



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département Sciences Alimentaires

## **Mémoire de fin d'études**

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en  
Nutrition et Diététique Humaine "NDH"

Filière Sciences Alimentaires

**Thème**

**Extraction et caractérisation de l'enzyme coagulant le lait issu de  
la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescences***

Présenté par :

- **BOURDJEM Khadidja**
- **BAKIR Lamia**

Devant le jury :

- |                         |                               |                     |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------|
| • Mme <b>METIDJI</b>    | <b>Maître de conférence B</b> | <b>Présidente</b>   |
| • Mme <b>BOUCHAKOUR</b> | <b>Maître de conférence A</b> | <b>Examinatrice</b> |
| • Mme <b>BOULKOUR</b>   | <b>Maître de conférence A</b> | <b>Promotrice</b>   |

**Promotion : 2021-2022**

## *Remerciements*

*Avant tout, je remercie Allah le tout-puissant de m'avoir donné la force et le courage ainsi que la patience pour réaliser ce modeste travail*

*Je tiens tout d'abord à remercier **Madame boulkour, Enseignante Maître de conférences Cat A**, et Directrice de mémoire, pour m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien ce projet, pour la qualité de son encadrement et la pertinence de ses remarques, pour sa sympathie, sa simplicité et sa convivialité. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude.*

*Je remercie **Dr Metidji H, Enseignante Maître de conférences Cat B** et **Dr Bouchakour, Enseignante Maître de conférences Cat A**, d'avoir accepté d'être membre de ce jury et pour l'intérêt porté à ce travail*

*Je remercie également tous mes enseignants*

*Enfin, je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, trouvent ainsi l'expression de mes profondes grâces et respect.*

## *Dédicaces*

Je remercie **Dieu** le Généreux pour m'avoir guidé vers la lumière de la recherche, du savoir et de la science.

Du plus fond du cœur et avec l'intensité de mes émotions, je dédie ce travail :

À mon très cher père **Abdoun**, Pour son amour infini, pour ses sacrifices qu'il a consentis pour ma réussite. Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect, de ma profonde reconnaissance, de ma gratitude et de mon amour.

À ma très chère mère **Rekia**, En témoignage de mon amour éternel et de ma grande reconnaissance pour tous les efforts et les encouragements qu'elle a consentis pour moi tout au long de mes études. Qu'elle trouve dans ce travail le témoignage de ma profonde gratitude et infini dévouement.

À mes chers frères **Abd elrrahmane, Youcef, Zakaria**, et mes adorables sœurs **Fella et Maria**, Pour toute l'affection qu'ils m'ont toujours témoigné, je leur souhaite une vie pleine de bonheur, de gloire, de triomphe et de succès. Que Dieu nous garde toujours unis et heureux.

À toute ma famille **Bourdjem et Niaf**.

À mes meilleurs amis : **Mimia, Moufida**, et tous ceux qui me sont chers qui sont nombreux et que je ne citerais pas ici volontairement de peur d'oublier l'un d'entre eux avec tout mon respect.

À mon binôme **Lamia** de m'avoir partagé ce travail, nous avons partagé d'agréable moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire.

À tous mes enseignants depuis l'école primaire jusqu'à ce jour.

Je vous souhaite tous le bonheur du monde et un brillant avenir.

Vous êtes toujours dans mes pensées...

**Khadidja**

## DEDICACES

*Je tiens c'est avec grande plaisir que je dédie ce modeste travail : A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheurs, celui qui s'est toujours sacrifié pour ma voir réussir, que dieu te garde, à toi mon père : **Mohammed***

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheurs, maman : **Noura** que j'adore*

*Mes très chers parents : Quelle que soit ma reconnaissance, elle reste bien faible en regard de ce que je leur dois.*

*A Ma vie et mon bonheur Que Dieu prolonge ta vie : **yama Yamina***

*A mon grand amour et mon Mari **zino***

*A mes chers frères et sœurs : **Adlen** et son épouse **Nabila**, **Amar** et son épouse **Zineb**, **Naziha**, **Amina**, **Loubna***

*À toute ma famille et ma belle-famille*

*A mes chères amies : **chaima**, **Yasmine**, **noussa**, **mimi**, **moufida***

*A mon cher binôme : **Khadidja** ma douce sœur qui a eu la patience de me supporter durant ce mémoire, et qui m'a soutenu et encouragé pendant tous les moments difficiles vécus, je t'aime beaucoup ma chère.*

*À tous mes enseignants depuis l'école primaire jusqu'à ce jour.*

**Lamia**

# Table Des Matières

Liste Des Abréviations : .....	
RESUME .....	
Abstract .....	
الملخص .....	
INTRODUCTION GENERALE .....	1
INTRODUCTION GENERALE.....	2
Chapitre I : synthèse Bibliographique .....	1
I-GENERALITE SUR LA SOUCHE DE <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	2
I-1- Introduction .....	2
I-2- Description taxonomique .....	2
I-3- Écologie.....	3
I-4- Métabolisme .....	4
I-5- Caractéristiques de la bactérie Gram négatif : sa structure membranaire .....	4
I-6- Description physiologique.....	5
I-7- Applications de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	5
II-Les enzymes protéolytiques .....	6
II-1 Généralités sur les protéases .....	6
II-2- Nomenclature et classification .....	9
II-3- Applications biotechnologiques.....	11
Chapitre II : .....	17
Matériel et méthode .....	17
A- Matériel .....	18
I- MICROORGANISME .....	18
II- MILIEUX DE CULTURE .....	18
B- Méthodes .....	19

---

I- CULTURE ET CONSERVATION DES BACTERIES .....	19
II- DOSAGE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE .....	19
III- PURIFICATION DE LA PROTEASE MPDZ.....	20
IV- METHODES ANALYTIQUES .....	23
V- CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA PROTEASE MPDZ .....	23
Chapitre III : Résultats et Discussion .....	27
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>28</b>
I- RAPPEL DES RESULTATS ANTERIEURS .....	28
II- OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE PROTEASES PAR LA SOUCHE TBS09 DE <i>PSEUDOMONAS FLUORECENS</i> .....	29
II-1- Effet de différentes sources de carbone sur la production de protéase(s).....	29
II-2- Effet de la concentration de la caséine sur la production de protéase(s) .....	30
II-3- Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéase(s) .....	30
II-4- Effet de la concentration d'extrait de bœuf sur la production de protéase(s) .....	31
II-5- Optimisation de la concentration en K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaCl et en oligoéléments sur la production de protéase(s) .....	32
III_CINETIQUE DE PRODUCTION DE PROTEASES ET DE CROISSANCE BACTERIENNE DE LA SOUCHE TBS09 .....	32
IV- PURIFICATION DE LA PROTEASE MPDZ PRODUITE PAR LA SOUCHE TBS09 DE <i>PSEUDOMONAS FLUORECENS</i> .....	33
IV-1- Extrait protéolytique à partir de la souche TBS09 de <i>Pseudomonas fluorecens</i> ....	33
IV-2- Précipitation fractionnée par l'acétone.....	33
IV-3- Chromatographie échangeuse de cations sur Mono S-Sepharose .....	34
IV-4- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes .....	35
IV-6- Bilan de purification.....	36
IV-7- Séquençage de l'extrémité NH <sub>2</sub> -terminale .....	37
V- CARACTERISATION DE LA PROTEASE MPDZ A PARTIR DE LA SOUCHE DE TBS09 DE <i>PSEUDOMONAS FLUORECENS</i> .....	37

---

V-1- Effet des inhibiteurs et des agents réducteurs spécifiques des protéases sur l'activité protéolytique.....	37
V-2- Effet des ions métalliques sur la stabilité de la MPDZ.....	39
V-3- Effet du pH sur l'activité et la stabilité de l'enzyme .....	40
V-4- Détermination de la température optimale .....	40
V-5- Etude de la thermostabilité de l'enzyme MPDZ.....	41
V-6- Détermination du degré d'hydrolyse des protéases MPDZ, Chymosine et Mucorpepsine .....	42
V-7- Evaluation des performances enzymatique des protéases MPDZ, Chymosine et Mucorpepsine dans la coagulation du lait .....	44
V-8- Evaluation des performances enzymatique des protéases MPDZ, Chymosine et Mucorpepsine dans la coagulation du lait .....	44
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	46
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	47
Références Bibliographique .....	49
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	50
Annexes .....	59
Composition Des Milieux De Culture :.....	60
Annexe N°1 : Les Milieux complexes .....	60
Annexe N°2 : Appareillage et Verrerie .....	60
Photos des appareils : .....	61

## Liste Des Figures :

<b>Figure 1 :</b> Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux <i>Pseudomonas</i> .....	2
<b>Figure 2:</b> Différences entre les parois des bactéries Gram négatifs et Gram positifs .....	4
<b>Figure 3 :</b> Schéma représentant la nomenclature des peptidases selon Barrett (1998). .....	10
<b>Figure 4:</b> Schéma représentant le coagulum. ....	13
<b>Figure 5:</b> Représentation schématique d'une micelle et sous-micelle de caséine.....	14
<b>Figure 6:</b> Schéma représentant la coagulation du lait. ....	15
<b>Figure 7:</b> Protocole expérimental de la production, extraction de purification et la caractérisation des protéases. ....	22
<b>Figure 8:</b> Site d'échantillonnage de la souche TBS09. ....	28
<b>Figure 9:</b> Cinétique de production de protéases et de croissance bactérienne de la souche TBS09 de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	33
<b>Figure 10:</b> Profils d'élution de la fraction active après sortie d'une chromatographie échangeuse de cations sur Mono S-Sepharose de l'activité protéase de l'enzyme MPDZ.....	34
<b>Figure 11:</b> (A) Profil des étapes de purification, (B) Zymogramme sur caséine de la fraction de la protéase MPDZ pure (50 µg). ....	35
<b>Figure 12:</b> (A) Effet du pH sur l'activité de l'enzyme MPDZ. (B) Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme MPDZ. ....	40
<b>Figure 13:</b> Effet de la température sur l'activité protéase produite par la souche TBS09 de <i>Pseudomonas fluorescens</i> . ....	41
<b>Figure 14:</b> Etude de la thermostabilité de l'enzyme MPDZ produite par la souche TBS09 de <i>Pseudomonas fluorescens</i> . ....	42
<b>Figure 15:</b> Hydrolyse de la caséine par les protéases MPDZ,.....	43
<b>Figure 16:</b> Coagulation du lait par les protéases MPDZ, Chymosine et Mucorpepsine. ....	45



---

## Liste Des Tableaux :

<b>Tableau 1:</b> Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de protéase(s) par la souche TBS09 de <i>Pseudomonas fluorescens</i> . .....	29
<b>Tableau 2 :</b> Optimisation de la concentration de caséine sur la croissance bactérienne et sur la production de protéase(s) par la souche TBS09 de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	30
<b>Tableau 3:</b> Effet de différentes sources d'azote sur la croissance bactérienne et sur la production de protéase(s) par la souche TBS09 de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	31
<b>Tableau 4:</b> Optimisation de la concentration d'extrait de bœuf sur la croissance bactérienne et sur la production de protéase(s) par la souche TBS09 de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	31
<b>Tableau 5:</b> Bilan de purification à homogénéité de la protéase MPDZ produite par la souche <i>Bacillus cereus</i> BX35 après 36 h de culture sur milieu optimisé.....	36
<b>Tableau 6:</b> Effet de différents inhibiteurs et des agents réducteurs sur la stabilité de la protéase MPDZ purifiée à partir de la souche TBS09 de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (en respectant un rapport molaire inhibiteur/protéase = 100).....	37
<b>Tableau 7:</b> Effet de différents ions métalliques (à 2 mM) sur la stabilité de la protéase MPDZ purifiée à partir de la souche TBS09 de <i>Pseudomonas fluorescens</i> . .....	39

***Liste Des Abréviation :***

DFP : diisopropylfluorophosphate

DO : densité optique

EC: Enzyme commission

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétatique

Fe<sup>+2</sup> : fer

GNL : milieu gélose nutritive au lait

LB : Luria-Bertani

MM : masse moléculaire

MPDZ : Métallo Protéase Algérienne

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitrate

PCMB: p-chloromercuribenzoate

PGPB : Plan Growth Promoting Bactéria

PMSF : phénylméthylsulphonyl fluoride

Rpm : rotation par minute

TBS09 : TOUIOUI BOULKOUR SOURAYA 09

TCA : trichloro-acétique

v/v: volume/ volume

# ***RESUME***

Une souche bactérienne TBS09 protéolytique isolée à partir d'un sédiment marin du port de pêche d'Arzew (Wilaya d'Oran, Algérie), a été identifiée en tant que *Pseudomonas fluorescens* moyennant les techniques de taxonomie classique (galleries API 50 CH & API 20 E) et moléculaire (séquençage du gène de l'ARNr 16S). Une nouvelle protéase (nommée MPDZ) produite par cette souche a été purifiée et caractérisée. Le protocole expérimental de purification comprend deux étapes : une précipitation fractionnée par l'acétone (60-80%) suivie d'une chromatographie échangeuse de cations sur Mono S-Sepharose. L'analyse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE) montre que l'enzyme purifiée présente une masse moléculaire apparente de 50 kDa. L'activité spécifique, mesurée sur la caséine comme substrat, est de 33250 U/mg à pH 7 et à 60 °C. Il s'agit d'une enzyme appartenant à la famille des métalloprotéases du fait qu'elle est inhibée essentiellement par l'EGDA, l'EDTA et le 1-10-Phenanthroline. Sa thermoactivité et sa thermostabilité sont considérablement améliorées par le zinc à 2 mM. Cependant, le nickel, le cadmium et le mercure inhibent totalement cette activité enzymatique. Le degré d'hydrolyse de la caséine par la MPDZ (30%) est plus important que celui de la Chymosine (25%) et la Mucorpepsine (17%). La protéase MPDZ est une vraie enzyme coagulante qui précipite efficacement le lait. En effet, le maximum de coagulation avec formation du coagulum est atteint après 4, 6 à 8 h d'incubation à 37 °C respectivement avec la MPDZ, la Mucorpepsine et la Chymosine générant un lactosérum clair dans le cas de la protéase MPDZ contre trouble dans le cas des enzymes commerciales. Ainsi, la nouvelle enzyme extracellulaire MPDZ de la souche *Pseudomonas fluorescens* semble être intéressante et pourrait être utilisée dans des applications biotechnologiques notamment dans la coagulation du lait pour la fabrication de fromage.

**Mots-clés :** *Pseudomonas fluorescens*, Protéases, Purification, Coagulation du lait, fromage.

# *Abstract*

Strain of bacterial TBS09 protein newly isolated summary of the sediments of marine fishing evaporative port Borzio (state of Oran, Algeria), known as pseudo *Pseudomonas fluorescens* through classification techniques classic (exhibitions API 50 CH & API 20 E) and molecular (sequence RNAi 16S genes).

The new proteins that have been purified named (Mpdz), which was characterized by these circumstances the strain produced. It features an experimental protocol for the purification of two steps: fractional precipitation with acetone (60-80%), followed by the exchange of positive ion chromatography on Mono S- Sevaros. The analysis showed a polyacrylamide gel in changing the nature of the conditions (SDS-PAGE) that the enzyme purified has a molecular weight of a clear 50 kDa. Specific activity is measured on casein as the substrate, is 33250 U / mg at pH 7 and 60 ° C, and this is an enzyme belonging to the family of metalloproteinases in it is prevented, mainly through EGDA, IEDTA and 1-10-phenanthroline. Ventilation and thermal stability is greatly improved by Zain, where mercury completely prevents this enzyme activity.

The degree of decomposition of casein by Mpdz (30%) greater than those chymosin (25%) and Mucorpepsine (17%). Mpdz protease enzyme is the real blood clot is precipitated milk efficiently. In fact, access to a maximum of coagulation with the formation of thrombus after 4, 6-8 hours of incubation at 37 ° C respectively with Mpdz, and Mucorpepsine and chymosin generate total.

Mucorpepsin and Chymosin However, nickel and cadmium whey clear in the case of MPDZ proteases versus cloudy in the case of commercial enzymes. Thus, it seems that the new outside of the cell MPDZ of *Pseudomonas fluorescens* strain interesting enzyme can be used in biotechnology applications, particularly in the curd milk to manufacture cheese.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, Protease, Purification, Milk Clotting, Cheeses.

## الملخص

ملخص سلالة بكتيرية TBS09 بروتينية معزولة حديثا من الرواسب البحرية من ميناء الصيد البحري بأرزيو (ولاية وهران، الجزائر)، عرف بأنه الزائفة *Pseudomonas fluorescens* من خلال تقنيات التصنيف الكلاسيكي (المعارض API 50 CH & API 20 E) والجزئي (تسلسل ربي 16 S الجينات)

البروتينات الجديد التي تمت تنقيتها سميت (Mpdz) والتي تميزت هاته السلالة بإنتاجها . ويضم البروتوكول التجريبي للتنقية خطوتين: هطول الأمطار كسور مع الأسيتون (60-80%)، يليه تبادل الأيونات الموجبة اللوني على مونو-S سيفاروز. وأظهر التحليل على هلام بولي أكريلاميد في تغيير طبيعة الظروف (SDS-PAGE) أن الإنزيم المنقى لديه الوزن الجزيئي واضح من 50 كيلو دالتون. النشاط المحدد يقاس على الكازين كما الركيزة، هو U / 33250 ملغ في درجة الحموضة 7 و 60 درجة مئوية وهذا هو الإنزيم تنتمي إلى عائلة metalloproteases في ذلك هو تحول دون ذلك الأساس عن طريق EGDA ، IEDTA و 1-10- فينانترولين. يتم تحسين التهوية والاستقرار الحراري بشكل كبير من قبل الزئبق حيث يمنع تماما هذا النشاط الانزيمي .

درجة التحلل من الكازين قبل 30) Mpdz % (أكبر من تلك التي كيموسين (25%) و Mucorpepsine (17%) Mpdz). (البروتيني هو إنزيم تجلط الدم الحقيقي هو الذي عجل الحليب بكفاءة. في الواقع، يتم الوصول إلى الحد الأقصى من التخثر مع تشكيل خثرة بعد 4، 6-8 ساعة من الحضانة عند 37 درجة مئوية على التوالي مع Mpdz ، و Mucorpepsine وكيموسين توليد كلي .

Mucorpepsin و Chymosin ومع ذلك ، فإن النيكل والكاديوم مصل اللبن واضح في حالة MPDZ البروتياز مقابل غائم في حالة الإنزيمات التجارية. وبالتالي ، يبدو أن الإنزيم الجديد خارج الخلية MPDZ من سلالة *Pseudomonas fluorescens* مثير للاهتمام ويمكن استخدامه في تطبيقات التكنولوجيا الحيوية ، لاسيما في تخثر الحليب لتصنيع الجبن .

**كلمات مفتاحية:** الفلوسنت الزاءقة بروتياز , تنقية, تخثر الحليب ,الجبن.

# ***INTRODUCTION GENERALE***

## **INTRODUCTION GENERALE**

Les biocatalyseurs demeurent les outils clés de la biotechnologie. Parmi ceux-ci, les enzymes, qui 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 (**Boukour Touioui, 2016**).

Ainsi, par rapport aux procédés chimiques conventionnels, les procédés biocatalytiques consomment normalement moins d'énergie et sont moins polluants puisqu'ils utilisent moins de solvants organiques. Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité a été estimé à 7 milliards de dollars en 2017 selon (Cleveland, USA). Moins de 30 enzymes comptent pour plus de 90% des enzymes industrielles utilisées.

La grande majorité de celles-ci sont cependant fragiles et peu résistantes dans les conditions d'usage industriel, d'où la recherche d'enzymes de substitution plus robustes (température, pH et pression). Cependant, 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 toxiques (**Boukour Touioui et al., 2015**).

En effet, ce groupe des hydrolases couvre 65% du marché total des enzymes (**Fujinami et Fujisawa, 2010**). Toutefois, la part de ces protéases dans le marché mondial est essentiellement dominée par les protéases alcalines microbiennes, particulièrement du genre *Bacillus*, avec 40% de ce marché (**Gupta et al., 2002**).

La coagulation du lait est l'étape déterminante dans la production fromagère, assurée par des enzymes protéolytiques possédant des propriétés coagulantes, dont la présure animale qui renferme essentiellement de la chymosine, est le principal agent coagulant appliqué à l'échelle industrielle. Elle joue également un rôle crucial dans le développement équilibré de l'odeur et la texture du fromage produit ( **Kumar et al., 2006; Jiang et al., 2007; Vishwanatha et al., 2010**). En effet, l'extraction de la présure à partir des caillettes des veaux en sevrage, demanderait des sacrifices trop onéreux. En plus, la demande accrue de la production mondiale du fromage combinée à l'insuffisance des quantités de caillettes disponibles et leurs prix élevés ont provoqué une pénurie remarquable de cette enzyme protéolytique.

