

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE Saad DAHLE- BLIDA**

**Faculté des Sciences Agrovétérinaires**

Département des sciences Agronomiques

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Nutrition et transformation des aliments

**ISOLEMENT ET CRIBLAGE DE SOUCHES BACTÉRIENNES  
PRODUCTRICES DE PROTÉINES ALCALINES EN VUE D'UNE  
APPLICATION INDUSTRIELLE AU FROMAGE AFFINÉ**

Par

**Feriel REBZANI**

devant le jury composé de :

Mme. BEN HADJA L.	M. C. A, U.S.D. BLIDA	Présidente
M. BADIS A.	M. C. A, U.S.D. BLIDA	Promoteur
M. KHALI M.	M. C. A, U.S.D. BLIDA	Examineur
Mme. DOUMENDJI A.	M. C. A, U.S.D. BLIDA	Examinatrice

Blida, Février 2012

## RÉSUMÉ

Au cours de la présente étude, 135 souches bactériennes protéolytiques ont été isolées à partir des rejets des abattoirs. Leurs activités ont été décelées par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie. En se basant sur le rapport du diamètre de halo sur le diamètre de la colonie, 12 souches montrent des rapports supérieurs à celui de la souche de référence (*Streptomyces rochei* strain AB1). Ces souches ont été retenues pour la poursuite de notre étude. Ce criblage nous a permis de sélectionner cinq souches performantes en se basant sur la mesure de leurs activités protéolytiques dans un milieu liquide. Parmi lesquelles la souche S3F apparaît la plus intéressante puisqu'elle produit une ou plusieurs protéases actives dans une gamme de pH allant de 5,0 à 9,0 avec un optimum entre 5 et 7. L'indentification partielle de cette souche nous a permis de la rattacher au genre *Bacillus*. L'étude des potentialités d'application industrielle de la préparation protéasique de la souche S3F dans la production du fromage a montré que l'extrait enzymatique possède : une force coagulante très proche de celle de la présure de l'ordre de 34,44 et 33,66, respectivement, un temps de floculation de 14 minutes toujours dans la gamme de celui de la présure, des rendements fromagers très acceptables : le RBR (37,3%) proche de celui la présure (39,9%) et le RMS (59,3%) qui est un peu loin comparativement à 68,7% pour la présure.

**Mots clés:** Bactéries protéolytiques – Criblage – Protéases alcalines –S3F–Agent coagulant.

## ABSTRACT

In course of this present study 135 proteolytic bacterial strains have isolated from the abattoirs rejections their activity have disclosed by the appearance of a transperence halo around the colony. We base on the report of halo diameter on the colony diameter .12 strains shows some reports above than the reference strain (*Streptomyces rochei* strain AB1). These strains have restrained for the pursuit of study .This screening we permit select five performances strains in we base on the measure of their proteolytic activity in a liquid milieu .Among this strains, the stain S3F appears like the most interesting as she produces one or more active proteases in a range of pH from 5.0 to 9,0 with a optimum between 5 and 7 .The partially identification of this stain we have permitted to linkup in *Bacillus* genus. The study of industrial potentiality applications of proteinase preparation of the stain S3F in ripen cheese production has exhibited that the enzymatic extract posses: A coagulant force very close to the rennet of the order 34,44 and 33,66 respectively, A flocculation time of 14 minutes always in the range of the rennet ,A very acceptable cheeses produce :The RBR( 37,3%) close to the rennet (39,9%) and the RMS ( 59,3%) which is a less far comparatively an 68,7% for the rennet .

