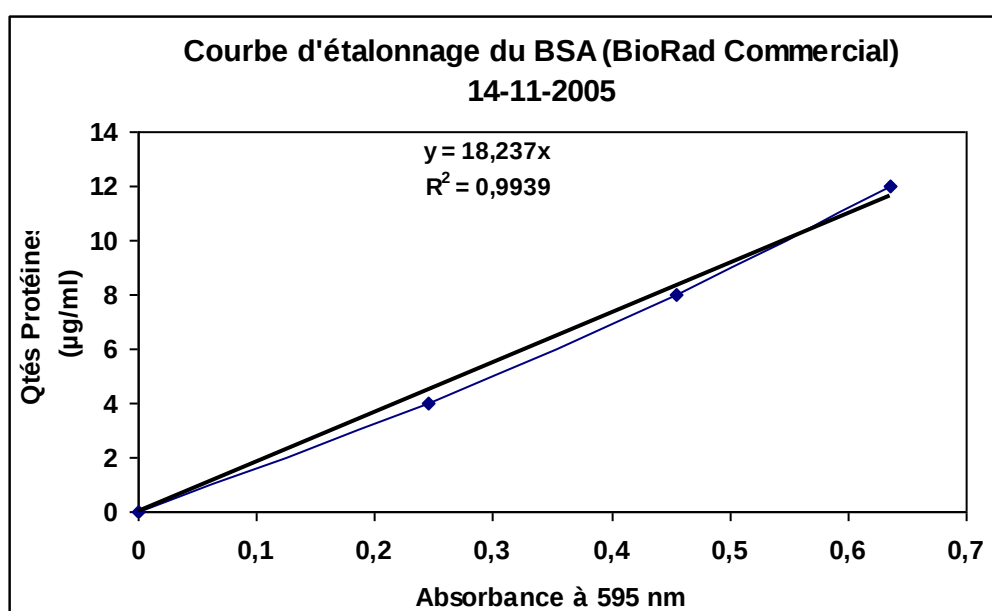
d : dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel ;



Annexe 4 : Courbe d'étalonnage du BSA (quantité de protéines).

La quantité de protéine est définie à partir de la DO_{595} . Une courbe d'étalonnage (0-14 $\mu\text{g/ml}$) BSA est réalisée dans les mêmes conditions. Nous en avons déduit que : 1 $\mu\text{g/ml}$ de BSA correspond à une DO_{595} de 18,237.

$$Q_{te} (\mu\text{l/ml}) = \frac{DO_{595}}{\text{Prised'essai}} * 18.237$$



Annexe 5 : Détermination des extrémités NH₂-terminales par la méthode d'Edman automatisée (dégradation d'Edman).

La séquence N-terminale de l'enzyme purifiée SAPNIJ est déterminée par la méthode d'Edman automatisée sur microséquenceur de protéines [234, 235]. Elle comporte les trois étapes classiques de séquençage, à savoir : le couplage, le clivage et la conversion.

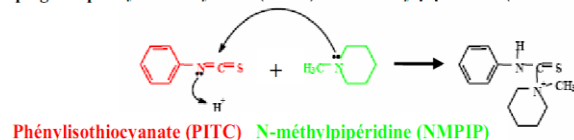
- **Couplage** : sous des conditions basiques, l'extrémité N-terminale de la protéine à séquencer est couplée avec le PhénylIsoThioCyanate (PITC) pour donner le PhénylThioCaramyl (PTC)-polypeptide.

- **Clivage** : la liaison peptidique entre le résidu protéique et le PTC subit un clivage acide, ce qui mène à la libération de l'AnilinoThiazolinone (ATZ-Aa), dérivé instable du résidu en question.

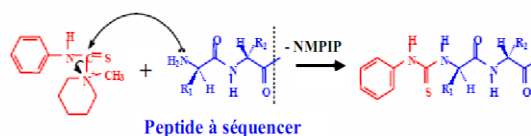
- **Conversion** : L'ATZ-Aa est converti en un dérivé d'acide aminé stable, le PhénylThiohydantoin d'acide aminé (PTH-Aa).

A la fin de chaque cycle, le PTH-acide aminé est identifié par HPLC sur C18.