Afin de remédier à cette situation, plusieurs recherches ont été activement poussées ces dernières années, visant à la mise en évidence des enzymes de remplacement dites succédanés

de la présure de différentes origines (animale, végétale et microbienne), capables de coaguler le lait et d'assurer des meilleurs rendements fromagers (**Mohamed Ahmed et al., 2010; Vishwanatha et al., 2010**). L'industrie est à présent capable de produire, en quantité pratiquement illimitée, ces succédanés à des prix concurrentiels, où la fabrication des différents types de fromage est déjà réalisée (**Bruno et al., 2010**).

De l'ensemble des travaux publiés, il en ressort que les recherches menées sur les substituts d'origine microbienne sont jusqu'à présent les plus fructueuses, ayant la capacité de produire les différents types de fromages avec une haute qualité comparable à celle obtenue par la caillé présure. La majorité de ces enzymes microbiennes sont produites principalement par des genres d'*Aspergillus*, *Bacillus*, *Mucor*, *Entothia*, *Rhizopus*, *Penicillium* et *Fusarium* (**Ageitos et al., 2007; Vishwanatha et al., 2010; Zhang et al., 2013**). Ces espèces microbiennes sont caractérisées par leur adaptation aux cultures solides à base des substrats bon marché, facilitant ainsi l'extraction et la récupération des protéases extracellulaires à partir des milieux de fermentation avec des rendements rentables tout en réduisant les coûts d'exploitation (**Sathya et al., 2009**).

Par ailleurs, plusieurs protéases de différentes origines ont la capacité de coaguler le lait mais peu d'entre elles sont utilisées comme succédanés de la présure. Cela est dû à leur activité protéolytique élevée qui s'exprime par une action excessive et non spécifique sur les caséines. En effet, la coagulation enzymatique du lait nécessite l'hydrolyse d'une seule liaison peptidique (Phe105-Met106) au niveau de la caséine  $\kappa$  (**Creamer, 2002; Dalgleish et Corredig, 2012; Konuklar et Gunasekaran, 2002; Malacarne et al., 2008**).

Toute action non spécifique sur la caséine  $\kappa$  ou les autres types de caséine entraîne une perte dans le rendement fromager par libération de peptides dans le lactosérum (**Abdel-Fattah et al., 1974; Emmons et Modler, 2010; Jensen et al., 2015; Srinivasan et al., 1964**). En outre, une action protéolytique due à la quantité d'enzyme retenue par le caillé se poursuit au cours de l'affinage et peut donner lieu à des défauts de goût et de texture (**Kim et al., 2004; Luerce et al., 2014; Spelzini et al., 2005**).

Ainsi l'étude d'une enzyme en vue de son utilisation dans la coagulation du lait doit concerner, d'une part, son activité coagulante et, d'autre part, son activité protéolytique. L'étude de l'activité coagulante d'une protéase consiste, essentiellement, à la mesure de la vitesse avec laquelle cette enzyme provoque la coagulation du lait (**Berridge, 1955; Gustavsson et al.,**



2014) et l'appréciation de la dépendance de cette opération vis-à-vis de certains facteurs tels que le pH et la température. Cela renseigne sur les conditions optimales d'utilisation de la protéase employée et situe l'effet de ces facteurs dans les conditions de coagulation du lait (Creen et Foster, 1974; Fererici, 1982; Nájera *et al.*, 2003; Ong et Shah, 2009). L'étude de l'activité protéolytique au cours de la phase de coagulation consiste principalement à la mise en évidence de l'action de la protéase sur les caséines (Esteves *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2010; Wedholm *et al.*, 2008).

Notre objectif porte essentiellement sur l'étude des quatre points principaux :

- L'optimisation des conditions de la production, à l'échelle Erlenmeyer, de protéase produite par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*, nouvellement isolée d'un sédiment marin du port de pêche d'Arzew (Wilaya d'Oran, Algérie).
- La purification à homogénéité de la protéase (MPDZ) à partir de la souche TBS09.
- La caractérisation biochimique de l'enzyme native pure.
- L'évaluation des performances enzymatique de la protéase MPDZ, par rapport aux enzymes coagulantes (Rénines) commerciales de sigma (Chymosine : de l'estomac de veau et Mucorpapsine : enzyme extraite du champignon basidiomycète *Mucor meihei*).

# *Chapitre I : synthèse Bibliographique*

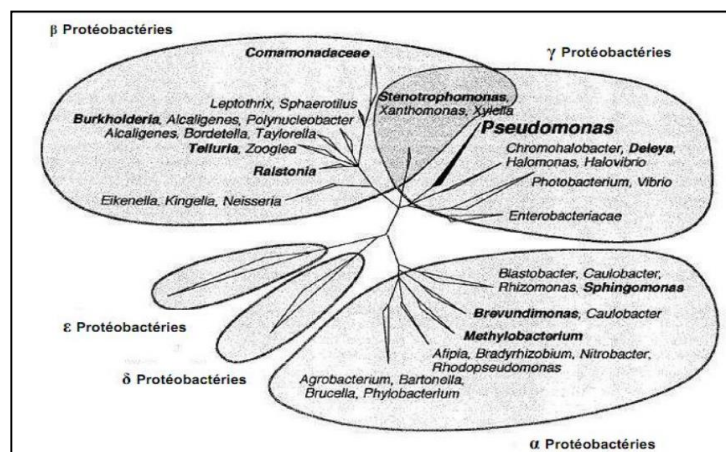
## I-GENERALITE SUR LA SOUCHE DE *Pseudomonas fluorescens*

### I-1- Introduction

*Pseudomonas fluorescens* est une bactérie Gram négatif, fermentant le glucose mais pas le lactose, oxydase positive en forme de bâtonnet avec des flagelles polaires qui lui assurent la mobilité. C'est une bactérie ubiquitaire rencontrée dans les sols, sur les racines des végétaux, sur les plantes, ainsi que dans les eaux douces et marines (Chierici et al., 2016 ; Garrido-Sanz et al., 2016). Elle appartient à la classe des Gammaproteobacteria, famille des Pseudomonadaceae et au genre *Pseudomonas*. La fluorescence est due à la production d'un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine, soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme (Trogl et al., 2012). Sa température de croissance optimale se situe entre 25 et 30 °C.

### I-2- Description taxonomique

Les bactéries du groupe *Pseudomonas fluorescens* appartiennent à la famille des Pseudomonadaceae et au genre *Pseudomonas*. Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe  $\gamma$  des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Hotta et al., 2010 ; Boulkour Touioui et al., 2018). Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas*, beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre (Fig. 1).



**Figure 1 :** Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Garrido-Sanz et al., 2017)

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et même quelques souches utilisent la dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose). Elle est mobile grâce à ses multiples flagelles. De plus, elles tiennent la deuxième partie de son nom (fluorescens) du fait qu'elles sont fluorescentes. Cette fluorescence est due à la production d'un pigment appelé pyoverdine 3. Leur température de croissances optimales se situe entre 25 et 30 °C. En industrie agro-alimentaire elles ont une grande importance sanitaire et économique.

Le groupe *Pseudomonas fluorescens* regroupe 9 souches selon NCBI : *Pseudomonas fluorescens* A506, *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8, *Pseudomonas fluorescens* HK44, *Pseudomonas fluorescens* NZ007, *Pseudomonas fluorescens* NZ011, *Pseudomonas fluorescens* NZ052, *Pseudomonas fluorescens* NZ17, *Pseudomonas fluorescens* SS101 et *Pseudomonas fluorescens* WH6. Il a été montré que ces espèces sont très proches les unes des autres au niveau génomique (**Guinebretiere et al., 2008**). Ce point a compliqué la tâche des chercheurs pour faire une classification précise au sein du groupe. Ainsi, la première classification au sein du groupe *Pseudomonas fluorescens* n'est pas essentiellement basée sur les différences génomiques mais plutôt selon trois caractères phénotypiques spécifiques ; la virulence, la physiologie et la morphologie.

### I-3- Écologie

*Pseudomonas fluorescens* est une espèce commensale chez les plantes, leur permettant d'atteindre les éléments nutritifs indispensables à leur croissance. Cette espèce est connue pour son aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires des plantes, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes (**Gao et al., 2012**). Les modes d'action de *Pseudomonas fluorescens* dans la suppression des maladies des plantes incluent la production de sidérophores (molécules de faibles poids moléculaires ayant une très forte affinité pour l'ion  $Fe^{2+}$ ) pour la compétition du fer disponible, l'antibiose, la production d'enzymes lytiques et le Système de Résistance Induit (ISR) (**Ongena et al., 2005**). Dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques agissant directement sur l'agent pathogène (**Gobbetti et Fox, 1996**).

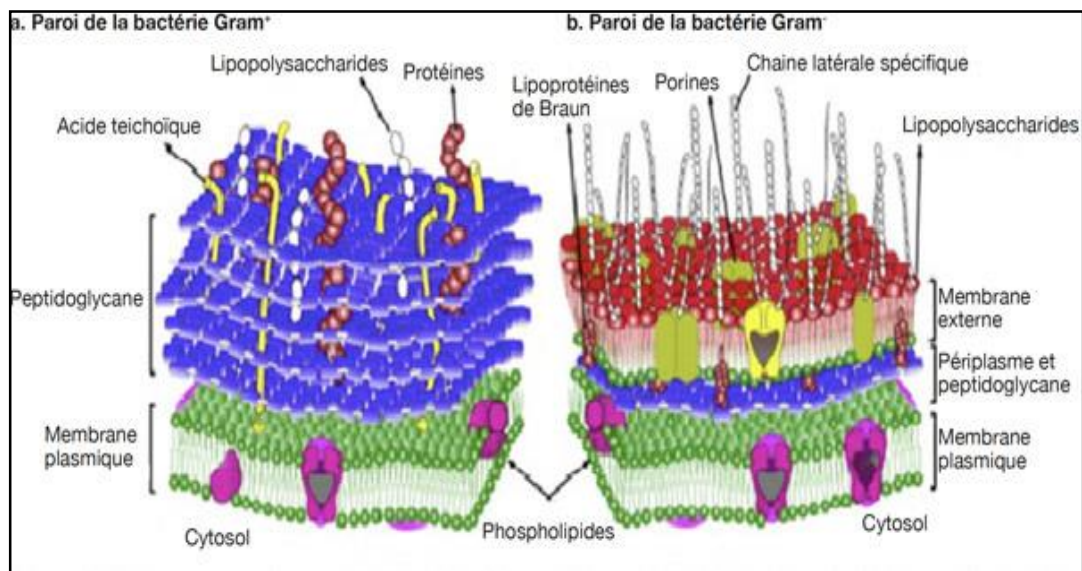
*Pseudomonas fluorescens* fait partie de la flore d'altération des aliments, elle se développe également en biofilm, ce qui peut poser de sérieux problèmes dans de nombreux domaines (hospitalier et agro-alimentaire), car le biofilm protège les bactéries contre les agents désinfectants. Sa température optimale de croissance est de  $29 \pm 2$  °C à un pH  $\pm 7$  (**Sillankorva et al., 2008**).

### 1-4- Métabolisme

*Pseudomonas fluorescens* a des besoins nutritionnels simples et peut facilement se développer dans des milieux minéraux complétés par une variété de sources de carbone, certaines souches peuvent utiliser l'ion nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) comme accepteur d'électrons en lieu et place de l' $\text{O}_2$ . Elle dégrade les polluants et produit des substances telles que :

- la pyoverdine, l'un des sidérophores les plus importants, responsable de la chélation de fer (Trapet et al., 2016),
- certains antibiotiques (2,4-diacetylphloroglucinol, phenazines, pyrrolnitrine, HCN, etc.) qui contribuent à la protection contre les pathogènes (Kilani-Feki et al., 2010; Zhang et al., 2016).

### I-5- Caractéristiques de la bactérie Gram négatif : sa structure membranaire



**Figure 2:** Différences entre les parois des bactéries Gram négatifs et Gram positifs (Tripathi et al., 2012).

La paroi cellulaire des bactéries Gram négatif est fine et élastique ; elle est couverte d'une membrane externe contenant les lipides liés de manière covalente à des polysaccharides, tandis que celle des bactéries Gram positif est épaisse et rigide. Les bactéries Gram<sup>-</sup> ont une couche de peptidoglycane d'environ 5 à 10 nm d'épaisseur entre les membranes plasmiques intérieure et extérieure, tandis que l'épaisseur de cette couche est d'environ 20 à 80 nm chez les bactéries Gram positif (**Fig. 2**) (Tripathi et al., 2012).

Les parois cellulaires des bactéries Gram négatif, avec une couche plus mince de peptidoglycane que celle des bactéries Gram positif, ont tendance à se rompre plus facilement pendant les processus de dessiccation et de réhydratation (**Pembrey et al., 1999**). L'absence d'acide teichoïque chez les bactéries Gram négatif réduit encore leur résistance au séchage par rapport aux bactéries Gram positif. Enfin, la plupart des bactéries Gram ont des lipopolysaccharides sur leur surface, ces lipopolysaccharides peuvent piéger des molécules d'eau, entraînant une baisse des taux de survie au cours du stockage à long terme (**Miyamoto-Shinohara et al., 2008**).

### **I-6- Description physiologique**

*Pseudomonas fluorescens* est caractérisé par une grande résistance à de nombreux facteurs (milieux nutritionnellement pauvres, températures très variées, antibiotiques, etc.), et donc par une forte adaptabilité métabolique. Bactéries aérobies, catalases positives, et avec un métabolisme chimio-organotrophes pour la plupart, elles sont cependant lactose négatives, incapables d'utiliser le glucose comme substrat (utilisé pour leur identification) mais sont parfois aptes à utiliser l'acide lactique produit par les bactéries du même nom. Les *Pseudomonas fluorescens* sont des bactéries non seulement mésophiles mais aussi psychrotrophes, ce qui explique leur développement à des températures de 30°C (température optimale de croissance (**Trudgill, 1969**) et allant jusqu'à 4°C. Par ailleurs, un pH compris entre 4 et 5 ralentit leur développement, tout comme une activité de l'eau inférieure à 0,98 ; en effet, les *Pseudomonas* sont très exigeants en eau libre. Une étude montre qu'une température élevée de prématuration (ensemencement de lait de la traite du soir, refroidi, puis emprésurage du lait de mélange après ajout de la traite du matin) favorise leur prolifération.

### **I-7- Applications de *Pseudomonas fluorescens***

*Pseudomonas fluorescens* a plusieurs applications, les plus connues concernent l'agriculture où elle est utilisée en lutte biologique et comme stimulateur de croissance des plantes PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) (**Garcia-Seco et al., 2015**). *Pseudomonas fluorescens* est également utilisée comme catalyseur dans la réaction de transestérification de l'huile de Jatropha pour la production de biodiesel (**Luo et al., 2006; Lima et al., 2015**). *Pseudomonas fluorescens* joue aussi un rôle dans la protection de l'environnement par la dégradation des hydrocarbures et d'autres types de polluants (**Hack et al., 2015**). Elle est actuellement étudiée en médecine car elle produit un antibiotique particulier (mupirocine) qui a prouvé son efficacité dans le traitement de certaines maladies de la peau, des troubles oculaires et auditifs (**Sakthipriya et al., 2016; Carles et al., 2017**). Les enzymes issues

de *Pseudomonas fluorescens* sont également utilisées dans la coagulation du lait (**Lin et al., 2016; Stuknyte et al., 2016**).

## ***II-Les enzymes protéolytiques***

### **II-1 Généralités sur les protéases**

Les protéases ou enzymes protéolytiques peuvent être rencontrées chez tous les organismes vivants, elles occupent une place privilégiée tant sur le plan physiologique que commercial (**Rao et al., 1998a ; Lalmanach, 2008 ; Moftah et al., 2012 ; Zaferanloo et al., 2014** ). Ces enzymes participent à un grand nombre de processus biologiques dont le clivage de pro-hormones permettant leur activation, la coagulation sanguine et la fibrinolyse, l'assemblage de structures macromoléculaires comme les fibres de collagène, la fertilisation, le "turnover" des protéines cellulaires, le contrôle de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines.

Les protéases ne sont pas seulement une nécessité physiologique, elles peuvent également devenir un problème si elles ne sont pas contrôlées, pouvant ainsi détruire les composants protéiques des cellules et des tissus. L'action de ces enzymes a donc besoin d'être régulée ( **Gupta et al., 2002b; Bayot et al., 2008; Joo et al., 2013**).

#### **II-1-1 Origine des protéases**

Les protéases sont produites par divers organismes telles que : les plantes, les animaux et les microorganismes (**Boukour Touioui et al., 2018** ).

Les protéases d'origine microbienne représentent 40% des enzymes du marché mondial (**Agasthya et al., 2013**). 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 (**Bezawada et al., 2010**). Une large proportion des protéases commerciales disponibles, principalement les protéases neutres et alcalines sont dérivées de bactéries, particulièrement de souches de *Streptomyces* et *Bacillus* (**Agrahari et Wadhwa, 2012 ; Agasthya et al., 2013**). D'autre part, une large variété de protéases est également élaborée par les moisissures (**Tronchin et al., 2002**). Les enzymes d'origine fongique sont des enzymes extracellulaires, ce qui permet une séparation du mycélium du milieu de fermentation par une simple filtration (**Hajji et al., 2007 ; Hajji et al., 2010**).

## II-1-2 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 <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>. 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).

## II-1-3 Différentes classes de protéases

### ➤ Peptidases à sérine

Les endopeptidases et les exopeptidases à sérine représentent le groupe d'enzymes le plus répandu aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Ceci prouve qu'elles sont vitales pour l'organisme (Rao *et al.*, 1998a). De plus elles sont d'un intérêt considérable en industrie du fait de leur activité et stabilité à des pH alcalins. Les peptidases à sérine possèdent un mécanisme catalytique qui dépend du groupement hydroxyle d'un résidu sérine. Ce dernier agit comme un nucléophile qui attaque la liaison peptidique. Les peptidases à sérine étaient classées en deux super-familles, chymotrypsine et subtilisine (Barrett, 1979 ; Barrett, 1986). Ces peptidases ont une faible masse moléculaire (MM) entre 18 et 35 kDa à l'exception de la protéase de *Bacillus subtilis* qui fait 90 kDa et ont un optimum de pH de 7 à 12. Elles sont inhibées par le phénylméthylsulphonyl fluoride (PMSF) et le diisopropylfluorophosphate (DFP). Certaines peptidases à sérine sont également inhibées par le réactif à thiol p-chloromercuribenzoate (pCMB), du fait de la présence d'un résidu cystéine à proximité du site catalytique (Kalisz, 1988; Rawlings *et al.*, 1991; Siezen *et al.*, 1991)

### ➤ Peptidases à cystéine

On rencontre les protéases à cystéine chez les micro-organismes, les plantes et les animaux. Elles sont des composées d'au moins 4 super-familles (Barrett, 1986). La plus étudiée de ces protéinases est la



papaïne (EC 3.4.22.2), présente dans le latex de la plante *Carica papaya* et qui appartient à la super-famille à qui elle a donné son nom.

➤ **Peptidases à acide aspartique**

Les protéases à acide aspartique (EC 3.4.23) étaient divisées en deux super-familles, eucaryotes et rétrovirales, distinguées en fonction de leur taille et de leur source d'origine. La plupart de ces protéases atteignent un maximum d'activité à des pH bas (pH 3 à 4), leurs masses moléculaires (MM) varient de 30 à 45 kDa et elles sont inhibées par la pepstatine A (**Kumar et al., 2008; Wang et al., 2008b**).

Les peptidases à acide aspartique (mais aussi à métal) sont très différentes des peptidases à sérine, à cystéine et à thréonine, dans la mesure où le nucléophile qui attaque la liaison peptidique est une molécule d'eau activée.

➤ **Peptidases à métal**

Les protéases à métal (EC 3.4.24) sont largement distribuées parmi les bactéries, champignons et organismes supérieurs. Ces peptidases font partie des hydrolases pour lesquelles l'attaque nucléophile d'une liaison peptidique est réalisée par une molécule d'eau (caractéristique partagée avec les peptidases à acide aspartique). C'est un cation métallique bivalent, le plus souvent le zinc mais aussi parfois le cobalt ou le manganèse, qui active la molécule d'eau. Les collagénases des organismes supérieurs, les toxines hémorragiques de venin de serpent et la thermolysine de *Bacillus thermoproteolyticus* appartiennent à ce groupe. Les métalloprotéases les plus étudiées sont actives dans des conditions de pH légèrement alcalins (7,0 à 9,0), leur MM sont comprises entre 35 et 45 kDa (**Ghorbel-Frikha et al., 2005; Manni et al., 2008; Wang et al., 2008a, Jaouadi et al, 2009**).