**Keys words:** Proteolytiques bacteriums – Screering– Alkalines Proteinases – Coagulant agent.

## ملخص

خلال هذه الأطروحة تم عزل 135 مجموعة بكتيرية محلمنة من فضلات المذبحة ، تم الكشف عن نشاطها من خلال انتشار البروتياز المفرزة في جيلوز المحيطة وهذا نتيجة تفكك بروتينات الحليب المترجم بظهور هالة شفافة حول المعسكات . تم تثقية 12 مجموعة بكتيرية على أساس حاصل أقطار الهالة على المعسكرة ، وذلك بالمقارنة مع حاصل المجموعة المرجع (Streptomyces rochei strain AB1) من خلال الدراسة الكمية لنشاط هذه المجمعات تم اختيار 05 مجموعات بكتيرية متقنة ، وبعد الدراسة التمييزية تمكنا من انتقاء مجموعة بكتيرية واحدة S 3 F والتي أظهرت إمكانية إفراز بروتياز نشطة على طول سلم pH من 5 إلى 9 مع نشاط أمثل ما بين 5 و 7 . إن نتائج الدراسة الجزيئية لهوية المجموعة S3F توحي بأنها تنتمي للنوع Bacillus anthracis . من خلال دراسة تطبيق هذه المجموعة في ترويب الحليب أظهرت أن البروتياز المفرزة من طرف المجموعة S3F تستحوذ على: قوة مروية (34 .44) وقريبة من قوة ترويب Présure (33.66) ، وقت تسبخ المجموعة S3F (14 دقيقة) واقع في سلم أوقات تسبخ Présure . مردود انتاج الجبن مقبول : RBR (37,3%) قريب من مردود Présure (39,9%) RMS (59,3%) بعيدا قليلا مقارنة مع المعطى من طرف Présure(68,7) .

الكلمات المفتاحية : البكتيريا المحلمنة – غريلة – بروتياز حمضية – S3 F – عامل ترويب

## REMERCIEMENTS

*Il est pour moi un honneur d'exprimer ma profonde reconnaissance et ma sincère gratitude à toutes les personnes ayant contribué à l'élaboration de ce travail.*

Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux responsables et personnels des différents organismes qui ont accepté et contribué à l'élaboration de ce travail principalement :

***Au niveau de l'institut national spécialisé de la formation professionnelle en Industrie agroalimentaire-Abou Baker Belkayed-de Blida***, Monsieur **YOUCEFI A.** Directeur Général , Monsieur **HARRKATI Y.** ex-Directeur des études, Monsieur **AHMED HADJALA M.** Directeur des études ,Monsieur **MALAK C.** Chef de service de la recherche et la documentation, Monsieur **TARRACHI A.,** Chef de service des laboratoires et moyens techniques et pédagogiques, Mademoiselle **BENARAB L** Enseignante et Parraine de la spécialité production des corps gras, Mademoiselle **MOUSSAOUI N.** Chef de service de la formation et la pédagogie, Messieurs **BOUAMRANE M. ,KARIM, SOUFIANE,** Mesdemoiselles **BERAHIMI F.,NADJATE ,MANEL** Techniciens Laborantins, Monsieur **WAHAB** Bibliothécaire. Monsieur **EL HACHEMI** Agent de sécurité.

***Au niveau de L'abattoir communal de la wilaya de Blida***, Monsieur **BOUDERGOUMA** Médecin vétérinaire Inspecteur principal, Mademoiselle **NADIA** Médecin vétérinaire Inspectrice. et Monsieur **HASSANI** Agent d'abattage.

***Au niveau de l'unité BIOTIC SAIDAL d'El Harrach***, Monsieur **BENHADJI** Directeur Général, Mademoiselle **SOULAF** et Monsieur **LAZHAR,** Ingénieurs Laborantins .

***Au niveau du complexe ANTIBIOTICAL SAIDAL de Médéa***, Monsieur Président Directeur Général **Saadoud** ,Madame **SONIA** Responsable des Laboratoires .

**Au niveau de la laiterie LBT-Blida.** Monsieur **AYACHI NOURREDINE**  
Responsable de la production.

Je tiens à remercier vivement Monsieur **BADIS A. Maitre de.Conférences.A. U.S.D. BLIDA** pour son encadrement scientifique. Sa compréhension, son aide et ses conseils m'ont été très précieux tout au long de ce travail. Que ce travail soit un témoignage de ma grande reconnaissance.

Je remercie sincèrement Mesdames **L. BOUTEKRABET Maitre de.Conférences.A. U.S.D. BLIDA** et **A.DOUMENDJI. Maitre de.Conférences.A. U.S.D. BLIDA** et Monsieur **M.KHALI Maitre de.Conférences.A. U.S.D. BLIDA** d'avoir accepté de juger ce présent travail.

Je remercie, également, tous les enseignants qui ont contribué à ma formation tout au long de mes études.