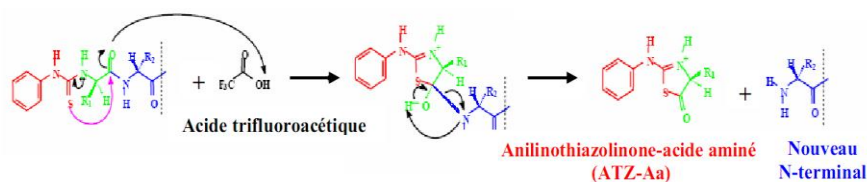
Etape 1 : Couplage du phénylisothiocyanate (PITC) au N-méthylpiperidine (NMPIP : base)



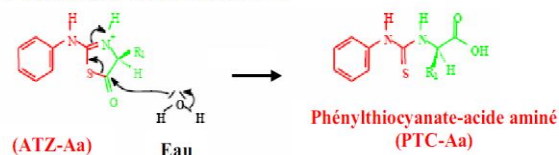
Etape 2 : Couplage du PITC-base au peptide



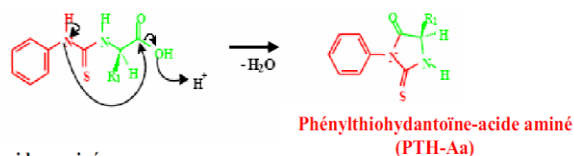
Etape 3 : Clivage de l'acide aminé N-terminal modifié par l'acide trifluoroacétique



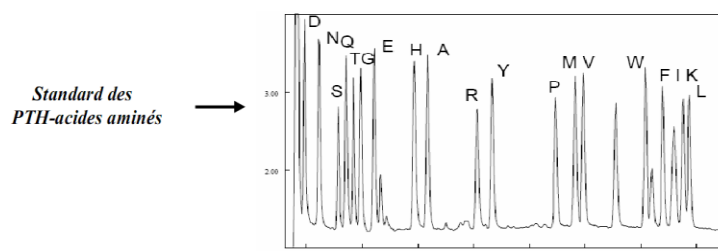
Etape 4 : Conversion de l'ATZ-acide aminé en PTC-acide aminé



Etape 5 : Conversion du PTC-acide aminé en PTH-acide aminé



Etape 6 : Analyse des PTH-acides aminés



Dégradation chimique d'EDMAN automatisée sur microséquenceur de protéines [234, 235].

Annexe 6 : Les paramètres de pollution

□ **L'azote total (NT)**

- Doser à la suite, consécutivement dans une éprouvette de réaction sèche: 0.2 mL d'échantillon, 2.3 ml de solution d'hydroxyde de sodium A, une Tablette d'oxydant B;
- Fermer l'éprouvette de réaction immédiatement, et chauffer directement. Pendant 15 minutes avec le programme standard HT ou avec un thermostat pendant 30 minutes à 120 °C
- Après le refroidissement à température ambiante, l'éprouvette est retournée plusieurs fois;
- Pipeter lentement dans le Test en Cuve 0.5 mL d'échantillon désagréé puis ajouter lentement 0.2 mL de solution D;
- Fermer immédiatement la cuve et mélanger le contenu en la retournant plusieurs fois;
- Après 15 minutes, bien nettoyer l'extérieur de la cuve et mesurer la DO avec un spectromètre.

□ **Phosphore totale (PT)**

- Dans une cuve Pipeter soigneusement 0.4 mL d'échantillon, puis fermer immédiatement et secouer du haut vers le bas;
- Chauffer dans le thermostat pendant 15 minutes avec le programme standard HT ou pour 30 minutes à 120 °C;
- Après le refroidissement à température ambiante, la cuve est secouée énergiquement du haut vers le bas, ensuite ajouter 0.5 mL de réactif B et fermer immédiatement;
- Visser un Dosi Cap C gris sur la cuve; puis retourner la cuve plusieurs fois;
- Après 10 minutes, retourner de nouveau, bien nettoyer l'extérieur de la cuve et mesurer la quantité du phosphore totale.

□ **La demande chimique en oxygène DCO**

- Mélanger le contenu pour avoir une solution homogène, puis pipeter 2 mL d'échantillon avec précaution, ensuite fermer la cuve et nettoyer l'extérieur de celle-ci;
- Chauffer dans le thermostat 15 min avec le programme standard HT ou pendant 2 h à 148°C;
- Sortir la cuve et retourner 2 fois avec précaution, ensuite laisser refroidir à température ambiante;
- Bien nettoyer l'extérieur de la cuve et mesurer.

□ **La demande biochimique en oxygène DBO5**

- Le flacon sera rempli avec un volume d'échantillon prédéterminé;
- Ajouter l'inhibiteur de nitrification;

- Ensuite, placer dans le flacon un agitateur magnétique et remplir le réservoir 3 à 4 gouttes d'hydroxyde de potassium (sert à lier le dioxyde de carbone);
- Placer la sonde de DBO sur le flacon d'échantillonnage puis positionner ce flacon dans la chambre thermostatique; - Enfin lire le résultat sur l'écran d'affichage pendant 5 jours.

□ **La mesure de pH**

- Étalonner le pH-mètre avec la solution tampon;
- Plonger l'électrode en verre dans le bécher contenant la solution à analyser;
- Noter la valeur de pH affiché après la stabilisation de la lecture.