➤ **Peptidases à thréonine**

Ce nouveau type catalytique est le dernier à être découvert à l'occasion des recherches effectuées sur les protéasomes. Un protéasome est un complexe de protéases impliquées dans la dégradation protéique cellulaire. Il est d'une grande importance pour la croissance et la viabilité de la cellule en raison de ses fonctions dans le cycle mitotique et dans le contrôle de la demi-vie de la plupart des protéines cellulaires.

La recherche chez les procaryotes de particules ressemblant au protéasome eucaryote a conduit à la découverte d'un complexe protéolytique chez *Thermoplasma acidophilum* (**Zwickl et al., 1992; Seemuller et al., 1995b**). Dans un premier moment, la particule était dénommée protéinase

multicatalytique (prosome) puis, le nom protéasome, a été ensuite adopté. Ce nom a été choisi pour décrire son activité protéolytique (« protéa-») mais aussi sa taille et sa complexité («-some »).

Les premières recherches sur les activités protéolytiques du protéasome ont conduit à des résultats controversés. Ceci découle du fait que même après les mutations de tous les résidus conservés du protéasome de *Thermoplasma*, à savoir les sérines, les deux résidus d'histidine, l'unique résidu de cystéine et les deux résidus d'acide aspartique, ce dernier présentait toujours une activité enzymatique. Cependant, la suppression de la thréonine N-terminale ou sa mutation par une alanine a conduit à l'inactivation totale de l'enzyme ( **Seemuller et al., 1995a; Orlowski et Wilk, 2000; Orlowski, 2001; Orlowski et Wilk, 2003**). Cela semblait indiquer que le protéasome n'appartient pas aux groupes de peptidases "classiques" et qu'il fait partie d'une nouvelle classe de peptidases où le résidu de la thréonine N-terminale fonctionne comme un nucléophile.

## II-2- Nomenclature et classification

Les recommandations pour la nomenclature des enzymes ont été regroupées dans une liste EC, 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. Les protéases ou peptidases sont des enzymes protéolytiques susceptibles de catalyser l'hydrolyse de protéines en peptides et acides aminés plus solubles. Dans certains cas, les enzymes sont hautement spécifiques et hydrolysent une unique liaison peptidique d'une protéine donnée. Dans d'autres cas, les peptidases hydrolysent plusieurs liaisons peptidiques qui présentent une séquence ou une conformation déterminée. Les peptidases sont nombreuses, représentant environ 2% de tous les produits géniques (**Rawlings et al., 2008**) et environ 10% des enzymes réunies dans la liste EC.

Selon le comité de nomenclature de l'IUBMB, les protéases appartiennent au sous-groupe 4 du groupe 3 (hydrolases) d'où l'adoption de 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).

## II-2-1- Classification selon le mode d'action

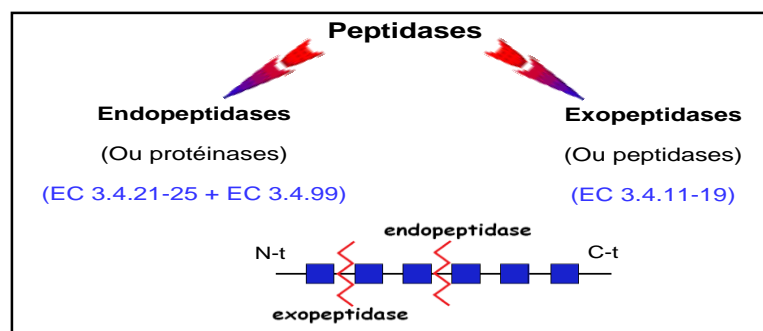
En se basant sur leur site d'action, les protéases sont divisées en deux groupes :

### ➤ Les exopeptidases :

qui réalisent une hydrolyse à partir soit de l'extrémité N-terminale (aminopeptidases), soit de l'extrémité C-terminale (carboxypeptidases) (**Fig. 2**).

### ➤ Les endopeptidases :

ou protéinases qui hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur de la chaîne peptidique (**Cavasin et al., 2004; Szeltner & Polgar, 2008**). Cette nomenclature est schématisée dans la **figure 3**.



**Figure 3 :** Schéma représentant la nomenclature des peptidases selon Barrett (1998) en endo et exopeptidases.

Les exopeptidases qui agissent au niveau d'une extrémité N-terminale peuvent libérer soit, un unique résidu d'acide aminé et sont alors dénommées aminopeptidases ([EC 3.4.11](#)) soit, un dipeptide ou un tripeptide et sont alors dénommées dipeptidyl-peptidases et tripeptidyl-peptidases ([EC 3.4.14](#)). 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 omega peptidases ([EC 3.4.19](#)) hydrolysent des liaisons peptidiques impliquant un résidu terminal d'acide aminé qui est modifié, cyclisé ou lié par des ponts iso-peptidiques (liaisons peptidiques différentes de celles entre un groupement  $\alpha$ -carboxyle et un groupement  $\alpha$ -amine). Les endopeptidases qui coupent les liaisons peptidiques à l'intérieur de la chaîne peptidique, sont subdivisées en sept 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), endopeptidases à acide glutamique (EC 3.4.23), endopeptidases à asparagine (EC 3.4.23), les endopeptidases à métal (EC 3.4.24) et les endopeptidases mixtes (EC 3.4.25) (van der Hoorn, 2008). A côté de ces sept sous-sous-classes définies, d'autres endopeptidases, dont leurs mécanismes catalytiques sont inconnus, sont regroupées dans une classe à part (sous-sous-classe EC 3.4.99).

### II-2-2- Classification selon la nature du résidu du site catalytique

Certains auteurs ont proposé de regrouper les peptidases qui sont similaires à la fois dans leur structure 3D et dans leur origine d'un point de vue évolutif (Barrett et al., 2001; Rawlings et al., 2008). Ce nouveau système de classification des peptidases est à la base de la banque de données MEROPS qui est disponible sur internet depuis 1996 (<http://www.merops.sanger.ac.uk/>). D'après ces auteurs, les peptidases sont classées en familles en fonction de l'homologie de séquences et de structure en aa et les familles sont regroupées en clans dans la mesure où il existe l'évidence qu'elles partagent une origine ancestrale commune. Ainsi, en se basant sur leur mécanisme catalytique, les endopeptidases sont subdivisées en sept sous-sous-classes distincts : les endopeptidases à sérine (EC 3.4.21) (36 familles regroupées en 12 clans), les endopeptidases à cystéine (EC 3.4.22) (65 familles regroupées en 9 clans), les endopeptidases à acide aspartique (EC 3.4.23) (16 familles regroupées en 5 clans), endopeptidases à acide glutamique (EC 3.4.23) (2 familles regroupées en 2 clans), endopeptidases à asparagine (EC 3.4.23) (7 familles regroupées en 5 clans), les endopeptidases à métal (EC 3.4.24) (71 familles regroupées en 14 clans) et les endopeptidases mixtes (EC 3.4.25) (45 familles regroupées en 5 clans).

### II-3- Applications biotechnologiques

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. Dans ce marché, les protéases représentent approximativement 40% (Gupta et al., 2002) dont la plus grande part est représentée par les protéases alcalines (Godfrey & Reichelt, 1985; Schafer et al., 2007). Les protéases alcalines bactériennes, notamment celles produites par le genre *Bacillus*, trouvent de nombreuses applications dans divers secteurs industriels (Gupta et al., 2002; Rao et al., 1998). Ce type d'enzymes est utilisé essentiellement dans les détergents pour les lessives, les tanneries pour le traitement de cuir, l'industrie alimentaire pour la fabrication des fromages et ses dérivés (Efimenko et al., 2008; Lalmanach, 2008), l'industrie pharmaceutique pour la synthèse peptidique, le traitement des rejets industriels (Ouoba et al., 2004; Toledo et al., 2006) et dans le traitement de la soie (Chen et al., 1991).

### **II-3-1- Détergence**

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 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 (**Nardello-Rataj et al., 2003; Richards et al., 2007**).

Les protéases utilisées dans les détergents de lessives comptent environ 40% du total des ventes mondiales d'enzymes (**Maurer, 2004**). Les protéases détergentes idéales devraient posséder :

- ✓ Une large spécificité au substrat pour faciliter l'élimination d'une grande variété de tâches dues aux aliments, au sang et aux sécrétions du corps.
- ✓ Une activité et une stabilité à des pH alcalins et des températures élevées.
- ✓ Une compatibilité avec les agents chélateurs et oxydants ajoutés aux détergents.

### **II-3-2- Tannerie**

Une tannerie est un atelier où des peaux d'animaux (bœuf, mouton, chèvre, cochon) sont traitées chimiquement et mécaniquement pour la production de cuir. Le produit utilisé dans l'opération de tannage peut avoir une origine naturelle (tanin en provenance de certaines essences forestières comme le chêne), ou bien être un produit chimique de synthèse. Dans la tannerie le nettoyage de la peau consiste à enlever la face extérieure (les poils et crasses) ainsi que la face intérieure. Par la suite, les peaux sont trempées dans des bassins contenant du tanin pendant une certaine période, puis elles sont retirées, lavées puis séchées.

Le traitement enzymatique en tannerie a été préféré aux méthodes conventionnelles qui requièrent l'utilisation de grandes quantités de produits chimiques polluants. Cette approche enzymatique présente de nombreux autres avantages: notamment, le contrôle facile et rapide du processus avec réduction des pertes (**Gupta et al., 2002; Tang et al., 2004**). Les protéases qui possèdent des activités élastolytiques et kératinolytiques peuvent être utilisées dans ce type d'industries. Les enzymes protéolytiques sont employées dans les trois étapes du traitement des cuirs : trempage, épilage ou pelanage et confitage (**Gupta et al., 2002**) et doivent présenter une bonne activité enzymatique à des températures allant de 25 °C à 35 °C (**Lageiro et al., 2007**). Elles permettent l'hydrolyse

sélective du constituant non collagèneux de la peau et la transformation des protéines non fibrillaires comme l'albumine et la globuline. Lors de l'étape de trempage les protéases sont employées pour la dégradation des protéines inter fibrillaires au niveau des peaux séchées, ce qui facilite l'absorption de l'eau et raccourcit le temps nécessaire à cette étape. L'utilisation des protéases durant l'étape d'épilage permet quant à lui d'améliorer les propriétés physiques de la peau et de réduire presque de moitié le temps de pelanage. Le dernier traitement protéolytique qui précède le tannage permet d'assouplir le cuir (**Zaraï Jaouadi et al. 2014**).

### II-3-3- Industrie alimentaire

#### La coagulation et la formation du coagulum :

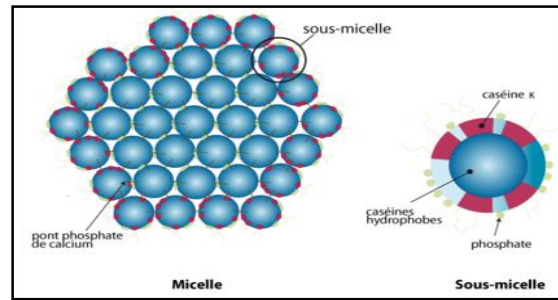
Le principe de la coagulation est le changement d'état du lait de liquide à semi solide qui est appelé gel ou coagulum (**Fig. 4**). Le produit se sépare alors en deux phases : le lactosérum et le coagulum (**Rivas et al., 2010**). Le lait possède des caséines responsables de la coagulation puisqu'elles sont responsables de la stabilité de la micelle ( **Shun-Tang et al., 1999; Lopez & Dufour, 2001**).



**Figure 4:** Schéma représentant le coagulum.

#### La micelle :

La micelle est un attroupelement de caséines alpha 1, alpha 2, bêta, kappa et upsilon. Elle se représente en forme de sphère qui possède une tête polaire hydrophile dirigée vers le solvant (ici l'eau) et une partie hydrophobe dirigée vers l'intérieur de cet agrégat (**Fig. 5**). La partie hydrophile est la partie glycosylée de la caséine kappa avec en plus du phosphate. La partie hydrophobe est composée des caséines alpha 1, alpha 2, bêta et upsilon reliées entre elles par des ponts de phosphate de calcium. Nous savons que les solutions colloïdales sont riches en micelles, ce qui est le cas pour le lait. Une micelle mesure de 20 à 300 nm ( **Slattery, 1976; Holt et al., 2013; Raynes et al., 2015**).



**Figure 5:** Représentation schématique d'une micelle et sous-micelle de caséine.

### Le colloïde :

Un colloïde est une substance sous forme de liquide semi-solide où les particules présentes sont en suspension et suffisamment petites pour que le liquide soit homogène. La cinétique ou vitesse de coagulation varie suivant plusieurs facteurs : les saisons, le pH du liquide, le stade de lactation, les facteurs génétiques et les techniques thermiques (**Moore et al., 1912; Payens, 1979**). Les micelles des caséines au pH du lait sont électriquement négatives. Elles entraînent donc une répulsion électrostatique due à leurs pôles non complémentaires. En étant le plus éloignées possibles, ces caséines assurent la neutralité du lait. Mais la coagulation est le résultat d'une diminution des forces électrostatiques et elle est produite de deux manières : par un élément acide ou par un agent coagulant comme les enzymes.

### La coagulation acide :

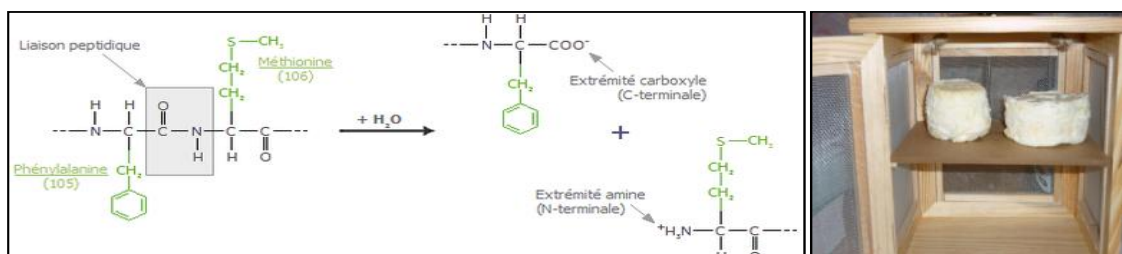
Grâce à un élément chargé positivement et contenant des ions  $H^+$ , les charges négatives des caséines sont neutralisées. L'acide va déshydrater la micelle, ces micelles vont donc se rapprocher. Elles se soudent entre elles avec des liaisons fortes et irréversibles. Ces liaisons sont le résultat d'interactions hydrophobes contenant dans ce réseau des globules gras, des microorganismes, des vitamines, du calcium, etc. On obtient un gel grâce à ces interactions. On note également que le sel diminue les répulsions électrostatiques (**Revis & Payne, 1907; Gustavsson et al., 2014**). Les particules peuvent donc entrer en contact, ce qui donne lieu à la floculation, et au mieux à la coagulation. La floculation est un rassemblement sous forme de petits flocons des particules d'une suspension colloïdale. Ce sont donc dans notre cas le rassemblement des micelles de caséine.

### La coagulation enzymatique :

Elle est réalisée grâce à un agent coagulant comme les agents biologiques qui sont les enzymes. Prenons l'exemple de la présure, enzyme constituée de chymosine et de pepsine recueillie dans le suc gastrique du veau, de l'agneau ou du chevreau. La pepsine est une enzyme du suc gastrique qui décompose les

protéines en peptides ( **Marth & Hussong, 1965;Brughera & Salvadori, 1969**). La présure hydrolyse la caséine kappa de charge négative et hydrophile. On obtient avec cette réaction deux dérivés : la caséino-macro-peptide hydrophobe et électriquement neutre, et le para-caséine-kappa hydrophile et électriquement négative. Les caséino-macro-peptides vont se lier entre eux avec des liaisons fortes grâce aux interactions électrostatiques dues à leur hydrophobie. Cette réaction est irréversible et donne un gel souple : le caillé présure. Dans cette technique, la vitesse de formation et de durcissement du coagulum augmente avec la température. Ce principe physique quant à la coagulation du lait est la première partie de la synérèse ( **Carlson et al., 1987; Brakoniecka Sikorska et al., 2003**).

L'utilisation des protéases d'origine animale dans l'industrie alimentaire remonte à l'antiquité. Elles ont été fréquemment employées pour différents buts tels que la fabrication du fromage, la préparation des hydrolysats de soja, et l'attendrissage de la viande. La majeure application des ces enzymes protéolytiques en industrie laitière demeure la fabrication du fromage. En effet, l'industrie fromagère emploie une quantité importante de protéases (**Rao et al., 1998**). Elles sont utiles pour la coagulation des protéines du lait. La présure de veau a longtemps été l'enzyme de choix pour cette procédure. Cependant, elle est de moins en moins utilisée car elle provient du système digestif de très jeunes veaux. Comme il n'est pas économiquement viable de tuer les veaux aussi jeunes, elle tend à être remplacée par des protéases microbiennes produites essentiellement par *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Endothica parasitica* *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti* et *Bacillus subtilis*. Les coagulants d'origine microbienne sont des enzymes protéolytiques produites par des microorganismes capables d'induire la coagulation du lait de manière similaire aux coagulants d'origine animale. Dans la fabrication du fromage, la fonction primaire des protéases est l'hydrolyse spécifique de la liaison peptidique entre les résidus de Phe105 et de Met106 de la caséine, pour générer la paracaséine  $\kappa$  insoluble et un macropeptide (**Fig. 6**), provoquant ainsi la coagulation du lait (**Chitpinityol et al., 1998**).



**Figure 6:** Schéma représentant la coagulation du lait.



#### **II-3-4- Industrie pharmaceutique**

Diverses protéases sont utilisées pour la production d'agents à usage thérapeutique. En effet, l'administration orale des protéases **Luzym** et **Nortase** produites par *Aspergillus oryzae* permet de corriger le syndrome lié aux déficits en enzymes lytiques. De même, la collagénase clostridiale est utilisée en combinaison avec un large spectre d'antibiotiques dans le traitement des brûlures et des blessures (**Atsumi & Ueha, 1983**). 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 (**Suzuki et al., 2005**). L'utilisation des protéases alcalines, ayant une activité fibrinolytique, dans le traitement des thromboses a été également rapportée (**Kim et al., 1996**).

#### **II-3-5- Traitement des rejets industriels**

Les protéases solubilisent les ordures de nature protéique et contribuent à la diminution de la demande biologique en oxygène dans les systèmes aquatiques. C'est pourquoi, les protéases alcalines ont été récemment utilisées dans la gestion des ordures de diverses industries et activités ménagères. Plusieurs chercheurs ont utilisé des protéases alcalines de microorganismes pour le traitement des déchets de volailles (plumes) qui représentent environ 5% de leur poids et qui représentent une source importante de protéines pour l'alimentation animale (**Anbu et al., 2004; Jain & Jain, 2010**).

#### **II-3-6- Traitement de la soie**

L'une des plus récentes exploitations des protéases concerne le traitement de la soie. Celle-ci est formée de deux types de fibres : les fibres de fibroïne (substance protéique blanche, douce et brillante) et les fibres de séricine (substance protéique raide et terne), ces dernières doivent être éliminées pour rendre la soie plus soyeuse (**Gupta et al., 2002**). Les fibres de séricines représentent 25% de la soie brute, elles sont d'ordinaire éliminées par immersion des fibres dans l'eau chaude savonneuse et légèrement alcaline (**Prasong et al., 2009**). Ce processus étant généralement coûteux, une méthode alternative suggérant l'utilisation des préparations enzymatiques, telles que les protéases, a été mis au point. Le traitement enzymatique consiste à placer les fibres dans une solution contenant l'**Alcalase** de Novozymes A/S à pH 8-9 et à une température de l'ordre de 55 °C à 60 °C (**Smith et al., 1966; Guang & Phillips, 2009**).

***Chapitre II :***  
***Matériel et méthode***

## **MATERIEL ET METHODES**

### **A- Matériel**

#### **I- MICROORGANISME**

La souche bactérienne TBS09 sujet du présent travail a été nouvellement isolée à partir d'un sédiment marin du port de pêche d'Arzew (Wilaya d'Oran, Algérie) (coordonnées GPS: 0° 18' 15.4" Est, 35° 50' 38.29" Nord). Elle a été identifiée en tant que *Pseudomonas fluorescens*.