Je remercie sincèrement mon petit frangin **MOUHAMED REDA** d'avoir contribué dans l'élaboration de ce manuscrit.

J'adresse toute ma reconnaissance et mes remerciements à tous les membres de ma famille pour toute la peine qu'ils se sont continuellement donnée pendant toutes mes études et pour leur aide très précieuse tant sur le plan moral que sur le plan matériel.

Que tous mes ami(e)s trouvent ici l'expression de mon grand estime et mon éternelle amitié.

Enfin, je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé et soutenu afin d'accomplir ce présent travail.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.	2
REMERCIEMENTS.	5
TABLE DES MATIÈRES.	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.	9
INTRODUCTION.	11
1. LES PROTÉASES.	13
1.1. Généralités.	13
1.2. Nomenclature et classification.	14
1.2.1. Peptidases à sérine.	18
1.2.2. Peptidases à cystéine ou à thiol.	26
1.2.3. Peptidases à acide aspartique .	29
1.2.4. Peptidases à métal.	33
1.2.5. Peptidases à thréonine.	35
1.2.6. Peptidases non classées.	36
1.3. Sources des protéases.	37
1.3.1 Les protéases d'origine végétale.	37
1.3.2. Les protéases d'origine animale.	38
1.3.3. Les protéases d'origine microbienne.	39
1.3.3.1. Les protéases fongiques.	39
1.3.3.2. Les protéases bactériennes.	40
1.3.3.3. Les bactéries protéolytiques.	41
2. LES PROTÉASES DANS L'INDUSTRIE FROMAGÈRE.	47
2.1. Applications biotechnologiques des protéases.	47
2.1.1. L'industrie alimentaire.	47
2.1.2. La détergence.	49
2.1.3. Synthèse de peptides.	49
2.1.4. Synthèse de chimique.	50
2.1.5. La tannerie.	51
2.1.6. Le traitement de la soie.	52
2.1.7. L'industrie pharmaceutique.et usage médical.	52
2.1.8. Le traitement des rejets industriels et des ordures ménagères.	52
2.1.9. Traitement des films photographiques.	53
2.2. Les protéases dans l'industrie fromagère.	54
2.2.1. Le fromage.	54
2.2.2. Caséines.	55
2.2.3. Enzymes coagulantes.	56
2.2.4. Coagulation.	62
2.2.5. Protéases de l'affinage.	63
2.2.6. L'affinage et problème d'amertume.	69
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES.	71
3.1. Matériel.	71

3.1.1. Matériel biologique.	71
3.1.2. Le lait.	72
3.1.3. La pésure.	72
3.1.4. Verrerie ,matériel et equipements.	72
3.2. Méthodes.	73
3.2.1. Isolement des souches bactériennes protéolytiques.	73
3.2.1.1.Milieus et conditions de culture.	73
3.2.1.2.Isolement des souches bactériennes protéolytiques.	74
3.2.1.3.Conservation des souches.	74
3.2.2. Caractérisation physicochimique des préparations enzymatiques des meilleures souches.	77
3.2.3. Identification de la souche retenue.	79
3.2.3.1. Études morphologiques et observation microscopique.	79
3.2.3.2. Études physiologiques.	80
3.2.3.3. Études biochimiques.	81
3.2.4. Etude des potentialités d'application industrielle de la préparation protéasique de la souche retenue.	82
3.2.4.1. Production de protéases par la souche S3F.	82
3.2.4.2. Cinétique de production des protéases.	84
3.2.4.3. Étude de l'aptitude technologique de la preparation Enzymatique.	84
4. RÉSULTATS ET DISCUSSION.	88
4.1 Isolement et criblage des souches productrices de protéases intéressantes.	88
4.2 Caractérisation microbiologique et biochimique des préparations protéolytiques.	90
4.3 Identification de la souche S3F.	105
4.4 Etude des potentialités d'application industrielle de la préparation protéasique de la souche retenue.	109
CONCLUSION GÉNÉRALE.	134
APPENDICES.	136
A. Liste des symboles.	136
B. Etude moléculaire de la souche AB1.	138
C. Les milieux axillaires, solutions et tampons.	146
D. Coloration de Gram.	149
E. La courbe d'étalonnage de la tyrosine.	150
F. Identification moléculaire de la souche AB1.	152
RÉFÉRENCES BIBLILOGAPHIQUES.	160



## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.