□ **Les matières en suspension MES** Les matières en suspension sont mesurées par pesée après filtration et séchage à 105°C pendant 24 h. Un volume de 30 mL d'échantillon d'eau préalablement mixé est filtré sur un filtre sec standard en fibre de verre (taille des pores: 0,45 µm). Les particules trop grosses pour passer sont retenues sur le filtre; les composés dissous (sels, acides aminés, etc...) peuvent passer sans contraintes. Le filtre est ensuite rincé à l'aide d'eau déminéralisée puis séché à 105°C. L'augmentation de poids correspond à la concentration de matières en suspension.

$$\text{MES} = (\text{A}-\text{B})/\text{Volume d'échantillon (ml)}$$

Avec : **MES** : matières en suspensions totales (mg/l) **A** : poids (mg) du filtre avec résidu **B** : poids (mg) du filtre propre

□ **Mesure de la conductivité**

On plonge la sonde du conductimètre dans la solution et on lit la conductivité (généralement en mS/cm). Pour une bonne mesure, il faut agiter la solution avec un agitateur magnétique.

Avant et entre deux mesures réalisées dans des solutions différentes, il faut immerger la sonde dans un bécher d'eau distillée puis l'essuyer très légèrement avec un papier absorbant.

□ **Mesure de l'oxygène dissout**

- Plongez la sonde dans la solution testée jusqu'à 10 cm de profondeur;
- Patientez jusqu'à la stabilisation de la valeur de l'écran;
- La vitesse du liquide qui entre en contact avec la sonde doit être au moins de 0,2 à 0,3 m/s, si la solution est immobile, agitez celle-ci à l'aide de la sonde ou d'un agitateur;
- Rincez la sonde à l'eau propre après chaque utilisation, puis couvrez la tête de la sonde avec un capuchon de protection de la tête de la sonde.

Annexe 7: Identification phénotypique de la souce NIJ

Tableau 2: Caractérisations phénotypiques, physiologiques et biochimiques de la souche NIJ

Caractérisations de la souche NIJ		
Caractéristiques phénotypiques	Form	Bacilli
	Pigmentation	darkbrown
	Colonymorphology	Round, undulate, dull white, and non-luminescent
	Cellshape	Rod
	Motile	+
	Aerobicgrowth	+
	Anaerobicgrowth	-
	Spore forming	+
	Gram staining	+
Caractéristiques physiologiques	Temperature range (°C)	10–55 (37)
	pH range	6–10 (8)
	NaCl range (%)	0–25 (7)
Caractéristiques biochimiques	Catalase	+
	Oxidase	+
	Tween 20, 40 et 60	+
	Acetoin production	+
	Phosphatase production	+
	Nitratereductionto nitrite	+
	Nitratereductionto N ₂	-
	Amylase	+
	Aesculinhydrolysis	+
	Starchhydrolysis	+
	Endospore formation	+
	β-galactosidase	-
	Argininedecarboxylase	-
	Arginine dihydrolase	+
	Lysine decarboxylase	+
	Ornithine decarboxylase	-
	Citrate utilization	+
	Indole production	-
	Urease	-
	Gelatinase	+
	Tryptophane desaminase	-
	Voges-Proskauer	+
	Glycogen	-
	d-Glucose	+
	d-Cellobiose	+
	d-Fructose	+
	d-Sorbitol	+
	Xylitol	-
	Salicin	+
	d-Melibiose	+
	d-Maltose	+
	d-Lactose	-

Tableau3: Caractérisations phénotypiques, physiologiques et biochimiques de la souche NIJ.

Carbohydrate	Résultat du test de la souche NIJ
Aesculine	+
Salicine	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Lactose	+
Saccharose	+
Trehalose	+
Gentiobiose	+
Melibiose	+
Raffinose	+
Melezitose	-
Amidon	+
Glycogène	+
Inuline	+
D-Turanose	+
D-Tagatose	+
D-Fucose	-
D-Fucose	+
D-Lyxose	-
D-Arabitol	+
L-Arabitol	-
Xylitol	+
Gluconate	+
2-Céto gluconate	+
5-Céto gluconate	+
Glycérol	+
Erythritol	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	+
D-Ribose	+
L-Xylose	-
D-Xylose	+
Adonitol	-
β-Méthyl xyloside	-
Galactose	+
Glucose	+
Fructose	+
Mannose	+
L-Sorbose	+
L-Rhamnose	+
Dulcitol	-
myo-Inositol	+
D-Sorbitol	+
D-Mannitol	+

L-Méthyl-D-mannoside	+
D-Méthyl-D-glucoside	+
N-Acétyl glucosamine	+
Amygdaline	+
Arbutine	+