#### **II- MILIEUX DE CULTURE**

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

##### **II-1- Milieu Luria-Bertani**

Le milieu Luria-Bertani (LB) est composé de 10 g peptone; 5 g NaCl ; 5 g extrait de levure et 0,3 ml NaOH 10 N dans un litre d'eau distillée (LB liquide) et s'il s'agit d'un milieu solide on doit ajouter 20 g/l d'agar (LB solide), dans les deux cas le pH est ajusté à 7,4. Ces milieux ont été utilisés, respectivement pour les précultures sur milieu liquide et les cultures sur boîtes de la souche de TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*.

##### **II-2- Milieu gélose nutritive au lait**

Le milieu gélose nutritive au lait (GNL) est composé de : 5 g peptone ; 3 g extrait de levure et 15 g d'agar dans 750 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté avec du NaOH à une valeur désirée. Après stérilisation et refroidissement, 250 ml du lait écrémé ont été ajoutés et le milieu est homogénéisé puis coulé dans des boîtes de Pétri. Le milieu GNL est utilisé pour le criblage des clones 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 d'halos transparents autour des colonies qui produisent des protéases.

##### **II-3- Milieu optimisé de production de protéases**

Ce milieu est composé de 10 g caséine ; 2 g extrait de bœuf; 2 g glucose ; 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 5 g NaCl et 1% (v/v) d'oligoéléments (en g/l : ZnCl<sub>2</sub>, 0,4 ; FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 2 ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,065 et MoNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,135) dans un litre d'eau distillée et le pH est ajusté à 7,4.

## **B- Méthodes**

### **I- CULTURE ET CONSERVATION DES BACTERIES**

#### **I-1- Conditions de culture**

La pré-culture de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* sur milieu optimisé de protéases est effectuée dans un Erlenmeyer de 250 ml avec un volume utile de 25 ml. L'incubation de la pré-culture se fait pendant une nuit à 30 °C et sous agitation de 160 rpm. Les cultures de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* sont réalisées dans des Erlenmeyers de 1000 ml avec un volume utile de 100 ml inoculés par un volume approprié ml de la pré-culture ayant une valeur de DO initial de 0,1. L'incubation de la culture se fait pendant 36 h à une température optimisée de 30 °C et sous agitation de 160 rpm.

#### **I-2- Conservation**

Pour la conservation, les meilleures souches retenues (TBS01, TBS03, TBS09, TBS11, TBS25 et TBS30) sont mises en culture dans un milieu liquide approprié, additionné ou pas d'antibiotique. La suspension cellulaire de chaque souche est mélangée avec du glycérol stérile à une concentration finale de 20% puis répartie dans des cryotubes pour être conservée à -80 °C pour la suite du travail.

### **II- DOSAGE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE**

L'activité protéolytique particulièrement l'activité caséinolytique, est mesurée dans le surnageant de culture de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*, ou de l'enzyme pure, en déterminant la concentration des peptides solubles dans l'acide trichloro-acétique (TCA) à la concentration finale de 66 g/l (**Kembhavi et al., 1993**). L'activité protéolytique est déterminée selon le protocole suivant :

- ✓ mélanger 0,5 ml d'une solution de caséine (10 g/l) dans le tampon acide 4-(2-hydroxy éthyl)-1-piperazine éthane sulfonique (HEPES) 100 mM à pH 7 en présence de 2 mM CaCl<sub>2</sub> (tampon A) avec 0,5 ml de la solution enzymatique préalablement diluée.
- ✓ incuber la réaction enzymatique à 60 °C pendant 15 min.
- ✓ arrêter la réaction par addition de 0,5 ml de TCA à 200 g/l (le TCA précipite la caséine non hydrolysée).
- ✓ incuber à température ambiante pendant 15 min.

- ✓ centrifuger le milieu réactionnel à 14000 rpm pendant 15 min.
- ✓ mesurer l'absorbance à 280 nm (correspond au maximum d'absorbance des aa).

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<sub>280 nm</sub> de 0,0022. L'activité protéasique (U/ml) est déduite à partir de l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité (U)} = \frac{\text{DO} \times \text{D} \times \text{d}}{\text{t} \times 0,0022}$$

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

**D** : dilution de l'enzyme.

**t** : temps de la réaction en minutes.

### III- PURIFICATION DE LA PROTEASE MPDZ

#### III-1- Extrait protéolytique à partir de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*

Les cellules bactériennes issues des cultures de 48 h de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* sont éliminées par centrifugation à 9000 rpm 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.

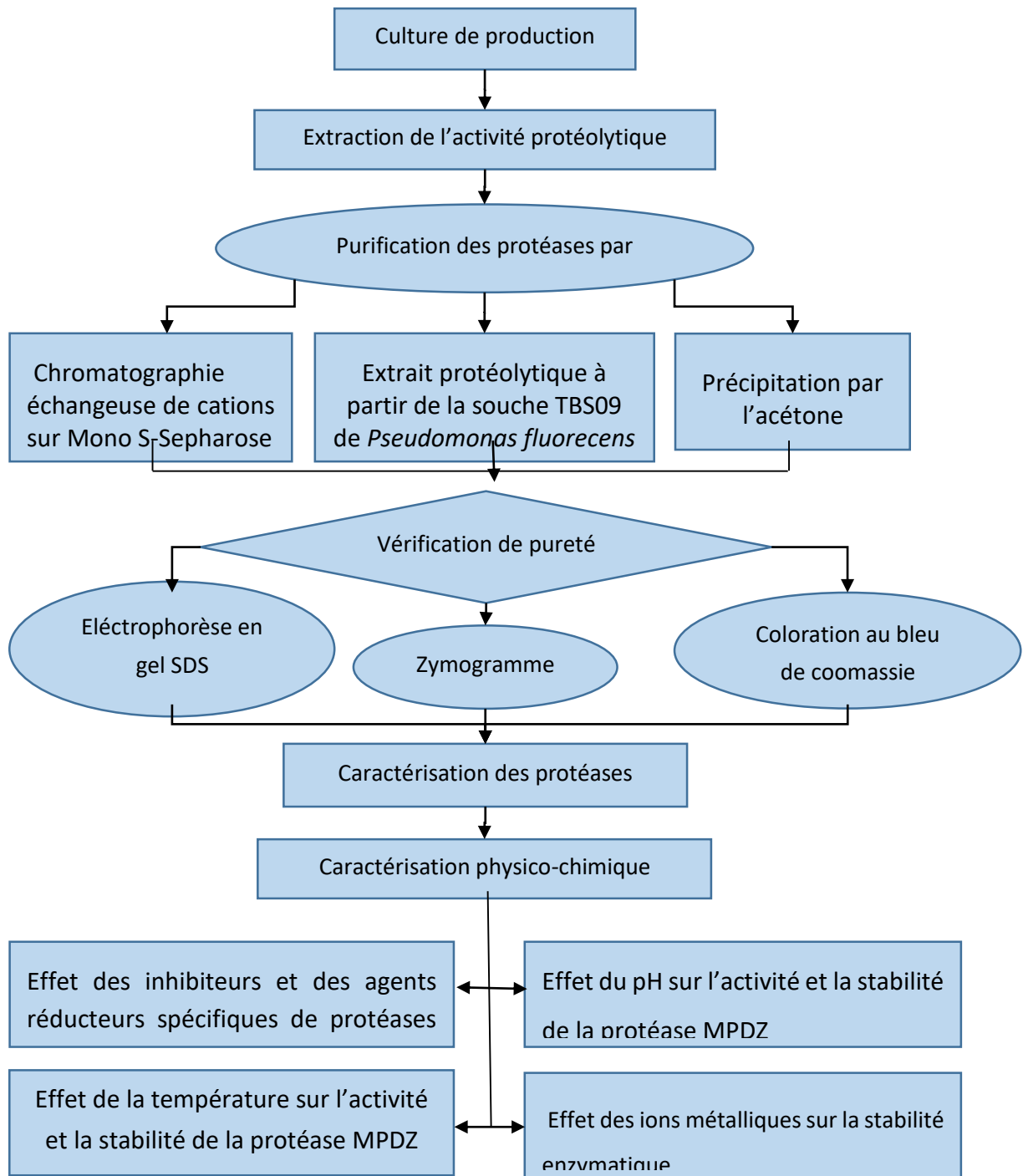
#### III-2- Précipitation par l'acétone

L'addition de l'acétone dans l'eau à une solution protéiques aqueuse entraîne la diminution de la constante diélectrique et donc de la solubilité des protéines. La précipitation par les solvants organiques est avantageuse par rapport à celle par les sels surtout dans l'étape de la migration sur gel. Pour éviter la dénaturation des protéines par l'acétone, la précipitation a été effectuée à basse température (-20°C). L'opération consiste à ajouter progressivement au surnageant préalablement centrifugé (13000 rpm, 15 min), de l'acétone fractionner (60-80 % v/v) sous une agitation lente à -20° C suivie d'une centrifugation pendant 30 min à 13000 rpm. Le culot est repris immédiatement dans le minimum du tampon A (Tris-HCl 100 mM, pH 8). La précipitation est une technique sélective utilisée pour purifier partiellement et concentrer les protéines solubles dans un surnageant.

### **III-3- Chromatographie échangeuse de cations sur Mono S-Sepharose**

C'est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs propriétés ioniques. Dans notre travail on a utilisé une colonne de Mono S-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Suède) ayant : un diamètre de 2,5 cm et une longueur de 50 cm, il s'agit d'une échangeuse de cations qui est capable de fixer des molécules chargées positivement, permettant de séparer des molécules chargées négativement qui vont passer à travers la colonne sans être retenues. Les molécules restées accrochées sur le gel ont été éluées par une solution de chlorure de sodium.

Chaque surnageant récupéré après l'étape de précipitation à l'acétone est alors déposé sur une colonne de Mono S-Sepharose, préalablement équilibrée avec le tampon C (50 mM MES + 2 mM ZnCl<sub>2</sub> à pH 6,2). L'éluion des protéines, avec le même tampon contenant une concentration croissante de NaCl de 0 à 500 mM, se fait à un débit de 40 ml/h et est suivie par la lecture de la DO à 280 nm (dosage de protéines) et le test d'activité protéasique.



**Figure 7:** Protocole expérimental de la production, extraction de purification et la caractérisation des protéases.

## **IV- METHODES ANALYTIQUES**

### **IV-1- Dosage des protéines par la méthode de Bradford**

Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford. 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 (**Bradford, 1976**). 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 permet d'estimer la quantité de protéine.

### **IV-2- Séparation des protéines sur gel d'acrylamide**

La pureté des deux enzymes 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, 1970**). On dépose dans le puits 50 µg de protéines. L'électrophorèse est menée à 100 mV et à ampérage constant.

### **IV-3- Coloration au bleu de Coomassie**

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, USA) dans 50 ml d'acide acétique, 250 ml d'éthanol et 200 ml H<sub>2</sub>O], le gel est ensuite transféré dans une solution de décoloration (acide acétique 100 ml ; éthanol 350 ml et 650 ml H<sub>2</sub>O). Le gel est stocké dans de l'eau avec 20% d'éthanol, ce qui achève la décoloration et évite l'apparition de bactéries, puis séché ou scanné.

## **V- CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA PROTEASE MPDZ**

### **V-1- Effet des inhibiteurs et des agents réducteurs spécifiques de protéases sur l'activité de la protéase MPDZ**

La MPDZ est incubée en présence de différents inhibiteurs spécifiques pendant 30 min et à température ambiante 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 : l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) ; l'acide éthylène glycol tétra-acétique (EGTA), le 1-10-Phenanthroline monohydrate, le phénylméthylsulphonyl fluoride (PMSF) ; le diisopropylfluorophosphate (DFP); l'inhibiteur trypsine de Soja (SBTI) ; le *N* $\alpha$ -*p*-tosyl L-phenylalanine chlorométhyl cétone (TPCK), le *N* $\alpha$ -*p*-tosyl L-lysine chlorométhyl cétone (TLCK), la benzamidine, l'acide 5,5-dithio-bis-(2-nitro benzoïque) (DTNB), le *N*-éthylmaléimide (NEM), le iodoacétamide, LD-dithiothreitol (LD-DTT) ; le 2-mercaptoethanol (2-ME) ; et la leupeptine et la pepstatine A.

### **V-2- Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la protéase MPDZ**

Les réactions d'hydrolyse de la caséine, par la protéase MPDZ, sont réalisées à des pH allant de 2 à 13 à 60 °C. Tous les tampons sont utilisés à des concentrations de 100 mM et en présence de 2 mM CaCl<sub>2</sub> : glycine-HCl pour les pH 2 à 5 ; HEPES pour les pH 6 à 8 ; Tris-HCl ou acide 2-(*N*-morpholino) éthane sulfonique (MES) pour les pH 8 à 9 ; glycine-NaOH pour les pH 9 à 11 ; bicarbonate-NaOH pour les pH 11 à 11,5 ; et Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH pour les pH 11,5 à 13. La protéase MPDZ purifiée est pré-incubée pendant 24 h à 60 °C à des pH variant de 4 à 11. Les activités résiduelles sont mesurées aux optima de pH et de température de l'enzyme.

### **V-3- Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la protéase MPDZ**

Le milieu réactionnel est maintenu à une valeur optimale de pH (7) et en faisant varier la température de 40 à 80 °C en présence ou en absence du zinc (2 mM).

La MPDZ a été incubée à 50, 60, 70 et 80 °C pendant 24 h, en présence ou en absence du zinc (2 mM). Un échantillon est prélevé à des intervalles de temps réguliers pour doser les activités résiduelles dans les conditions standard de dosage de l'enzyme.

### **V-4- Effet des ions métalliques sur la stabilité enzymatique**

L'activité protéolytique est testée à pH 7 et à 50 °C pendant 1 h, en absence (contrôle contenant 1 mM EGTA, agent chélateur) ou en présence de 2 mM de sels de métaux bivalents: Zn<sup>2+</sup> (ZnCl<sub>2</sub>) ; Ca<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub>) ; Co<sup>2+</sup> (CoCl<sub>2</sub>) ; Mn<sup>2+</sup> (MnCl<sub>2</sub>) ; Mg<sup>2+</sup> (MgCl<sub>2</sub>) ; Ba<sup>2+</sup> (BaCl<sub>2</sub>) ; Cu<sup>2+</sup> (CuCl<sub>2</sub>) ; Fe<sup>2+</sup> (FeCl<sub>2</sub>) ; Hg<sup>2+</sup> (HgCl<sub>2</sub>) ; Ni<sup>2+</sup> (NiCl<sub>2</sub>), Cd<sup>2+</sup> (CdCl<sub>2</sub>) et monovalent : Na<sup>+</sup> (NaCl) ; K<sup>+</sup> (KCl) et Li<sup>+</sup> (LiSO<sub>4</sub>) puis les activités résiduelles sont mesurées aux conditions optimales de l'enzyme MPDZ.

### V-5- Détermination du degré d'hydrolyse des protéases MPDZ, chymosine et Mucorpepsine

L'hydrolyse des protéines, contenues dans la caséine, est réalisée à 50 °C et à pH 7. Le pH est maintenu constant pendant l'hydrolyse par ajout de NaOH 4 N. 4 g de caséine sont dissout dans 100 ml de tampon A (100 mM HEPES + 2 mM CaCl<sub>2</sub> à pH 7) puis traités par la MPDZ, chymosine et Mucorpepsine (500 U). La quantité de soude nécessaire pour maintenir le pH constant est proportionnelle au degré d'hydrolyse (DH). La digestion enzymatique est arrêtée quand le DH devient constant. Le degré d'hydrolyse DH est défini comme étant le pourcentage de liaisons peptidiques coupées par rapport au nombre total de liaisons peptidiques (**Adler-Nissen, 1986**).

$$DH = \frac{\text{Nombre de liaisons peptidiques coupées}}{\text{Nombre total de liaisons peptidiques}} \times 100 \quad \text{ou} \quad DH = \frac{h}{htot}$$

La relation entre le DH et la consommation de base est donnée par l'équation suivante :

$$DH = \frac{B \times Nb}{MP} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{htot} \times 100\%$$

où : **B** : consommation de la base, en litres ;

**Nb** : Normalité de la base ;

**MP** : Masse de protéines (N × facteur Kjeldahl) en Kg ; **α** : degré de dissociation ;

**htot** est défini comme étant le nombre total de liaisons peptidiques de la protéine (en grammes équivalent par Kg).

Les valeurs de α et htot sont données par les fiches techniques des enzymes "Novo".

### V-6- Propriétés physico-chimiques de coagulum issu de MPDZ, chymosine et Mucorpepsine

#### V-6-1- Coagulation du lait par les protéases MPDZ, chymosine et Mucorpepsine

Différentes concentrations des protéases MPDZ, chymosine et Mucorpepsine ont été ajoutés dans 5 ml de lait écrémé Vitalait et ont été incubés à l'étuve 37 °C pendant 24 h pour déterminer leurs activités coagulantes. Des observations du processus de la coagulation ont été effectuées au cours du temps d'incubation.

### **V-6-2- Propriétés physico-chimique des coagulums issues de traitement par les enzymes MPDZ, chymosine et Mucorpepsine**

Les caractéristiques organoleptiques des échantillons anonymes de pâte molle étaient jugées individuellement par 3 ou 4 experts après 20 jours d'affinage, puis tous les 10 jours, jusqu'à 50 jours. Les jugements portaient sur la fleur, la coupe, la texture et la flaveur, notées en fonction d'une grille. Les caractéristiques organoleptiques des emmentals étaient notées après un mois de stockage en cave froide par un jury de 8 à 9 experts suivant la forme, le croûtage, l'ouverture, la pâte et la flaveur étaient notés sur les fromages coupés (De plus, il était demandé aux mêmes experts de noter à nouveau comparativement la texture et la flaveur de chaque fromage sur les échantillons réduits en cubes. (Perrod and Quiblier 1987))

***Chapitre III :***  
***Résultats et***  
***Discussion***

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats présentés dans notre travail sont tirés des travaux précédents de **Boulkour Touioui et al. (2017)** et (**Boulkour Touioui, 2018**).

### ***I- RAPPEL DES RESULTATS ANTERIEURS***

Plusieurs souches microbiennes ont été nouvellement isolées à partir de différent biotopes de la Tunisie et de l'Algérie. Parmi cette collection microbienne, la souche TBS09 nouvellement isolée du port de pêche d'Arzew à Oran (Algérie) à été retenu pour son activité protéolytique intéressante (**Fig. 8**). La souche TBS09 a été identifiée moyennant les techniques de taxonomie classique (galleries API 20 E et API 50 CH) et moléculaire (séquençage du gène de l'ARNr 16S, sous le numéro d'accès GenBank : KY490089) en tant que *Pseudomonas fluorescens*. Le gène, nommé *mpDZ* (2 kb), codant pour la protéase MPDZ a été cloné, séquencé et exprimé au niveau de l'espace extracellulaire chez *E. coli* HB101. L'analyse de la séquence nucléotidique (sous le numéro d'accès GenBank : KY490090) montre une phase de lecture ouverte (ORF) de 1431 pb (477 aa) qui code pour un pro-peptide de 39 pb (13 aa) et une protéase mature de 1392 pb (464 aa), biologiquement active. Ce travail a été effectué par Dr. Souraya BOUKOUK TOUIOUI (LCSN-BIoMol-Université Blida 1) (**Boulkour Touioui et al., 2018**).



**Figure 8:** Site d'échantillonnage de la souche TBS09 (A) et mise en évidence d'activité protéolytique produite par la souche bactérienne TBS09 sur gélose nutritive au lait (test-semi qualitatif) (B).

## II- OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE PROTEASES PAR LA SOUCHE TBS09 DE PSEUDOMONAS FLUORECENS

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 (Souissi *et al.*, 2008; Zarái Jaouadi *et al.*, 2012). 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 (Ku *et al.*, 2009; Jaouadi *et al.*, 2013). Il doit également contenir des substances inductrices de la production d'enzymes et des facteurs de croissance, susceptibles d'intervenir dans le métabolisme des substrats utilisés (Akolkar *et al.*, 2009; Zarái Jaouadi *et al.*, 2013).

Au cours de cette partie, nous nous sommes proposé d'évaluer la production de protéase(s) par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*. Au fait nous avons commencé par un milieu initial (non optimisé) composé de : 5 g/l source de carbone ; 1 g/l source d'azote ; 0,5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0,5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à pH 7,4. A partir de ce milieu nous avons alors cherché à optimiser les différents composants.

### II-1- Effet de différentes sources de carbone sur la production de protéase(s)

La production de protéases par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* a été testée sur le milieu de base additionné de différentes sources de carbone : caséine, gélatine, glucose, galactose, fructose et lactose à raison de 5 g/l. Le niveau de production de protéases, de la croissance de la souche ainsi que le pH final de la culture ont été déterminés et l'ensemble des résultats sont consignés dans le (tableau 1).