Figure 1 .1	Schéma représentant la nomenclature des peptidases.	16
Figure 1.2	Comparaison structurale entre la chymotrypsine (A) et La subtilisine(B)	21
Figure 1.3	Topologie spatiale du site actif et les résidus d'amino-acides impliqués dans le Mécanismes catalytique chez la chymotrypsine (A) en comparaison a ceux chez La substilisine (B).	21
Figure 1.4	Représentation schématique des deux étapes du mécanisme catalytique des protéases à sérine.	23
Figure 1.5	Étude structurale de la chymotrypsine.	24
Figure 1.6	Les éléments structuraux qui explique la catalyse des quelques peptidase à sérine	25
Figure 1.7	Nomenclature de Schechter et Berger (1967) de la spécificité de coupure suit à l'interaction du complexe protéase-substrat	26
Figure 1.8	Structure en ruban de la papaïne.	28
Figure 1.9	Représentation schématique du mécanisme catalytique de la protéase à acide aspartique.	32
Figure 1.10	Aspect morphologique de la souche <i>Bacillus pumilus</i> .	43
Figure 2.1	Micrographe d'une micelle de caséine individuelle.	56
Figure 2.2	Micelles (A) et Submicelles(B).	56
Figure 4.1	Mise en évidence d'activités protéolytique produites par différentes souches bactériennes sur gélose nutritive au lait ( test-semi qualitatif).	88
Figure 4.2	Effet de pH sur l'activité des préparations enzymatiques des cinq souches retenue	93
Figure 4.3	Effet de la température sur l'activité des cinq souches	96
Figure 4.4	Effet de la température sur la stabilité des préparations enzymatiques des 5 souches.	99
Figure 4.5	Effet des cations métallique sur l'activité des 5 souches.	101
Figure 4.6	Aspect des cellules bactériennes sous microscope optique G×100 (photos originales).	106
Figure 4.7	Le test biochimique en utilisant la galerie API CH50 (photos originales).	107
Figure 4.8	Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de la protéase.	112
Figure 4.9	Effet de différentes sources d'azote sur la production de l'enzyme 6protéolytique.	11

Figure 4.10	Optimisation de la concentration en $\text{CaCl}_2$ sur la production de la protéase.	119
Figure4.11	Optimisation de la concentration de $\text{K}_2\text{HPO}_4$ et $\text{KH}_2\text{PO}_4$ sur la production de la protéase.	120
Figure 4.12	Effet de l'agitation sur la production de l'enzyme protéolytique.	122
Figure4.13	Cinétique de la croissance et suivie de l'activité protéasique de la S3F.	122
Tableau 1.1	Clans et familles des peptidases à sérine .	19
Tableau 1.2	Clans et familles des peptidases cysteine .	28
Tableau 1.3	Clans et familles des peptidases à acide aspartique.	31
Tableau 1.4	Clans et familles des peptidases à métal.	34
Tableau 1.5	Clans et familles des peptidases à thréosine.	36
Tableau 1.6	Clans et familles des peptidases à type catalytique inconnu.	37
Tableau 1.7	Caractéristiques des principales espèces de <i>Micrococcus</i> .	46
Tableau 4.1	Tableau récapitulatif des activités protéolytiques sur milieu solide GNL (test semi-qualitatif) des souches bactériennes retenues.	89
Tableau 4.2	Activités protéolytiques sur milieu liquide (test qualitatif) des souches bactériennes retenues.	90
Tableau 4.3	Tableau récapitulatif des activités des préparations protéolytiques des 5 souches retenues en fonction du pH.	95
Tableau 4.4	Tableau récapitulatif des activités des préparations protéolytiques des 5 souches bactériennes retenues en fonction de la température.	97
Tableau 4.5	Résultats préliminaires d'identification.	106
Tableau 4.6	Résultats des tests de La galerie API CH 50.	108
Tableau 4.7	Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de la protéase	111
Tableau 4.8	Effet de la concentration de la gélatine sur la croissance bactérienne et sur la production de la protéase.	114
Tableau 4.9	Effet de différentes sources d'azote sur la croissance et la production de l'enzyme protéolytique.	116
Tableau 4.10	Effet de la concentration de l'extrait de levure sur la croissance bactérienne et sur la production de la protéase.	118
Tableau 4.11	Effet de l'agitation sur la production de l'enzyme protéolytique.	121
Tableau 4.12	Caractéristiques physico-chimiques des produits.	128
Tableau 4.13	Activité coagulante (UP) et force coagulante (F) des 2 préparations enzymatiques.	129
Tableau 4.14	Temps de floculation (tf) des 2 préparations enzymatiques.	130

## INTRODUCTION

Aujourd'hui, les protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et utilisé en biotechnologie industrielle. En effet, ce groupe d'hydrolases couvre 65% du marché mondial des enzymes. Toutefois, la part des protéases dans ce marché est essentiellement dominé par les protéases alcalines d'origine microbienne, particulièrement du genre *Bacillus*, avec près de 40% du marché total [1]. Elles sont utilisées dans différents domaines notamment l'industrie agroalimentaire, la détergence, la tannerie, l'industrie textile, etc. [2;3].

Les matières premières des industries agroalimentaires sont des produits complexes, d'origine végétale ou animale dont l'obtention fait intervenir de nombreuses étapes de biosynthèse. Les enzymes, protéines complexes, étant des catalyseurs accélérant les vitesses de réactions sont donc très adaptées aux transformations laitières [4;5]. D'autre part, leur spécificité d'action permet au technologue d'agir sélectivement sur un constituant du lait, sans en modifier les autres. En fromagerie, des lipases et des protéases exogènes remplacent les enzymes naturelles du lait détruites par la pasteurisation. En outre, l'utilisation des protéases en première étape pour la coagulation du lait, et ultérieurement au cours de la maturation, permet d'accélérer le processus de l'affinage des fromages [6;7].

Les protéases alcalines sont utilisées dans la production du fromage, du petit lait avec une estimation de production mondiale de  $145 \cdot 10^6$  t/an [8]. A cet égard, l'utilisation des protéases alcalines dans les produits laitiers pourrait intervenir dans l'amélioration de la qualité du produit final, notamment dans l'affinage.

Ainsi il y a un besoin clair pour ce genre d'enzymes dans le monde en général et dans notre pays en particulier vu le développement notable du secteur laitier où la consommation du lait et produits laitiers a augmenté de 2,7 million de tonnes en 1990 à 3.3 million de tonnes en 2010 alors que leur production ne dépasse pas 1.3 million de tonnes, et la production fromagère a atteint 1540 tonnes en l'an 2000 avec une consommation moyenne de 0.7 kg /personne/an [9]. L'Algérie reste dépendante en matière d'approvisionnement en protéases vis à vis

des firmes étrangères en vue de leurs utilisations dans la fabrication de fromages, principalement le Camembert et l'Edam.

Bien que les protéases d'origine animale soient encore les enzymes les plus utilisées en fromagerie, leur production connaît une pénurie mondiale croissante. Cette pénurie est due essentiellement à une augmentation croissante de la production et la consommation du fromage, et l'impossibilité d'augmenter en parallèle la production enzymatique. Cette pénurie a provoqué des fluctuations très importantes de son prix [8]. Ces raisons ont fait que de nombreuses recherches ont été entreprises afin de trouver des succédanés, d'origines végétales et microbiennes, efficaces et compétitives utilisables industriellement.

Cependant, les protéases doivent être employées avec précaution car elles sont susceptibles d'engendrer des défauts d'arômes [6 ; 10; 4]. Du fait de leur activité protéolytique au cours de l'affinage des fromages, la présure de veau, comme les autres enzymes coagulantes ainsi que les agents d'affinage, peuvent être à l'origine de peptides au goût amer ce qui cause le problème d'amertume des fromages. Afin de remédier à ce problème d'amertume plusieurs solutions ont été entreprises telles que l'encapsulation des protéases d'affinage dans des liposomes, le chauffage du lait avant emprésurage, l'augmentation de la concentration des sels ajoutés, la recherche de souches protéolytiques dites «non amères».