**Tableau 1:** Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de protéase(s) par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*.

Source de carbone (5 g/l)	Témoin sans addition	Caséine	Glucose	Galactose	Gélatine	Fructose	Lactose
Activité protéase (U/ml)	295	1910	500	1100	1322	544	500
Absorbance à 600 nm	2,88	5,22	4,01	5,80	4,23	5,10	6,10
pH final	5,45	6,75	6,01	6,25	7,10	5,02	6,32

L'analyse des résultats présentés sur ce tableau, met en évidence une bonne croissance de la souche TBS09 sur les différents substrats carbonés testés. En effet, une meilleure production (environ 1910 U/ml et 1322 U/ml) et une croissance significative (absorbance à 600 nm de 6,75 et 7,10) sont observées sur milieu à base, respectivement, de caséine et de gélatine. Par conséquent, la caséine et la gélatine constituent les meilleures sources de carbone et d'énergie, respectivement les plus adéquates pour une telle production et croissance. Ce qui nous amène à supposer l'existence de substances bioactives et d'induction dans la caséine et la gélatine favorisant la production de protéases par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*.

## II-2- Effet de la concentration de la caséine sur la production de protéase(s)

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 15 g/l) afin de déterminer la concentration optimale pour la production de protéase(s) sur milieu contenant : 1 g/l d'extrait de levure; 1 g/l  $K_2HPO_4$  et 1 g/l  $KH_2PO_4$  à pH 7,4 (**Tableau 2**).

**Tableau 2 :** Optimisation de la concentration de caséine sur la croissance bactérienne et sur la production de protéase(s) par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*.

Concentration de la caséine (g/l)	0	2	5	8	10	12	15
Activité protéase (U/ml)	296	904	1200	2150	<b>2750</b>	2400	1800
Absorbance à 600 nm	2,70	4,89	5,56	6,01	<b>6,98</b>	6,05	5,86
pH final	5,91	6,84	6,90	7,08	<b>7,17</b>	7,66	7,33
Rendement (U protéase/g de caséine ajouté)	0	452	240	268	<b>275</b>	240	120

Les résultats présentés sur ce tableau montrent que la croissance bactérienne et la production de protéases augmentent avec la concentration en caséine jusqu'à 10 g/l. En effet, l'augmentation de la production est significative pour des concentrations supérieures à 5 g/l et atteint un maximum de 2750 U/ml à 10 g/l.

Donc la meilleure concentration de caséine pour la production de protéase(s) par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* est de 10 g/l.

## II-3- Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéase(s)

L'effet de différentes sources d'azote organique (extrait de bœuf, extrait de levure et peptone de soja) et inorganique [sulfate d'ammonium  $(NH_4)_2SO_2$ , nitrate de sodium  $(NaNO_3)$  et chlorure d'ammonium  $(NH_4Cl)$ ] sur la croissance et la production de la protéase par la souche TBS09

de *Pseudomonas fluorescens* a été étudié, à une concentration de 1 g/l, en comparaison à une culture témoin sans source d'azote (**Tableau 3**).

**Tableau 3:** Effet de différentes sources d'azote sur la croissance bactérienne et sur la production de protéase(s) par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*.

Source d'azote (1 g/l)	Témoin sans addition	Extrait de bœuf	Extrait de levure	Peptone de soja	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	NaNO <sub>3</sub>
Activité protéase (U/ml)	301	952	2852	<b>3580</b>	2000	1263	569
Absorbance à 600 nm	3,11	5,23	5,85	<b>7,55</b>	5,13	6,07	4,25
pH final	6,42	7,28	6,45	<b>7,80</b>	7,02	7,56	5,25

L'analyse des résultats présentés sur ce tableau 3 montre que la meilleure production de protéase(s) par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* (3580 U/ml) est obtenue lorsque la peptone de soja est utilisée comme source d'azote.

Ainsi, le peptone de soja sera utilisé comme source d'azote dans la suite de ce travail.

#### II-4- Effet de la concentration d'extrait de bœuf sur la production de protéase(s)

La concentration de peptone de soja comme source d'azote a été optimisée sur milieu initial à des concentrations allant de 0 à 5 g/l (**Tableau 4**).

**Tableau 4:** Optimisation de la concentration d'extrait de bœuf sur la croissance bactérienne et sur la production de protéase(s) par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*.

Concentration d'extrait de bœuf (g/l)	0	1	2	3	4	5
Activité protéase (U/ml)	299	3585	<b>4250</b>	3927	3104	2861
Absorbance à 600 nm	3,02	7,57	<b>7,78</b>	7,56	7,01	6,95
pH final	6,50	7,84	<b>7,92</b>	7,22	6,56	7,01
Rendement (U de protéase/g de d'extrait de bœuf ajouté)	0	3585	<b>2125</b>	1309	776	572

L'analyse des résultats montre qu'il ya une meilleure production de protéase(s) avec la concentration en extrait de bœuf et atteint 4250 U/ml pour une concentration de 2 g/l. Ces résultats montrent également une augmentation de la biomasse (DO à 600 nm = 7,92) avec la concentration en extrait de bœuf jusqu'à 2 g/l.



## II-5- Optimisation de la concentration en $K_2HPO_4$ , $KH_2PO_4$ NaCl et en oligoéléments sur la production de protéase(s)

Afin de mettre en évidence l'importance du calcium, de magnésium, du phosphore, du potassium et d'oligoéléments nous avons étudié l'effet de concentrations croissantes en glucose, en  $K_2HPO_4$  en  $KH_2PO_4$  et NaCl de 0 à 10 g/l et d'oligoéléments de 0 à 10% sur la production de l'activité protéase par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*. Cette étude a montré, que la production de l'activité protéase est optimale (5000 U/ml) pour les concentrations de 1 g/l en  $K_2HPO_4$ ; 1 g/l en  $KH_2PO_4$ , 5 g/l en NaCl et de 1% d'oligoéléments. Au-delà de ces concentrations, le niveau de production et de biomasse diminuent comparativement avec les travaux sur la production de protéases à partir de la souche CTM50182 de *Pseudomonas aeruginosa* (Jaouadi et al., 2013), de la souche MCM B-326 de *Bacillus cereus* (Nilegaonkar et al., 2007), de la souche SV1 de *Bacillus cereus* (Manni et al., 2008), de la souche VITSN04 de *Bacillus cereus* (Sundararajan et al., 2011) et de la souche CBS de *Bacillus pumilus* (Jaouadi et al., 2009; Jaouadi et al., 2008).

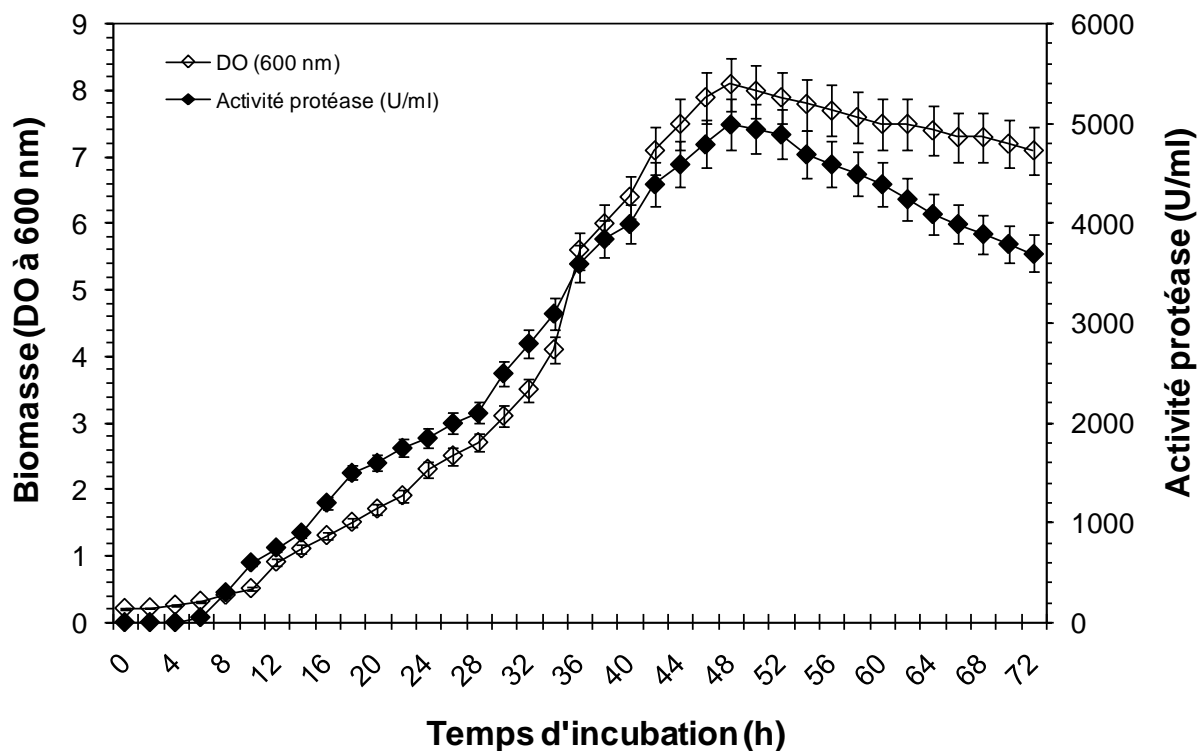
A la lumière de cette optimisation, un nouveau milieu de composition (en g/l) : 10 caséine ; 2 extrait de bœuf; 2 glucose ; 1  $K_2HPO_4$  ; 1  $KH_2PO_4$  ; 5 NaCl et 1% (v/v) d'oligoéléments [en (g/l):  $ZnCl_2$ , 0.4;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2;  $H_3BO_3$ , 0.065 et  $MoNa_2O_4 \cdot 2H_2O$ , 0.135] à pH 7,4 a été retenu pour la suite du travail puisqu'il permet une meilleure croissance (DO à 600 nm = 8,1) et une meilleure production de protéase(s) (5000 U/ml).

## III\_CINETIQUE DE PRODUCTION DE PROTEASES ET DE CROISSANCE BACTERIENNE DE LA SOUCHE TBS09

La culture de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* a été incubée à une température optimisée de 30 °C dans des Erlenmeyer de 1000 ml avec un volume utile de 100 ml et sous une agitation optimisée de 160 rpm. Des dosages d'activité protéolytique et de l'absorbance sont effectués chaque 2 h (Fig. 9).

Le suivi de production de protéases et de la croissance bactérienne de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* en fonction du temps, montre que la sécrétion de protéases 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 (5000 U/ml) après 48 h de culture avec une DO à 600 nm d'environ 8,1. Ainsi, le maximum de croissance coïncide avec le maximum d'activité

enzymatique. Au-delà de cette période, la production commence à diminuer légèrement (**Fig. 9**). Cette diminution est probablement due à l'action protéolytique d'autres protéases libérées lors de la lyse cellulaire et/ou la sporulation.



**Figure 9:** Cinétique de production de protéases et de croissance bactérienne de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*.

#### **IV- PURIFICATION DE LA PROTEASE MPDZ PRODUITE PAR LA SOUCHE TBS09 DE PSEUDOMONAS FLUORECENS**

##### **IV-1- Extrait protéolytique à partir de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens***

Le surnageant de culture de 500 ml de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* après 48 h de croissance sur le milieu optimisé constitue l'extrait enzymatique brut. Ce surnageant présente une activité protéolytique spécifique de 427 U/mg. Le protocole expérimental de purification de cette protéase comporte deux étapes : une précipitation fractionnée par l'acétone (60-80%) suivie d'une chromatographie échangeuse de cations sur Mono S-Sepharose.

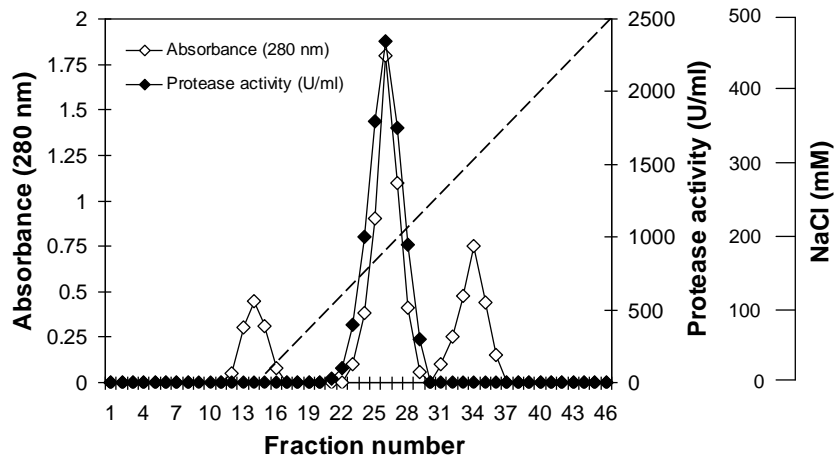
##### **IV-2- Précipitation fractionnée par l'acétone**

Le surnageant récupéré, contenant l'activité protéolytique, est clarifié par filtration à travers

une membrane de 0,45  $\mu\text{m}$ . Les protéines contenues dans le surnageant récupéré sont précipitées au sulfate d'ammonium entre 60 et 80%. Les protéines précipitées à 60% ne contiennent pas l'activité protéolytique alors que le culot obtenu à 80%, contenant l'activité, est récupéré dans le minimum du tampon Tris-HCl 100 mM (pH 8) contenant 2 mM  $\text{ZnCl}_2$  (**Tampon B**) puis dialysé contre le même tampon pendant une nuit à 4 °C. Le rendement d'activité protéolytique de cette étape est de 85% avec un facteur de purification de 3,4 fois et une AS = 1482 U/mg (**Tableau 5**).

#### IV-3- Chromatographie échangeuse de cations sur Mono S-Sepharose

Le surnageant récupéré après l'étape de précipitation à l'acétone est alors déposé sur une colonne de Mono S-Sepharose, préalablement équilibrée avec le tampon C (50 mM MES + 2 mM  $\text{ZnCl}_2$  à pH 6,2). L'élution des protéines est effectuée avec le même tampon avec un débit de 40 ml/h. Des fractions de 5 ml sont collectées et analysées par spectrophotométrie à 280 nm et de l'activité protéolytique sur la caséine. L'ensemble des résultats est illustré sur la (**figure 10**).

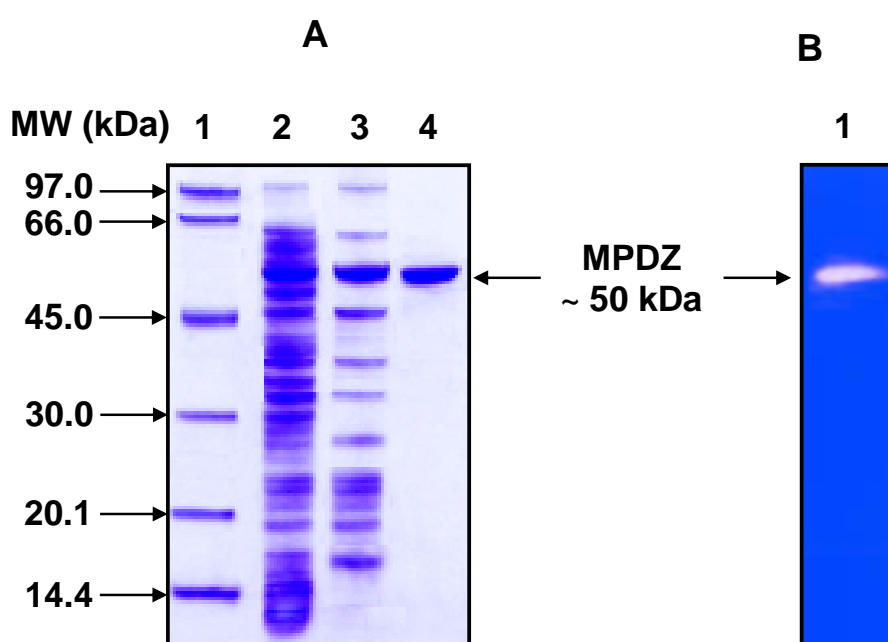


**Figure 10:** Profils d'élution de la fraction active après sortie d'une chromatographie échangeuse de cations sur Mono S-Sepharose de l'activité protéase de l'enzyme MPDZ produite par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*. La colonne Mono S-Sepharose (2.6 cm  $\times$  50 cm) est pré-équilibrée par le tampon B. Le débit d'élution est de 40 ml/h et la détection des protéines se fait à 280 nm.

Le profil d'éluion, présenté sur la figure 10, montre que l'enzyme pure MPDZ est éluée à une concentration de 140 – 200 mM NaCl. Les fractions actives sont rassemblées et utilisées pour la caractérisation biochimique de cette enzyme. Le rendement en activité protéolytique est de 53%. Les fractions de ce pic sont rassemblées et passées sur une unité d'ultrafiltration de 30 kDa ce qui a pour but la concentration et le dessalement de l'échantillon. Les fractions, contenant l'activité protéase, sont rassemblées et utilisées pour la caractérisation biochimique de cette enzyme.

#### IV-4- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes

Afin d'évaluer le degré de pureté de la protéase MPDZ et de déterminer sa masse moléculaire, nous avons analysé des aliquotes qui ont été conservées après chaque étape de purification et ont servi pour l'analyse par électrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide (10%) dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE) (**Fig. 11**).



**Figure 11:** (A) Profil des étapes de purification, dans les conditions dénaturantes (50  $\mu$ g) sur SDS-PAGE à 10%, de la protéase MPDZ à partir de la culture de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*. Piste 1: Marqueur de taille LMW (Amersham). Piste 2: Extrait brut. Piste 3: Fraction du culot (précipité) après précipitation par l'acétone de 60 à 80%. Piste

4: Pic de la fraction pure de la protéase MPDZ éluée entre 140 à 200 mM de la sortie Mono S-Sepharose. (B) Zymogramme sur caséine de la fraction de la protéase MPDZ pure (50 µg).

Le profil électrophorétique ci-dessus montre que la protéase se présente sous une seule bande majoritaire et homogène de masse moléculaire apparente de 50 kDa. Ce qui confirme qu'il s'agit d'une protéine monomérique comme il a été trouvé chez d'autres protéases de la souche CTM50182 de *Pseudomonas aeruginosa* (Jaouadi et al., 2013), de la souche SV1 de *Bacillus cereus* (Manni et al., 2008), de la souche DZ100 de *Bacillus circulans* (Benkiar et al., 2013) et de la souche CBS de *Bacillus pumilus* (Jaouadi et al., 2008) et de la souche US575 de *Brevibacillus brevis* (Zaraï Jaouadi et al., 2013).

#### IV-6- Bilan de purification

Le bilan de purification de la MPDZ est représenté dans le tableau ci-dessous.

D'après ces résultats, la protéase MPDZ produite par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*, a été purifiée à homogénéité à partir du milieu de culture en trois étapes, avec un facteur de purification de 77,8 fois et un rendement de 53%. L'activité spécifique de l'enzyme pure, sur la caséine, est de 33250 U/mg.

**Tableau 5:** Bilan de purification à homogénéité de la protéase MPDZ produite par la souche *Bacillus cereus* BX35 après 36 h de culture sur milieu optimisé.

Etape de purification	Activité totale (U) × 10 <sup>4</sup>	Quantité totale de protéines (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement de purification (%)	Facteur de purification (fois)
Extrait brut	250 ± 14	5850 ± 90	427	100	1
Précipitation fractionnée par l'acétone (60-80%)	212 ± 12	1430 ± 27	1482	85	3,4
Mono S-Sepharose	133 ± 10	40 ± 27	33250	53	77,8

Cette activité spécifique est supérieure à celle trouvée dans les mêmes conditions que la protéase SAPB produite par la souche CBS de *Bacillus pumilus* qui est de 21500 U/mg (Jaouadi et al., 2008) et moins inférieure à celle trouvée pour la protéase de la souche SV1 de *Bacillus cereus* (Manni et al., 2008) qui est de 246612 U/mg et la souche CTM50182 de *Pseudomonas aeruginosa* (Jaouadi et al., 2013) qui est de 97526 U/mg.

#### IV-7- Séquençage de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale

La séquence de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale est en cours de réalisation à l'Unité de Service Commun pour la Recherche (USCR) "Séquenceur de Protéines" à la Faculté des Sciences de Sfax, sous la direction du Pr. Hafedh MEJDOUB.