Le travail présenté dans ce mémoire a pour but de rechercher des souches bactériennes sécrétrices de protéases alcalines. Par la suite, choisir la plus performante possible qui réponde aux exigences des applications industrielles visées afin de contribuer au remède de ces problèmes rencontrés dans la fabrication des fromages affinés. La caractérisation biochimique de cette activité ainsi que l'identification de la souche productrice est l'un des objectifs de ce travail.

Ce travail de recherche s'articule sur (1) isolement et criblage des souches productrices de protéases alcalines, (2) identification de la souche performante productrice d'une protéase alcaline d'intérêt industriel et (3) étude des potentialités d'application industrielle de la préparation enzymatique choisie.

# CHAPITRE 1

## LES PROTÉASES

### 1.1. Généralités

Les protéases ou enzymes protéolytiques sont des enzymes hydrolytiques qui catalysent les réactions de coupure des liaisons peptidiques au niveau des protéines et des peptides avec différents degrés de spécificités [11]. Elles peuvent être rencontrées chez tous les organismes vivants, occupant une place privilégiée tant sur le plan physiologique que commercial [12;13].

*In vivo*, les protéases jouent un rôle très important notamment dans :

- ◆ la nutrition, en dégradant les polypeptides en substances facilement assimilables par les cellules ;
- ◆ la régulation de nombreux processus métaboliques, tels que dans le “turnover” des protéines cellulaires, le contrôle de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines, ainsi que la sécrétion des enzymes cellulaires sous forme active [14;1] ;
- ◆ le processus de régulation des gènes en réalisant la maturation des enzymes et des facteurs qui contrôlent l'expression de ces gènes [15] ;
- ◆ les phénomènes de coagulation, de la fibrinolyse et le contrôle de la pression sanguine chez les mammifères [16;17] ;
- ◆ la sporulation de certaines bactéries et levures [13];
- ◆ la germination des spores ;
- ◆ le processus de transport et de sécrétion des protéines à travers les membranes [13].

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. Il existe deux mécanismes de régulation. Le premier est l'activation de précurseurs inactifs ou zymogènes par protéolyse

limitée et le deuxième est l'inactivation de ces protéases par formation de complexes avec des inhibiteurs spécifiques. L'importance physiologique de ces deux mécanismes a été démontrée dans certaines maladies. Par exemple, plusieurs types d'hémophilie sont dus à une déficience de protéases plasmatiques qui normalement activent les zymogènes de la cascade de coagulation sanguine [18].

Malgré leur large diversité, les protéases peuvent avoir une action spécifique, ce qui est à l'origine de leur exploitation et leur application physiologique et biotechnologique [13].

Aujourd'hui, les protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et le plus largement utilisé en biotechnologie industrielle. En effet, ce groupe couvre 65% du marché total des enzymes [19;20]. Toutefois, la part des ces protéases dans le marché mondial est essentiellement dominée par les protéases alcalines microbiennes, avec près de 40% de ce marché [1;21;22;6]. Les principaux acteurs économiques du développement industriel de ces catalyseurs biologiques dans le secteur agro-industriel sont, d'une part, les transformateurs de la production agricole, d'autre part, les concepteurs et réalisateurs de préparations enzymatiques utilisées à l'échelle industrielle. Les gros consommateurs d'enzymes sont l'industrie des détergents, la fromagerie, l'amidonnerie et d'autres industries alimentaires d'origines végétales (secteurs des boissons, boulangerie-pâtisserie, confiserie...) [6]. Le marché mondial des enzymes est dominé par la société Novo Nordisk-Danmark (40 %) et la société Gist-Brocades-Hollande (20 %). Les autres producteurs sont Genencor International-USA (10 %), Miles Laboratories-USA (10 %), Rohm Darmstadt-RFA, Boehringer Ingelheim-RFA,...[13;6].

## 1.2. Nomenclature et classification

Les peptidases (ou protéases ou enzymes protéolytiques) sont des enzymes qui brisent les liaisons peptidiques des protéines. On parle alors de *coupure protéolytique* ou de protéolyse. Ce processus implique l'utilisation d'une molécule d'eau ce qui les classe parmi les hydrolases.

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,[24]. 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>. 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 [25;26] 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 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).