### V- CARACTERISATION DE LA PROTEASE MPDZ A PARTIR DE LA SOUCHE DE TBS09 DE PSEUDOMONAS FLUORECENS

L'utilisation des protéases qui catalysent les réactions dans des conditions extrêmes (haute température, pH élevé, etc) présente une grande importance pour plusieurs applications industrielles. Ainsi, on est amené à déterminer aussi bien l'effet des inhibiteurs et de quelques ions métalliques sur cette activité et stabilité de la protéase pure MPDZ et à étudier la température que le pH optimum d'action de cette enzyme. Nous avons également étudié l'effet de certains polyols et solvants organiques sur la stabilité protéolytique ainsi que la détermination des paramètres cinétiques et d'autres propriétés de cette nouvelle protéase coagulante du lait.

#### V-1- Effet des inhibiteurs et des agents réducteurs spécifiques des protéases sur l'activité protéolytique

On s'est intéressé à connaître le résidu clé impliqué dans l'activité catalytique de la protéase MPDZ. Pour cela, on a testé l'effet de plusieurs réactifs chimiques spécifiques sur l'activité de la protéase MPDZ (**Tableau 6**).

**Tableau 6:** Effet de différents inhibiteurs et des agents réducteurs sur la stabilité de la protéase MPDZ purifiée à partir de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* (en respectant un rapport molaire inhibiteur/protéase = 100).

Inhibiteur/agent réducteur	Spécificité	Concentration	Activité résiduelle (%)
Témoin		–	100 ± 2,5
EGTA	Inhibiteur spécifique des métalloprotéases	2 mM	3 ± 0,2
EDTA		10 mM	15 ± 0,7
1,10-Phenanthroline monohydrate	Inhibiteur spécifique de zinc	10 mM	2 ± 0,1
Sel disodique de phosphoramidon		10 µM	45 ± 1,1
PMSF		5 mM	101 ± 2,5

<b>DFP</b>	Inhibiteurs spécifiques des protéases à sérine	5 mM	99 ± 2,5
<b>TLCK</b>	Inhibiteur spécifique des protéases trypsine-like	1 mM	97 ± 2,4
<b>TPCK</b>	Inhibiteur spécifique de la chymotrypsine	1 mM	96 ± 2,4
<b>Benzamidine</b>	Inhibiteur compétitive des protéases à sérine	2 mM	100 ± 2,5
<b>Aprotinine bovine</b>		30 µM	98 ± 2,5
<b>MIA</b>		30 µM	101 ± 2,5
<b>SBTI</b>	Inhibiteur spécifique de la trypsine	2 mg/ml	99 ± 2,5
<b>DTNB</b>	Inhibiteurs de protéases à cystéine ou à groupement thiol	10 mM	90 ± 2,2
<b>EPNP</b>		5 mM	97 ± 2,4
<b>NEM</b>		2 mM	63 ± 1,8
<b>Iodoacétamide</b>		5 mM	54 ± 1,5
<b>Glutathione</b>		5 mM	97 ± 2,5
<b>L-Cystéine</b>		5 mM	96 ± 2,4
<b>2-ME</b>		Agents réducteurs des ponts disulfures	2 mM
<b>LD-DTT</b>	5 mM		93 ± 2,3
<b>Leupeptine</b>	Inhibiteurs de protéases à acides aspartiques	50 µg/ml	100 ± 2,5
<b>Pepstatine A</b>		1 µg/ml	98 ± 2,5

Les résultats présentés dans le tableau permettent de tirer les conclusions suivantes :

- l'EDTA, l'EGTA et le 1-10-Phenanthroline monohydrate, qui sont des inhibiteurs potentiels des métalloprotéases, inhibent complètement l'activité protéolytique. Ceci confirme que la protéase MPDZ appartient à la famille des métalloprotéases.
- l'activité protéasique n'est pas inhibée par les inhibiteurs à cystéine de types DTNP, NEM et iodoacétamide, ce qui témoigne l'absence d'un groupement thiol (-SH) dans la structure de cette protéine.
- les autres inhibiteurs n'ont pas d'effet ou à effet négligeable. A la lumière de ces résultats, nous pouvons déduire que l'enzyme MPDZ est un membre de la famille des métalloprotéases.

## V-2- Effet des ions métalliques sur la stabilité de la MPDZ

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 (Boukour Touioui et al., 2018; Jaouadi et al., 2013; Marquart et al., 2005). Ainsi, l'effet de quelques ions métalliques sur l'activité protéase a été étudié à pH 7 et à 60 °C. Les résultats sont consignés dans le tableau 7.

**Tableau 7:** Effet de différents ions métalliques (à 2 mM) sur la stabilité de la protéase MPDZ purifiée à partir de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*.

Ion métallique (2 mM)	Activité protéase résiduelle (%)
<b>Témoin</b>	100 ± 2,5
Zn <sup>2+</sup> (ZnCl <sub>2</sub> )	250 ± 5,1
Ca <sup>2+</sup> (CaCl <sub>2</sub> )	190 ± 4,2
Co <sup>2+</sup> (CoCl <sub>2</sub> )	125 ± 3,0
Mn <sup>2+</sup> (MnCl <sub>2</sub> )	116 ± 2,7
Mg <sup>2+</sup> (MgCl <sub>2</sub> )	110 ± 2,6
Ba <sup>2+</sup> (BaCl <sub>2</sub> )	99 ± 2,5
Cu <sup>2+</sup> (CuCl <sub>2</sub> )	81 ± 1,7
Fe <sup>2+</sup> (FeCl <sub>2</sub> )	41 ± 1,1
Hg <sup>2+</sup> (HgCl <sub>2</sub> )	0 ± 0,0
Ni <sup>2+</sup> (NiCl <sub>2</sub> )	0 ± 0,0
Cd <sup>2+</sup> (CdCl <sub>2</sub> )	0 ± 0,0
Na <sup>+</sup> (NaCl)	100 ± 2,5
K <sup>+</sup> (KCl)	100 ± 2,5
Li <sup>+</sup> (LiSO <sub>4</sub> )	100 ± 2,5

Les résultats dans le tableau montrent que la protéase est totalement inactivée en présence de

présentés dans le tableau 7 que la MPDZ est inactivée en nickel

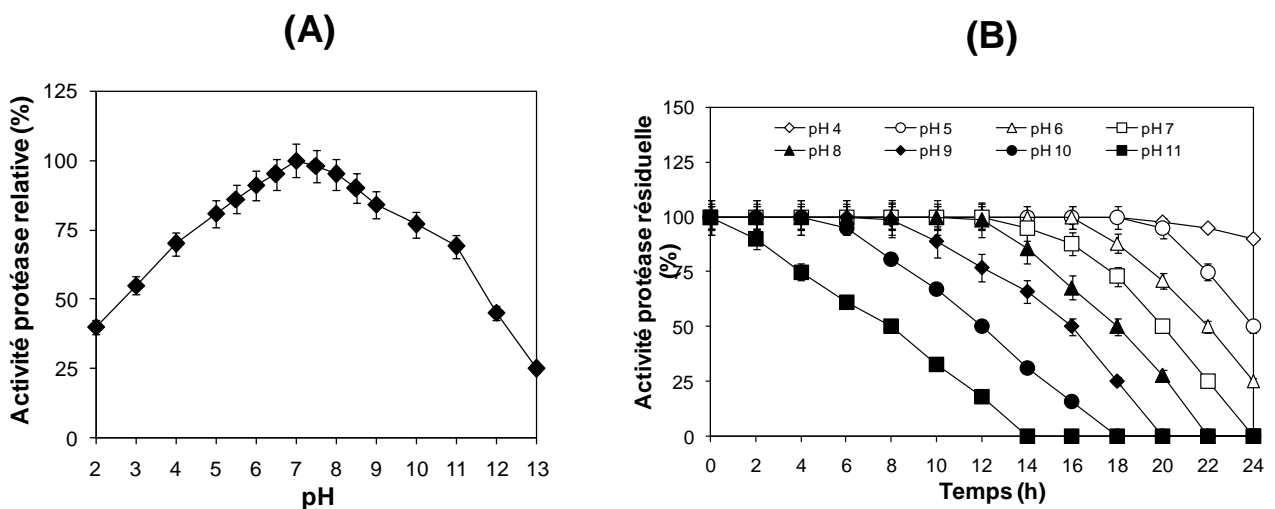
(NiCl<sub>2</sub>), de cadmium (CdCl<sub>2</sub>) et de mercure (HgCl<sub>2</sub>) à une concentration de 2 mM. Alors que la présence de calcium (CaCl<sub>2</sub>), magnésium (MgCl<sub>2</sub>) et baryum (BaCl<sub>2</sub>) améliorent l'activité donc ils s'agissent des activateurs. On remarque également que le cuivre (CuCl<sub>2</sub>) et le zinc (ZnCl<sub>2</sub>) affecte considérablement.

l'activité protéasique alors que le nickel, le cadmium et le mercure l'inhibent totalement. Des résultats similaires ont été observés avec les protéases produites par des souches de *Pseudomonas* (Jaouadi et al., 2013) et de *Bacillus* (Benkiar et al., 2013; Jaouadi et al., 2008; Zaraï Jaouadi et al., 2013).



### V-3- 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 3 à 12). Les activités relatives comparées à l'activité optimale obtenue à pH 7, sont portées sur la figure 11A. Les résultats présentés ci-dessous montrent que la protéase MPDZ est active dans une large gamme de pH entre 3 et 12 et que l'optimum d'activité est obtenu à pH 7. En effet, les activités relatives à pH 4 et 11 sont respectivement de 70% et 69%. Pour des pH supérieurs à 11, l'activité enzymatique décroît considérablement.



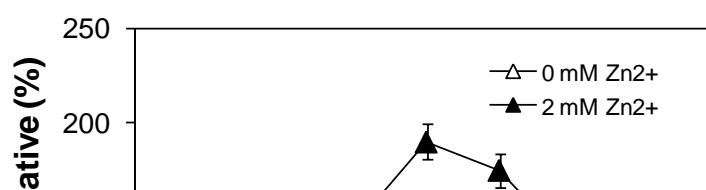
**Figure 12:** (A) Effet du pH sur l'activité de l'enzyme MPDZ. (B) Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme MPDZ. Il est à noter que le 100% d'activité correspond au maximum d'activité protéolytique.

La stabilité de la protéase MPDZ a été étudiée en pré-incubant l'enzyme à des pH allant de 4 à 11 à 40 °C pendant 24 h. L'ensemble des résultats est porté sur la figure 11B. On note que la protéase MPDZ semble être pratiquement stable à des pH allant de 4 à 8 puisqu'elle montre des temps de demi-vie > à 18 h. Alors que, les temps de demi-vie de la MPDZ à pH 9, 10 et 11 sont respectivement de 16, 12 et 8 h.

A la lumière de ces résultats la protéase MPDZ s'est révélée une enzyme neutre-basique, étant donné que l'optimum est observé à pH 7 et qu'elle demeure pratiquement stable aux pH 4-8 pendant 24 h. Ces résultats sont en faveur d'une excellente protéase pourrait être appliquée dans la coagulation du lait.

### V-4- Détermination de la température optimale

Le dosage de l'activité protéolytique a été effectué à des températures allant de 40 °C à 80 °C et les activités relatives ont été déterminées en absence et en présence de zinc à une concentration de 2 mM. Les résultats obtenus sont mentionnés sur la (figure 13).



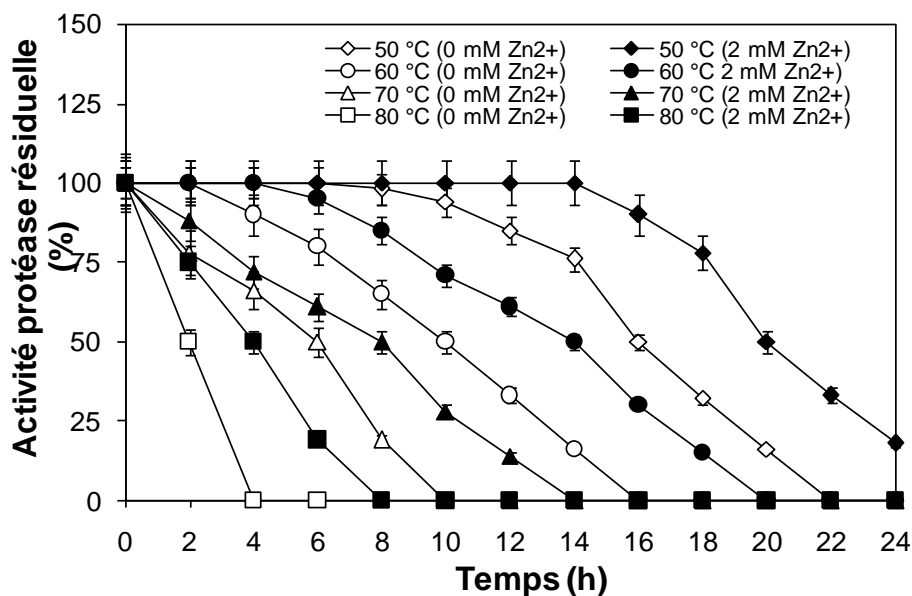
**Figure 13:** Effet de la température sur l'activité protéase produite par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*.

On remarque que pour des températures inférieures à 45 °C, les activités relatives sont comparables en absence ou en présence de ZnCl<sub>2</sub>. Cependant, pour des températures supérieures à 45 °C, le zinc à une concentration optimale de 2 mM améliore l'activité protéolytique. En absence de calcium, l'optimum est observé pour une température de 50 °C, alors qu'en présence de zinc, l'activité optimale est déplacée à 60 °C. A 65 °C, l'activité relative est de 175% quand le zinc est ajouté, et elle n'est que de 75% en son absence. Ceci peut être expliqué par la tendance des protéases à subir une autoprotéolyse à des températures élevées (Jang et al., 2001). Ceci suggère fortement que le zinc à 2 mM est nécessaire pour la thermoactivité de l'enzyme.

#### V-5- Etude de la thermostabilité de l'enzyme MPDZ

Plusieurs travaux ont montré que la thermostabilité des enzymes pourrait être améliorée par l'addition de certains ions tels que les ions calcium et zinc, qui sont connus comme éléments stabilisateurs de plusieurs enzymes aux températures élevées (Ghorbel-Frikha et al., 2005; Manni et al., 2008).

La stabilité thermique de l'enzyme produite par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* a été étudiée par pré-incubation de l'enzyme à différentes températures (50 °C, 60 °C, 70 °C et 80 °C) pendant 24 h en présence du ZnCl<sub>2</sub> (2 mM). Des prélèvements réguliers (chaque 2 h) ont été effectués et les activités protéolytiques résiduelles ont été déterminées. L'ensemble des résultats est illustré dans la (figure 14).



**Figure 14:** Etude de la thermostabilité de l'enzyme MPDZ produite par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*.

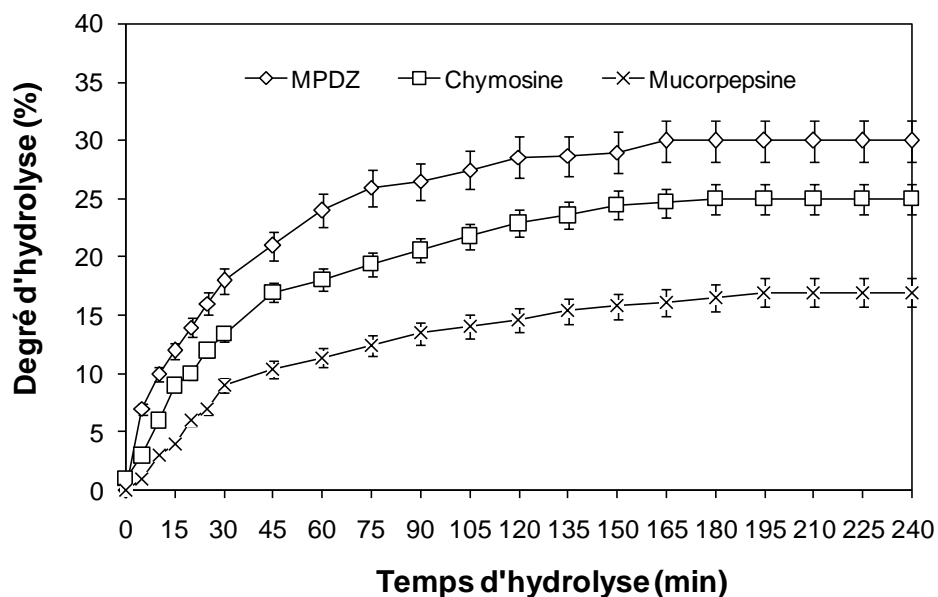
L'étude de la stabilité thermique de la MPDZ à différentes températures nous a permis de déduire que cette enzyme est totalement stable pendant 14 h à des températures inférieures ou égales à 40 °C avec ou sans ajout du zinc. A des températures supérieures à 50 °C, l'étude de la thermostabilité en absence des ions Zn<sup>2+</sup> a montré que la MPDZ 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 Zn<sup>2+</sup> ; c'est ce qui prouve l'implication de ces ions divalents, également, dans l'amélioration de la thermostabilité de la MPDZ. En effet, les temps de demi-vie de la MPDZ à 50, 60, 70 et 80°C sont respectivement de 14 h, 6 h, et 2 h en absence de Ca<sup>2+</sup>. Alors qu'en présence de 2 mM Ca<sup>2+</sup> ces temps de demi-vie sont respectivement de l'ordre de 20, 14, 8 et 4 h.

Des résultats comparables ont été retrouvés avec la protéase de la souche CBS de *Bacillus pumilus*, qui demeure stable pendant 1 h de 40 °C à 60 °C (Jaouadi et al., 2008). Alors la protéase de la souche SV1 de *Bacillus cereus* garde 58% de son activité à 60 °C (Manni et al., 2008) contre la protéase de la souche US575 de *Brevibacillus brevis* qui a été affectée par des températures élevées (supérieures à 70 °C). Ainsi, son activité résiduelle n'est que 45% après une incubation de 30 min à 80 °C (Zaraï Jaouadi et al., 2013).

#### V-6- Détermination du degré d'hydrolyse des protéases MPDZ, Chymosine et Mucorpepsine

Le degré d'hydrolyse est défini comme étant le pourcentage de liaisons peptidiques coupées par rapport au nombre total de liaisons peptidiques. On dit que le degré d'hydrolyse est égal à

100% lorsque toutes les liaisons peptidiques d'une molécule protéique sont coupées ; en d'autres termes, la protéine est totalement décomposée en ses éléments constitutifs, formés d'acides aminés. Comme les enzymes sont des biocatalyseurs spécifiques, aucune enzyme n'est capable seule d'hydrolyser toutes les liaisons peptidiques d'une protéine jusqu'à un DH de 100%. En effet, le DH d'une enzyme est un paramètre important de la réaction, car il a été démontré que la fonctionnalité de l'hydrolysats obtenu est largement dépendante du DH. Plus le DH est élevé plus la taille moyenne des peptides engendrés est réduite et plus l'hydrolysats est efficacement utilisé. Dans ce contexte, le DH des deux enzymes MPDZ, Chymosine et Mucorpepsine a été mesuré sur la caséine comme substrat naturel (**Fig. 15**).



**Figure 15:** Hydrolyse de la caséine par les protéases MPDZ, Chymosine et Mucorpepsine en raison de 500 U d'activité enzymatique.

Le degré d'hydrolyse de la caséine par la protéase MPDZ a été mesuré et comparé à celui des protéases commerciales Chymosine et Mucorpepsine. Les résultats présentés sur la figure 17 montrent que le DH varie en fonction du temps selon le système enzymatique étudié. La vitesse

de la réaction décroît avec le temps, et la réaction finit par s'arrêter à une valeur donnée de DH. Les DH des protéases MPDZ, Chymosine et Mucorpepsine sont de l'ordre de 30, 25 et 17%, respectivement. Par conséquent la protéase MPDZ est comparable aux enzymes commerciales et pourrait être considéré comme un candidat potentiel pour la coagulation du lait.