✓ Classification selon le mode d'action

En se basant sur leur site d'action, les protéases sont divisées en deux groupes, d'une part les exopeptidases qui réalisent une hydrolyse à partir des extrémités d'un peptide et d'autre part, les endopeptidases ou protéinases qui hydrolysent une liaison peptidique interne [27;28] . Cette nomenclature est schématisée dans la figure 1.1.

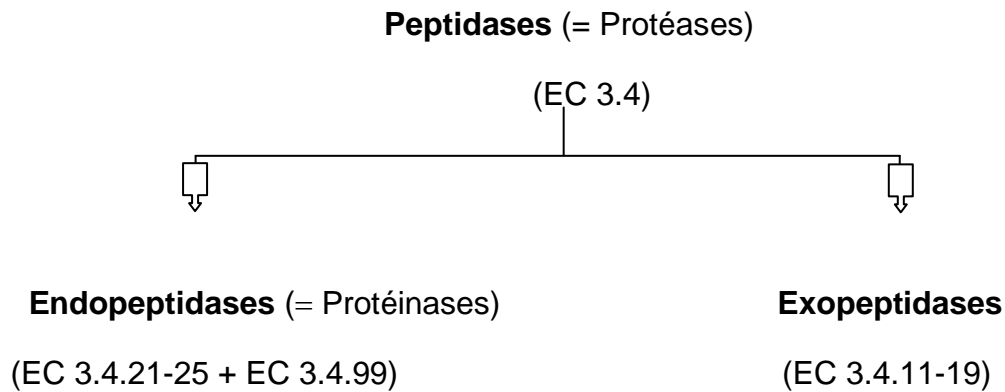


Figure 1.1: Schéma représentant la nomenclature des peptidases [29].

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) [30]. 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 omégas 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 isopeptidiques (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 cinq sous-sous-classes distinctes en fonction de leurs mécanismes catalytiques : les endopeptidases à sérine (EC 3.4.21), les endopeptidases à cystéine (EC 3.4.22), les endopeptidases à acide aspartique (EC 3.4.23), les endopeptidases à métal (EC 3.4.24) et les endopeptidases à thréonine (EC 3.4.25) [13;31] . A côté de ces cinq 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).

✓ Classification selon la nature du résidu nucléophile site actif

Les endopeptidases à sérine, à thréonine et à cystéine sont, d'un point de vue catalytique, très différentes des endopeptidases à acide aspartique et à métal dans la mesure où le nucléophile du site catalytique fait partie d'un résidu d'acide aminé. Alors que, chez ceux à acide aspartique et à métal le nucléophile fait partie d'une molécule d'eau activée. Une des conséquences qui en découle est que les intermédiaires, qui sont des enzymes "acyl", peuvent seulement être formés dans les réactions impliquant les endopeptidases à sérine, à thréonine et à cystéine. Elles sont ainsi les seules à pouvoir agir comme des transférases. Les structures moléculaires des protéinases ont été déterminées utilisant des analyses de séquences en acides aminés et des études de cristallographie. Dans la plupart des cas, le site catalytique se situe dans un sillon trouvé à la surface de la molécule d'enzyme.

✓ Classification selon la structure tridimensionnelle et l'origine évolutive

Avant de parler plus en détail de chacune des classes de peptidases, il est intéressant d'introduire ici l'idée que certains chercheurs ont développé une nouvelle approche de classification des peptidases [32]. En effet, ces auteurs ont estimé que la division des peptidases en seulement 14 sous-sous-classes, dans la liste EC, n'est pas adéquate pour un groupe si vaste d'enzymes et propose une nouvelle classification beaucoup plus détaillée. Ainsi, ils ont proposé de regrouper les enzymes qui sont similaires à la fois dans leur structure 3D et dans leur origine d'un point de vue évolutif. Ce nouveau système de classification des peptidases est à la base de la banque de données MEROPS qui est disponible sur internet depuis 1996 [33] et qui est à la base également du livre des enzymes protéolytiques édité en 1998 [34]. D'après ces auteurs, les peptidases sont classées en familles en fonction de l'homologie de séquences en acides aminés et structure et les familles sont regroupées en clans dans la mesure où il existe l'évidence qu'elles partagent une origine ancestrale commune.