#### **V-7- Evaluation des performances enzymatique des protéases MPDZ, Chymosine et Mucorpepsine dans la coagulation du lait**

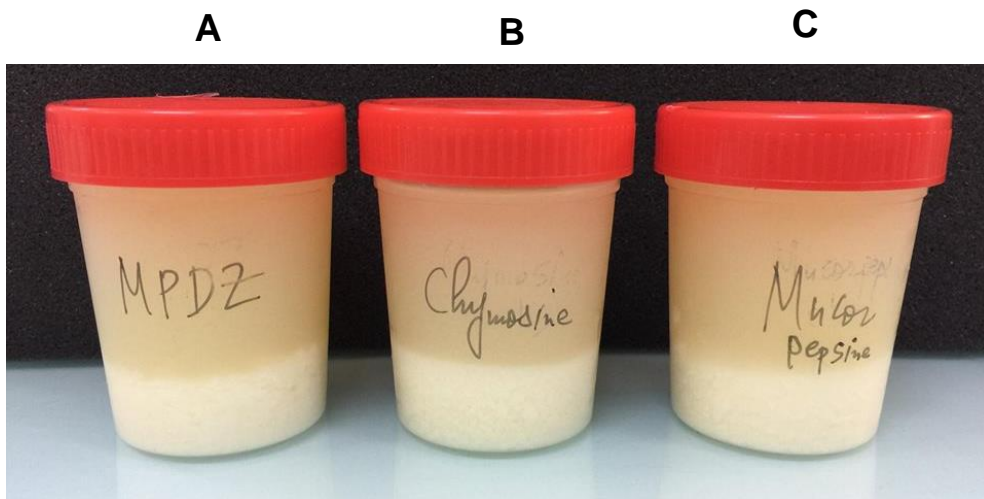
La fabrication de fromage par la méthode classique comporte trois phases successives : la coagulation, l'égouttage et l'affinage. La coagulation et l'égouttage constituent des étapes obligatoires : l'affinage est facultatif, et réservé aux seuls produits dits maturés. La coagulation du lait est réalisée en vue d'exploiter une propriété particulière des gels lactés, qui est de s'égoutter spontanément. Cette évolution se traduit par la séparation progressive de la majorité de l'eau constitutive du lait sous forme de lactosérum, et d'un substrat semi-solide constituant le fromage.

Ce fromage est ensuite soumis le plus souvent à des transformations par voies enzymatiques destinées à modifier la flaveur, l'aspect, la texture du substrat séparé. Une caractéristique dominante de ces différentes phases est d'être d'une durée très différente. La phase de coagulation, comprise en quelques minutes à quelques heures, est la plus courte. L'égouttage est plus long et peut s'étaler de 1 à 48 h. L'affinage constitue l'étape la plus importante dans le temps et peut se situer de quelques jours à plusieurs années. Dans ce contexte, nous sommes intéressés à l'étude de la coagulation du lait de la protéase MPDZ en comparant avec les protéases commerciales Chymosine et Mucorpepsine.

#### **V-8- Evaluation des performances enzymatique des protéases MPDZ, Chymosine et Mucorpepsine dans la coagulation du lait**

La fabrication de fromage par la méthode classique comporte trois phases successives: la coagulation, l'égouttage et l'affinage. La coagulation et l'égouttage constituent des étapes obligatoires: l'affinage est facultatif, et réservé aux seuls produits dits maturés. La coagulation du lait est réalisée en vue d'exploiter une propriété particulière des gels lactés, qui est de s'égoutter spontanément. Cette évolution se traduit par la séparation progressive de la majorité de l'eau constitutive du lait sous forme de lactosérum, et d'un substrat semi-solide constituant le fromage.

Ce fromage est nsuite soumis le plus souvent à des transformations par voies enzymatiques destinées à modifier la saveur, l'aspect, la texture du substrat séparé. Une caractéristique dominante de ces différentes phases est d'être d'une durée très différente. La phase de coagulation, comprise en quelques minutes à quelques heures, est la plus courte. L'égouttage est plus long et peut s'étaler de 1 à 48 h. L'affinage constitue l'étape la plus importante dans le temps et peut se situer de quelques jours à plusieurs années.



**Figure 16:** Coagulation du lait par les protéases MPDZ, Chymosine et Mucorpepsine.

***CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES***

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les protéases microbiennes, en particulier celles produites par le genre *Bacillus* dominant le marché mondial des enzymes. Ces biocatalyseurs sont d'une grande importance économique, en considérant les applications industrielles multiples dans lesquelles elles sont impliquées. Les protéases détergentes et celles impliquées dans la synthèse peptidique forment le groupe d'enzyme le plus recherché grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la substitution des agents chimiques toxiques et la stabilité vis-à-vis divers solvants organiques. L'obtention de nouvelles protéases pourrait soit conduire à de nouvelles applications biotechnologiques, soit à une amélioration des performances des enzymes existantes. L'application éventuelle de ces protéases intéressantes au niveau industrielle, passe par la mise au point d'un procédé de production économique et reproductible. Ceci sera possible par la construction de souches hyperproductrices de ces enzymes et par l'optimisation des conditions de production à l'échelle laboratoire puis en fermenteur. En plus, la pénurie mondiale en présure à susciter le développement de la recherche des nouveaux succédanés capables de coaguler le lait, tout en assurant de bons rendements fromagers.

La première partie du travail a porté sur l'optimisation des conditions de production de protéase(s) par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens*. Le niveau de production sur le milieu optimisé à base de caséine (10 g/l) et d'extrait de bœuf (2 g/l) est de 5000 U/ml après 48 h de culture à 160 rpm.

La deuxième partie a porté sur une purification à homogénéité et une caractérisation biochimique de l'enzyme purifiée produite par la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* :

- La souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* produit une seule protéase monomérique nommée MPDZ de masse moléculaire environ 50 kDa déterminée par SDS-PAGE.
- L'enzyme présente une activité maximale à pH 7 et à une température de 60 °C.
- L'activité enzymatique est complètement inhibée par l'ETDA, l'EDTA et le 1-10-Phenanthroline monohydrate, il s'agit donc d'une métallprotéase.



- Le zinc à 2 mM améliore considérablement la thermoactivité et la thermostabilité de l'enzyme. Cependant, le nickel, le cadmium et le mercure inhibent totalement cette activité enzymatique.
- La protéase MPDZ est une vraie enzyme coagulante qui précipite efficacement le lait. On remarque aussi que le lactosérum obtenu dans le cas de la protéase MPDZ est clair alors que celui obtenu dans le cas de la Présurpara est trouble. Dans les deux cas, nous avons remarqué que le maximum de coagulation avec formation du coagulum est atteint après 6 à 8 h d'incubation à 37 °C respectivement avec la MPDZ, la Chymosine et la Mucorpepsine. Ainsi, la protéase MPDZ produite par la nouvelle souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* est une bonne candidate pour la coagulation du lait.

En conclusion, la protéase neutre extracellulaire (nommée MPDZ) de la souche de TBS09 de *Pseudomonas fluorescens* semble être intéressante et pourrait être utilisée dans des applications biotechnologiques comme agent coagulant le lait en fromagerie et biocatalyseur en synthèse peptidique. Néanmoins, il existe encore des possibilités d'amélioration, non seulement au niveau de la recherche d'autres souches microbiennes plus performantes, mais également au niveau de l'enzyme elle-même et ses caractéristiques intrinsèques. Dans ce contexte, divers problèmes doivent être résolus pour que l'on puisse tirer parti de ces possibilités et atteindre efficacement l'objectif visé.

La suite des travaux de recherche portera essentiellement sur :

- L'achèvement du séquençage NH<sub>2</sub>-terminale de la protéase MPDZ moyennant la méthode d'Edman.
- L'optimisation des conditions de culture et de production à l'échelle fermenteur.
- L'évaluation des qualités organoleptiques et les performances de l'enzyme MPDZ dans la fabrication du fromage à grande échelle en collaboration avec un industriel local.

***Références***  
***Bibliographique***

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Fattah A.F., el-Hawwary N.M., Amr A.S. (1974)** Studies on the production of milk-clotting enzymes, proteolytic enzymes and mucilage by fungi. *J Gen Microbiol*, 84 (1974) 327-31.
- Adler-Nissen J. 1986.** A review of food hydrolysis specific areas. In: J. Adler-Nissen, Editor, *Enzymic hydrolysis of food proteins*, Elsevier Applied Science Publishers, Copenhagen, Denmark (1986), pp. 57-109.
- Agasthya A.S., Sharma N., Mohan A., Mahal P. (2013)**; Isolation and Molecular Characterisation of Alkaline Protease Producing *Bacillus thuringiensis*. *Cell Biochem Biophys*, 66 (2013) 45-51.
- Ageitos J.M., Vallejo J.A., Sestelo A.B., Poza M., Villa T.G. (2007)** Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. *J Appl Microbiol*, 103 (2007) 2205-13.
- Akolkar A., Barambe N., Trivedi S., Desai A. (2009)** Statistical optimization of medium components for extracellular protease production by an extreme haloarchaeon, *Halobacterium* sp. SP1(1). *Lett Appl Microbiol*, 48 (2009) 77-83.
- Aleksieva Z., Shivarova N., Nikoevska T., Antonova T. (1990)** [Genetic studies of a *Bacillus subtilis* producer of a milk-coagulating enzyme complex]. *Acta Microbiol Bulg*, 26 (1990) 67-72.
- Anbu P., Hilda A., Gopinath S.C. (2004)** Keratinophilic fungi of poultry farm and feather dumping soil in Tamil Nadu, India. *Mycopathologia*, 158 (2004) 303-9.
- 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 (1983) 526-34.
- Azarkan M., Garcia-Pino A., Dibiani R., Wyns L., Loris R., Baeyens-Volant D. (2006)** 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 (2006) 1239-42.
- Bach E., Daroit D.J., Correa A.P., Brandelli A. (2011)** Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. *Biodegradation*, 22 (2011) 1191-201.
- Banik R.M., Prakash M. (2004)** Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiol Res*, 159 (2004) 135-40.
- Barrett A.J., Rawlings N.D., O'Brien E.A. (2001)** The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol*, 134 (2001) 95-102.
- Barrett, A.J. 1979.** Protein degradation in health and disease. Introduction: the classification of proteinases. *Ciba Found Symp*(75), 1-13.
- Barrett, A.J. 1986.** An introduction to the proteinases. BARRETT, A.J. et SALVESSEN, G. *Proteinase Inhibitors*, 1, 3-22.
- Bayot, A., Basse, N., Lee, I., Gareil, M., Pirote, B., Bulteau, A.L., Friguet, B., Reboud-Ravaux, M. 2008.** Towards the control of intracellular protein turnover: mitochondrial Lon protease inhibitors versus proteasome inhibitors. *Biochimie*, 90(2), 260-269
- Benkiar A., Nadia Z.J., Badis A., Rebzani F., Soraya B.T., Rekik H., Naili B., Ferradji F.Z., Bejar S., Jaouadi (2013)**B. 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 (2013) 129-138.
- Berridge N.J. (1955).**Purification and assay of rennin. In: *Methods in enzymology*, Acad.Press Inc., New York, V. 2, p. 69-77, 987p. (1955).
- Bezawada J., Yan S., Tyagia R.D., Surampalli R.Y. (2010)** Comparison of protease activities in different *Bacillus licheniformis* strains using wastewater sludge and synthetic soy medium as raw material. *Environ Technol*, 31 (2010) 63-72.

- Boulkour Touioui S, (2016)** : Etude de la production des protéases et d'antibiotiques par une souche de *Streptomyces* sp. Isolée d'un sol de la mitidja (Algérie), ENS KOUBA, thèse de doctorat, 243p.
- Boulkour Touioui S, Zarat Jaouadi N, Boudjella H, Ferradji FZ, Belhoul M, Rekik H, Badis A, Bejar S, et Jaouadi B, (2015)** : Purification and biochemical characterization of two serine alkaline proteases from *Streptomyces* sp. strain AH4, *World J Microbiol Biotechnol* (2015) 31:1079–1092.
- Boulkour Touioui S, Zarat Jaouadi N, Boudjella H, Ferradji FZ, Belhoul M, Rekik H, Badis A, Bejar S, et Jaouadi B, (2017)** : Biochemical and molecular characterization of a novel metalloprotease from *Pseudomonas fluorescens* strain TBS 09, *International Journal of Biological Macromolecules*, (2018) 37 :1072–1085.
- Boyce A., Walsh G. (2012)** Identification of fungal proteases potentially suitable for environmentally friendly cleaning-in-place in the dairy industry. *Chemosphere*, 88 (2012) 211-8.
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248-254.
- Brakoniecka-Sikorska A., Repe A., Jankowska A. (2003)** The effect of some parameters of milk protein coagulation on the transfer of a commercial enzymatic preparation to cheese grain. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 68 (2003) 465-8.
- Brandelli A., Daroit D.J., Riffel A. (2010)** Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85 (2010) 1735-50.
- Brattsand M., Egelrud T(1999)**. Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem*, 274 (1999) 30033-40.
- Brughera F., Salvadori P. (1969)** [Acid and enzymatic coagulation of milk and its problems]. *Minerva Nipiol*, 19 (1969) 182-218.
- Bruno M.A., Lazza C.M., Errasti M.E., López L.M.I., Caffini N.O., Pardo M.F. 2010)** Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (2010) 695-701.
- Brutti C.B., Pardo M.F., Caffini N.O., Natalucci C.L. (2012)** *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT - Food Science and Technology*, 45 (2012) 172-179.
- Carles L., Joly M., Bonnemoy F., Lereboure M., Batisson I., Besse-Hoggan P. 2017)** Identification of sulfonylurea biodegradation pathways enabled by a novel nicosulfuron-transforming strain *Pseudomonas fluorescens* SG-1: Toxicity assessment and effect of formulation. *J Hazard Mater*, 324 (2017) 184-193.
- Carlson A., Hill C.G., Jr., Olson N.F. 1987)** Kinetics of milk coagulation: III. Mathematical modeling of the kinetics of curd formation following enzymatic hydrolysis of kappa-casein--parameter estimation. *Biotechnol Bioeng*, 29 (1987) 601-11.
- 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 (2004) 1140-5.
- 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.
- Chen S.T., Chen S.Y., Hsiao S.C., Wang K.T. 1991)** Application of industrial protease "Alcalase" in peptide synthesis. *Biomed Biochim Acta*, 50 (1991) S181-6.
- Chierici M., Picozzi C., La Spina M.G., Orsi C., Vignenti I., Zambrini V., Foschino R. 2016)** Strain Diversity of *Pseudomonas fluorescens* Group with Potential Blue Pigment Phenotype Isolated from Dairy Products. *J Food Prot*, 79 (2016) 1430-5.
- Chitpintyol S., Goode D., Crabbe M.J. (1998)** Studies on the binding of alpha-crystallin to recombinant prochymosins and chymosin. *Mol Vis*, 4 (1998) 1.
- Creamer L.K.** Casein nomenclature, structure and association properties
- Creen M.L., Foster P.M.D. (1974)** Comparaison of the rates of proteolysis during ripening of cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants. *Journal of Dairy Research*, 41 (1974) 269-282.
- Dalgleish D.G., Corredig M. (2012)** The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu Rev Food Sci Technol*, 3 (2012) 449-67.

- De Angelis M., Curtin A.C., McSweeney P.L., Faccia M., Gobbetti M. (2002)** Lactobacillus reuteri DSM 20016: purification and characterization of a cystathionine gamma-lyase and use as adjunct starter in cheesemaking. *J Dairy Res*, 69 (2002) 255-67.
- Derkx F.H., Bouma B.N., Schalekamp M.A. (1984)** Prorenin-renin conversion by the contact activation system in human plasma: role of plasma protease inhibitors. *J Lab Clin Med*, 103 (1984) 560-73.
- Efimenko N.A., Lysenko M.V., Novozhilov A.A., Knorring G., Aliev A.A. (2008)** [The historical aspects and modern ideas of using proteolytic enzymes in surgery]. *Voen Med Zh*, 329 (2008) 23-31.
- Emmons D.B., Modler H.W. (2010)** Invited review: A commentary on predictive cheese yield formulas. *J Dairy Sci*, 93 (2010) 5517-37.
- Esteves C.L., Lucey J.A., Wang T., Pires E.M. (2003)** Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *J Dairy Sci*, 86 (2003) 2558-67.
- Fereric F. (1982)** Comparative study of some properties of a new milk coagulating enzyme and two commercial rennets. In: *Utilisation des enzymes en technologie alimentaire. Ed., P. Dupuy, Technique et documentation Lavoisier p. 281-286.p.555.* (1982).
- Fujinami S., Fujisawa M. (2010)** Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes--past, present and future. *Environ Technol*, 31 (2010) 845-56.
- Gao G., Yin D., Chen S., Xia F., Yang J., Li Q., Wang W. (2012)** Effect of biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on soil fungal community in cucumber rhizosphere using T-RFLP and DGGE. *PLoS One*, 7 (2012) e31806.
- Garcia-Seco D., Zhang Y., Gutierrez-Manero F.J., Martin C., Ramos-Solano B. (2015)** Application of *Pseudomonas fluorescens* to Blackberry under Field Conditions Improves Fruit Quality by Modifying Flavonoid Metabolism. *PLoS One*, 10 (2015) e0142639.
- Garrido-Sanz D., Arrebola E., Martinez-Granero F., Garcia-Mendez S., Muriel C., Blanco-Romero E., Martin M., Rivilla R., Redondo-Nieto M. (2017)** Classification of Isolates from the *Pseudomonas fluorescens* Complex into Phylogenomic Groups Based in Group-Specific Markers. *Front Microbiol*, 8 (2017) 413.
- Garrido-Sanz D., Meier-Kolthoff J.P., Goker M., Martin M., Rivilla R., Redondo-Nieto M. (2016)** Correction: Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PLoS One*, 11 (2016) e0153733.
- Ghorbel-Frikha B., Sellami-Kamoun A., Fakhfakh N., Haddar A., Manni L., Nasri M. (2005)** Production and purification of a calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32 (2005) 186-94.
- Gobbetti M., Fox P.F. (1996)** Purification and characterization of a dipeptidase from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948. *J Dairy Sci*, 79 (1996) 357-65.
- Godfrey T., Reichelt P. 1985.** The application of enzymes in Industry, In: *Industrial Enzymology*. The Nature Press, London.
- Godfrey, T., Reichelt, P. 1985.** The application of enzymes in Industry, In: *Industrial Enzymology*. The Nature Press, London.
- Guang C., Phillips R.D. (2009)** Purification, activity and sequence of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from alcalase hydrolysate of peanut flour. *J Agric Food Chem*, 57 (2009) 10102-6.
- Guinebretiere M.H., Thompson F.L., Sorokin A., Normand P., Dawyndt P., Ehling-Schulz M., Svensson B., Sanchis V., Nguyen-The C., Heyndrickx M., De Vos P. (2008)** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol*, 10 (2008) 851-65.
- Gupta R., Beg Q.K., Khan S., Chauhan B. 2002.** An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(4), pp. 381-395.
- Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. (2002)** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59 (2002) 15-32.
- Gustavsson F., Glantz M., Poulsen N.A., Wadso L., Stalhammar H., Andren A., Lindmark Mansson H., Larsen L.B., Paulsson M., Fikse W.F. (2014)** Genetic parameters for rennet- and acid-induced coagulation properties in milk from Swedish Red dairy cows. *J Dairy Sci*, 97 (2014) 5219-29.

- Hack N., Reinwand C., Abbt-Braun G., Horn H., Frimmel F.H. (2015)** Biodegradation of phenol, salicylic acid, benzenesulfonic acid, and iomeprol by *Pseudomonas fluorescens* in the capillary fringe. *J Contam Hydrol*, 183 (2015) 40-54.
- Hajji M., Hmidet N., Jellouli K., Vallaes T., Nasri M., Sellami-Kamoun A. (2010)** Gene cloning and expression of a detergent stable alkaline protease from *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*, 45 (2010) 1746-1752.
- Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M., Gharsallah, N. 2007.** Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochem*, **42**(5), 791-797.
- Holt C., Carver J.A., Ecroyd H., Thorn D.C. (2013)** Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. *J Dairy Sci*, 96 (2013) 6127-46.
- Hotta Y., Teramoto K., Sato H., Yoshikawa H., Hosoda A., Tamura H. (2010)** Classification of genus *Pseudomonas* by MALDI-TOF MS based on ribosomal protein coding in S10-spc-alpha operon at strain level. *J Proteome Res*, 9 (2010) 6722-8.
- In: Encyclopedia of Dairy Science, Ed., H. Royinski, J. Fuquay, and P. Fox, Elsevier science Ltd, p.1895-1902*
- Jain R., Jain P.C. (2010)** Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 using poultry feather. *Indian J Exp Biol*, 48 (2010) 174-8.
- Jang J.W., Ko J.H., Kim E.K., Jang W.H., Kang J.H., Yoo O.J. (2001)** Enhanced thermal stability of an alkaline protease, AprP, isolated from a *Pseudomonas* sp. by mutation at an autoproteolysis site, Ser-331. *Biotechnol Appl Biochem*, 34 (2001) 81-4.
- Jaouadi B., Abdelmalek B., Fodil D., Ferradji F.Z., Rekek H., Zarai N., Bejar S. (2010)** Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents. *Bioresour Technol*, 101 (2010) 8361-9.
- Jaouadi B., Ellouz-Chaabouni S., Ben Ali M., Ben Messaoud E., Naili B., Dhouib A., Bejar S. (2009)** Excellent laundry detergent compatibility and high dehairing ability of the *Bacillus pumilus* CBS alkaline proteinase (SAPB). *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14 (2009) 503-512.
- 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 (2008) 1291-305.
- Jaouadi B., Zarái Jaouadi N., Rekek H., Naili B., Beji A., Dhouib A., Bejar S. (2013)** Biochemical and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* CTM50182 organic solvent-stable elastase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60 (2013) 165-177.
- Jensen J.L., Jacobsen J., Moss M.L., Rasmussen F., Qvist K.B., Larsen S., van den Brink J.M. (2015).** The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay. *J Dairy Sci* (2015).
- Jiang T., Chen L.J., Xue L., Chen L.S. (2007)** Study on milk-clotting mechanism of rennet-like enzyme from glutinous rice wine: proteolytic property and the cleavage site on kappa-casein. *J Dairy Sci*, 90 (2007) 3126-33.
- Johnson D.A., Travis J. (1976)** Rapid purification of human trypsin and chymotrypsin I. *Anal Biochem*, 72 (1976) 573-6.
- Joo H.S., Chang C.S. (2005)** Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. *J Appl Microbiol*, 98 (2005) 491-7.
- Joo H.S., Ra K., Park H., Choi J. 2013.** Molecular cloning and functional expression of a fibrinolytic protease gene from the polychaeta, *Periserrula leucophryna*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, **18**, pp. 209-217.
- Kalisz, H.M. 1988.** Microbial proteinases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **36**, 1-65.
- Kembhavi A.A., Buttle D.J., Knight C.G., Barrett A.J. (1993)** The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays. *Arch. Biochem. Biophys.*, 303 (1993) 208-213.

- Kilani-Feki O., Khiari O., Culioli G., Ortalo-Magne A., Zouari N., Blache Y., Jaoua S. (2010)** Antifungal activities of an endophytic *Pseudomonas fluorescens* strain Pf1TZ harbouring genes from pyoluteorin and phenazine clusters. *Biotechnol Lett*, 32 (2010) 1279-85.
- Kim S.Y., Gunasekaran S., Olson N.F. (2004)** Combined use of chymosin and protease from *Cryphonectria parasitica* for control of meltability and firmness of cheddar cheese. *J Dairy Sci*, 87 (2004) 274-83.
- Kim W., Choi K., Kim Y., Park H., Choi J., Lee Y., Oh H., Kwon I., (1996) Lee S.** Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl Environ Microbiol*, 62 (1996) 2482-8.
- Konuklar G., Gunasekaran S. (2002)** Rennet-induced milk coagulation by continuous steady shear stress. *J Colloid Interface Sci*, 250 (2002) 149-58.
- Ku T.W., Tsai R.L., Pan T.M. (2009)** A simple and cost-saving approach to optimize the production of subtilisin NAT by submerged cultivation of *Bacillus subtilis* natto. *J Agric Food Chem*, 57 (2009) 292-6.
- Kumar A., Grover S., Sharma J., Batish V.K. (2010)** Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Crit Rev Biotechnol*, 30 (2010) 243-58.
- 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 Physiol B Biochem Mol Biol*, 145 (2006) 108-13.
- Kumar A.G., Swarnalatha S., Gayathri S., Nagesh N., Sekaran G. (2008)** Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. *J Appl Microbiol*, 104 (2008) 411-9.
- Kumar R., Gupta V.** Disseminated intravascular coagulation: current concepts. *Indian J Pediatr*, 75733-8.
- Laemmli U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- Lageiro M.M., Moura M.J., Reis A., Ferreira M.J.C. (2007)** Microbial proteases application in leather industry. *J Biotechnol* 131 (2007) S239-S240.
- Lalmanach G.** Proteolytic enzymes: from structures to transport pathways. *Biochimie*, 90 (2008) 191-3.
- Lima L.N., Oliveira G.C., Rojas M.J., Castro H.F., Da Ros P.C., Mendes A.A., Giordano R.L., Tardioli P.W. (2015)** Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 42 (2015) 523-35.
- Lin H., Shavezipur M., Yousef A., Maleky F. (2016)** Prediction of growth of *Pseudomonas fluorescens* in milk during storage under fluctuating temperature. *J Dairy Sci*, 99 (2016) 1822-30.
- Lopez C., Dufour E. (2001)** The Composition of the Milk Fat Globule Surface Alters the Structural Characteristics of the Coagulum. *J Colloid Interface Sci*, 233 (2001) 241-249.
- Luerce T.D., Azevedo M.S., LeBlanc J.G., Azevedo V., Miyoshi A., Pontes D.S. (2014)** Recombinant *Lactococcus lactis* fails to secrete bovine chymosin. *Bioengineered*, 5 (2014) 363-70.
- Luo Y., Zheng Y., Jiang Z., Ma Y., Wei D. (2006)** A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73 (2006) 349-55.
- Malacarne M., Summer A., Formaggioni P., Franceschi P., Sandri S., Pecorari M., Vecchia P., Mariani P. (2008)** Dairy maturation of milk used in the manufacture of Parmigiano-Reggiano cheese: effects on physico-chemical characteristics, rennet-coagulation aptitude and rheological properties. *J Dairy Res*, 75 (2008) 218-24.
- Manni L., Jellouli K., Agrebi R., Bayouhd A., Nasri M. (2008)** Biochemical and molecular characterization of a novel calcium-dependent metalloprotease from *Bacillus cereus* SV1. *Process Biochemistry*, 43 (2008) 522-530.
- Marquart M.E., Dajcs J.J., Caballero A.R., Thibodeaux B.A., O'Callaghan R.J. (2005)** Calcium and magnesium enhance the production of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV, a corneal virulence factor. *Med Microbiol Immunol*, 194 (2005) 39-45.
- Marth E.H., Hussong R.V. (1965)** Microbial Acid Production in and Subsequent Coagulation of Milk as Affected by Added Sodium Chloride. *J Dairy Sci*, 48 (1965) 548-52.

- Maurer K.-H. Detergent proteases. *Current Opinion Biotechnol*, 15 (2004) 330-334.
- Miyamoto-Shinohara Y., Sukenobe J., Imaizumi T., Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J Gen Appl Microbiol*, 54 (2008) 9-24.
- Moftah O.A., Grbavcic S., Zuza M., Lukovic N., Bezbradica D., Knezevic-Jugovic Z. 2012. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry : production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 166, pp. 348-364.
- Mohamed Ahmed I.A., Babiker E.E., Mori N. (2010) pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (2010) 759-764.
- Moore B., Roaf H.E., Webster A. (1912) Direct Measurement of the Osmotic Pressure of Casein in Alkaline Solution. Experimental Proof that apparent impermeability of a Membrane to Ions is not due to the Properties of the Membrane but to the Colloid contained within the Membrane. *Biochem J*, 6 (1912) 110-21.
- Nájera A.I., de Renobales M., Barron L.J.R.(2003). Effects of pH, temperature, CaCl<sub>2</sub> and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*, 80 (2003) 345-352.
- Nardello-Rataj V., Ho Tan Tai L., Aubry J.-M. Les lessives en poudre : Un siècle d'innovations pour éliminer les taches. *Actualité chimique*
- NC-IUBMB. (1992) NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry). Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry *The Nomenclature and classification of enzymes*. San Diego: Academic Press, Inc., (1992) 862.
- Nilegaonkar S.S., Zambare V.P., Kanekar P.P., Dhakephalkar P.K., Sarnaik S.S. (2007) Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresour Technol*, 98 (2007) 1238-45.
- Ong L., Shah N.P. (2009) Probiotic cheddar cheese: influence of ripening temperatures on proteolysis and sensory characteristics of cheddar cheeses. *J Food Sci*, 74 (2009) S182-91.
- Ongena M., Jourdan E., Schafer M., Kech C., Budzikiewicz H., Luxen A., Thonart P. (2005) Isolation of an N-alkylated benzylamine derivative from *Pseudomonas putida* BTP1 as elicitor of induced systemic resistance in bean. *Mol Plant Microbe Interact*, 18 (2005) 562-9.
- Ouoba L.I., Diawara B., Amoa-Awua W., Traore A.S., Moller P.L. (2004) Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soumbala. *Int J Food Microbiol*, 90 (2004) 197-205.
- Payens T.A. (1979) Casein micelles: the colloid-chemical approach. *J Dairy Res*, 46 (1979) 291-306.
- Pembrey R.S., Marshall K.C., Schneider R.P. (1999) Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Appl Environ Microbiol*, 65 (1999) 2877-94.
- 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. *Pak J Biol Sci*, 12 (2009) 872-6.
- 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 (1998) 597-635.
- Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, 36 (2008) D320-5.
- Raynes J.K., Day L., Augustin M.A., Carver J.A. (2015) Structural differences between bovine A(1) and A(2) beta-casein alter micelle self-assembly and influence molecular chaperone activity. *J Dairy Sci*, 98 (2015) 2172-82.
- Revis C., Payne G.A. (1907) The Acid Coagulation of Milk. *J Hyg (Lond)*, 7 (1907) 216-31.
- Richards C., Tiddy G.J., Casey S. (2007) Lateral phase separation gives multiple lamellar phases in a "binary" surfactant/water system: the phase behavior of sodium alkyl benzene sulfonate/water mixtures. *Langmuir*, 23 (2007) 467-74.
- Rivas J., Prazeres A.R., Carvalho F., Beltran F. (2010) Treatment of cheese whey wastewater: combined coagulation-flocculation and aerobic biodegradation. *J Agric Food Chem*, 58 (2010) 7871-7.



- Sakthipriya N., Doble M., Sangwai J.S. (2016)** Systematic investigations on the biodegradation and viscosity reduction of long chain hydrocarbons using *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *Environ Sci Process Impacts*, 18 (2016) 386-97.
- Sathya R., Pradeep B.V., Angayarkanni J., Palaniswamy M. (2009)** Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agroindustrial wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14 (2009) 788-794.
- Schafer T., Borchert T.W., Nielsen V.S., Skagerlind P., Gibson K., Wenger K., Hatzack F., Nilsson L.D., Salmon S., Pedersen S., Heldt-Hansen H.P., Poulsen P.B., Lund H., Oxenboll K.M., Wu G.F., Pedersen H.H., Xu H. (2007)** Industrial enzymes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 105 (2007) 59-131.
- Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R., Baumeister, W. 1995a.** Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*, **268**(5210), 579-582.
- Seemuller, E., Lupas, A., Zuhl, F., Zwickl, P., Baumeister, W. 1995b.** The proteasome from *Thermoplasma acidophilum* is neither a cysteine nor a serine protease. *FEBS Lett*, **359**(2-3), 173-178.
- Shiga Y., Yamagata H., Tsukagoshi N., Udaka S. (1995)** BbrPI, an extracellular proteinase inhibitor of *Bacillus brevis*, protects cells from the attack of exogenous proteinase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 59 (1995) 2348-50.
- Shun-Tang G., Ono T., Mikami M. (1999)** Incorporation of soy milk lipid into protein coagulum by addition of calcium chloride. *J Agric Food Chem*, 47 (1999) 901-5.
- Sillankorva S., Neubauer P., Azeredo J. (2008)** *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. *BMC Biotechnol*, 8 (2008) 79.
- Simkhada J.R., Cho S.S., Park S.J., Mander P., Choi Y.H., Lee H.J., Yoo J.C. (2010)** An oxidant- and organic solvent-resistant alkaline metalloprotease from *Streptomyces olivochromogenes*. *Appl Biochem Biotechnol*, 162 (2010) 1457-70.
- Slattery C.W. (1976)** Review: Casein micelle structure; an examination of models. *J Dairy Sci*, 59 (1976) 1547-56.
- 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. *J Biol Chem*, 241 (1966) 5974-6.
- Souissi N., Ellouz-Triki Y., Bougateg A., Blibech M., Nasri M. (2008)** 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*, 163 (2008) 473-80.
- Spelzini D., Farruggia B., Pico G. (2005)** Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate: chymosin and pepsin. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 821 (2005) 60-6.
- Srinivasan R.A., Iyengar M.K., Babbar I.J., Chakravorty S.C., Dudani A.T., Iya K.K. (1964)** Milk-Clotting Enzymes from Microorganisms. *Appl Microbiol*, 12 (1964) 475-8.
- Steuer C., Heinonen K.H., Kattner L., Klein C.D. (2009)** Optimization of assay conditions for dengue virus protease: effect of various polyols and nonionic detergents. *J Biomol Screen*, 14 (2009) 1102-8.
- Stuknyte M., Decimo M., Colzani M., Silvetti T., Brasca M., Cattaneo S., Aldini G., De Noni I. (2016)** Extracellular thermostable proteolytic activity of the milk spoilage bacterium *Pseudomonas fluorescens* PS19 on bovine caseins. *J Dairy Sci*, 99 (2016) 4188-95.
- Sundararajan S., Kannan C.N., Chittibabu S. (2011)** Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent. *J Biosci Bioeng*, 111 (2011) 128-33.
- 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. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 33 (2005) 231-47.
- Szeltner Z., Polgar L. (2008)** Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. *Curr Protein Pept Sci*, 9 (2008) 96-107.
- Szeltner, Z., Polgar, L. 2008.** Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. *Curr Protein Pept Sci*, 9(1), 96-107.

- Takaoka M., Takenobu Y., Miyata Y., Ikegawa R., Matsumura Y., Morimoto S. (1990)** Pepsin, an aspartic protease, converts porcine big endothelin to 21-residue endothelin. *Biochem Biophys Res Commun*, 166 (1990) 436-42.
- Tang X.M., Lakay F.M., Shen W., Shao W.L., Fang H.Y., Prior B.A., Wang Z.X., Zhuge J. (2004)** Purification and characterisation of an alkaline protease used in tannery industry from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett*, 26 (2004) 1421-4.
- Taussig S.J., Batkin S. (1988)** Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. *J Ethnopharmacol*, 22 (1988) 191-203.
- Thumar J.T., Singh S.P. (2009)** Organic solvent tolerance of an alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36 (2009) 211-8.
- Toledo F.L., Calvo C., Rodelas B., Gonzalez-Lopez J. (2006)** Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Syst Appl Microbiol*, 29 (2006) 244-52.
- Trapet P., Avoscan L., Klinguer A., Pateyron S., Citerne S., Chervin C., Mazurier S., Lemanceau P., Wendehenne D., Besson-Bard A. (2016)** The *Pseudomonas fluorescens* Siderophore Pyoverdine Weakens *Arabidopsis thaliana* Defense in Favor of Growth in Iron-Deficient Conditions. *Plant Physiol*, 171 (2016) 675-93.)
- Tripathi P., Beaussart A., Andre G., Rolain T., Lebeer S., Vanderleyden J., Hols P., Dufrene Y.F. (2012)** Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. *Micron*, 43 (2012) 1323-30.
- Trogl J., Chauhan A., Ripp S., Layton A.C., Kuncova G., Sayler G.S. (2012)** *Pseudomonas fluorescens* HK44: lessons learned from a model whole-cell bioreporter with a broad application history. *Sensors (Basel)*, 12 (2012) 1544-71.
- Tronchin G., Esnault K., Sanchez M., Larcher G., Marot-Leblond A., Bouchara J.P. (2002)** Purification and partial characterization of a 32-kilodalton sialic acid-specific lectin from *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 70 (2002) 6891-5.
- Trudgill P.W. (1969)** The metabolism of 2-furoic acid by *Pseudomonas* F2. *Biochem J*, 113 (1969) 577-87.
- van der Hoorn R.A. (2008)**. Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* (2008).
- Vishwanatha K.S., Appu Rao A.G., Singh S.A. (2010)** Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85 (2010) 1849-59.
- Wang J., Sasaki T., Maehara Y., Nakao H., Tsuchiya T., Miyoshi S.I. 2008**. Variation of extracellular proteases produced by *Vibrio vulnificus* clinical isolates: Genetic diversity of the metalloprotease gene (vvp), and serine protease secretion by vvp-negative strains. *Microb Pathog.* **45**, pp. 494-500.
- Wedholm A., Moller H.S., Stensballe A., Lindmark-Mansson H., Karlsson A.H., Andersson R., Andren A., Larsen L.B. (2008)** Effect of minor milk proteins in chymosin separated whey and casein fractions on cheese yield as determined by proteomics and multivariate data analysis. *J Dairy Sci*, 91 (2008) 3787-97.
- Yasuda M., Aoyama M., Sakaguchi M., Nakachi K., Kobamoto N. (1999)** Purification and characterization of a soybean-milk-coagulating enzyme from *Bacillus pumilus* TYO-67. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51 (1999) 474-9.
- Zaferanloo B., Quang T.D., Daumoo S. Ghorbani M.M., Mahon P.J., Palombo E.A. 2014**. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. *World J Microbiol Biotechnol*, **30**, pp. 1755-1762.
- Zaraï Jaouadi N., Jaouadi B., Aghajari N., Bejar S. (2012)**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) 142-151.
- Zaraï 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 (2013) e76722.

- 
- Zhang Q., Ji Y., Xiao Q., Chng S., Tong Y., Chen X., Liu F. (2016)** Role of Vfr in the regulation of antifungal compound production by *Pseudomonas fluorescens* FD6. *Microbiol Res*, 188-189 (2016) 106-12.
- Zhang W., He X., Liu H., Guo H., Ren F., Wen P. (2013)** Statistical optimization of culture conditions for milk-clotting enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* using wheat bran-an agro-industry waste. *Indian J Microbiol*, 53 (2013) 492-5.
- Zwickl, P., Lottspeich, F., Baumeister, W. 1992.** Expression of functional *Thermoplasma acidophilum* proteasomes in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, **312**(2-3), 157-160.

# *Annexes*

## Composition Des Milieux De Culture :

### Annexe N° I : Les Milieux complexes

Milieu Luria-Bertani	Milieu gélose nutritive au lait	Milieu optimisé de production de protéases
<p><b><u>Milieu liquide :</u></b> composé de : _10 g peptone _5 g NaCl _5 g extrait de levure _0,3 ml NaOH 10 N dans un litre d'eau distillée</p> <p><b><u>Milieu solide :</u></b> _on doit ajouter 20 g/l d'agar (LB solide), dans les deux cas le pH est ajusté à 7,4.</p>	<p>composé de : _5 g peptone _3 g extrait de levure _15 g d'agar dans 750 ml d'eau distillée.  _Le pH est ajusté avec du NaOH à une valeur désirée. Après stérilisation et refroidissement, 250 ml du lait écrémé ont été ajoutés et le milieu est homogénéisé puis coulé dans des boîtes de Pétri</p>	<p>composé de : _10 g caséine _2 g extrait de bœuf _2 g glucose _1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> _1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> _5 g NaCl _1% (v/v) d'oligoéléments (en g/l : ZnCl<sub>2</sub>, 0,4 ; FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 2 ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,065 et MoNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,135) dans un litre d'eau distillée et le pH est ajusté à 7,4.</p>

### Annexe N° II : Appareillage et Verrerie

- Fiole
- Boîte de petri
- Lame en verre
- Pipette pasteur
- Tube Eppendorf
- Micropipette
- Autoclave
- Balance électrique
- pH-mètre
- Agitateur
- Etuve

- Centrifugeuse
- Bain-marie



- Microscope à immersion
- Bec Bunsen

**Photos des appareils :**



Bain-marie



Agitateur magnétique



Autoclave



Centrifugeuse

Etuve



Balance électronique



Microscope à immersion

pH-mètre



**Photos de la verrerie :**

Tube Eppendorf

Pipette Pasteur



Boîte de Pétri  
Fiole

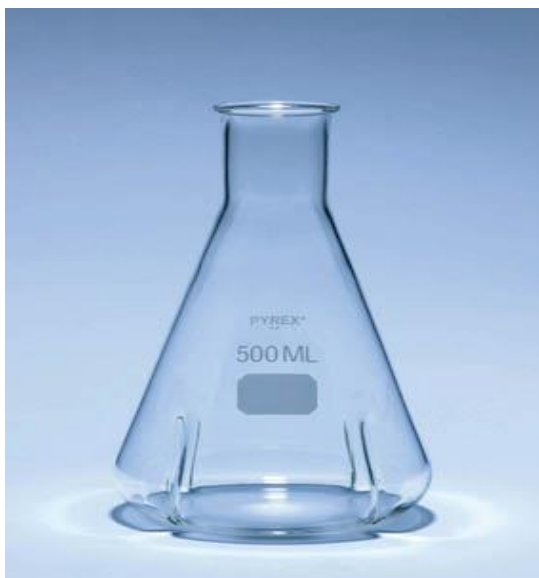


Lame

en



verre



Erlenmeyer a baffle



Tube à essai