Selon le type de catalyseur, on distingue les 5 clans suivant : S- pour Sérine, A- pour Aspartate, C- pour Cystéine, M- pour Métal et T- pour Thréonine. Certains clans sont divisés en sous-clan parce qu'il y'a la preuve d'une très ancienne divergence au sein du clan, par exemple MA (E), la mycolysine, et MA (M), la snaplysine.

Par ailleurs, en plus de ces 5 clans identifiés, il existe des peptidases qui n'ont pas encore été attribuées à une famille ou à un clan en particulier car les informations sur leurs séquences en acides aminés sont insuffisantes. Ces peptidases sont regroupées dans le clan supplémentaire U- (« Unknown ») [35]. Ces peptidases ne seront pas mentionnées dans la suite du manuscrit. Toutefois, il est important de les citer car elles sont relativement nombreuses (199) avec la répartition suivante : peptidases à acide aspartique (10) ; peptidases à cystéine (18) ; peptidases à métal (71) ; peptidases à sérine (64) ; peptidases de type catalytique inconnu (36). Sur ces 199 peptidases, seulement 39 sont incluses dans la liste EC, soit environ 20%.

Pour ces raisons, nous allons adopter par la suite cette nouvelle classification qui est complémentaire de la liste EC. Nous nous devons, ici rappeler à quelle vitesse évoluent les informations biochimiques disponibles sur ce sujet.

### 1.2.1. Peptidases à sérine

C'est le groupe le plus répondu dans le monde des microorganismes et des eucaryotes supérieures, ces protéases sont caractérisées par la présence dans le site actif d'une triade catalytique constituée de l'aspartate , serine et histidine [13,15].

### 1.2.1.1. Clan et famille

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 alors une liaison peptidique. Les peptidases à sérine étaient classées en deux super-familles, chymotrypsine et subtilisine [36;37]. En se basant sur le nouveau système de classification des peptidases, nous pouvons observer que les peptidases à sérine sont regroupées en 39 familles en fonction des comparaisons de séquences en acides aminés.

Ces familles ont elles mêmes été regroupées en 10 clans : SB, SC, SE, SF, SH, SK, SM, PA(S), PB(S) et PC(S). En plus de ces 10 clans, il existe un clan supplémentaire SX où sont regroupées 6 de ces familles qui n'ont pas encore pu être attribuées à un clan en particulier (tableau 1. 1). Ces peptidases ont une faible masse moléculaire (MM) entre 18 et 35 kDa à l'exception de la protéase de *B. subtilis* qui fait 90 kDa [38] et ont un optimum de pH de 7,0 à 12,0 [39]. Elles sont inhibées par le phénylméthylsulphonyl fluoride (PMSF) et le diisopropylfluoro - phosphate (DFP). Certaines peptidases à sérines 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.

Tableau 1.1: Clans et familles des peptidases à sérine. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS [33].

<u>Clans</u>	<u>Familles</u>	<u>Exemples de peptidases</u>
<b>SB</b>	<b>S8</b> S53	<b>subtilisine</b> Carlsberg ( <i>Bacillus licheniformis</i> ) pseudomonapepsine ( <i>Pseudomonas</i> sp. 101)
<b>SC</b>	S9 S10 S15 S28 S33 S37	oligopeptidase prolyl ( <i>Sus scrofa</i> ) carboxypeptidase Y ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) dipeptidyl-peptidase X-Pro ( <i>Lactococcus lactis</i> ) carboxypeptidase lysosomal Pro-X ( <i>Homo sapiens</i> ) aminopeptidase prolyl ( <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ) peptidase PS-10 ( <i>Streptomyces lividans</i> )
<b>SE</b>	S11 S12 S13	carboxypeptidase A D-Ala-D-Ala ( <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ) carboxypeptidase B D-Ala-D-Ala ( <i>Streptomyces</i> sp.) peptidase C D-Ala-D-Ala ( <i>Escherichia coli</i> )
<b>SF</b>	S16 S24	protéase lon ( <i>Escherichia coli</i> ) répresseur LexA ( <i>Escherichia coli</i> )

	S26 S50	signal peptidase I ( <i>Escherichia coli</i> ) protéase Vp4 de birnavirus de nécrose infectieuse pancréatique
<b>SH</b>	S21	assembléine de cytomegalovirus (cytomegalovirus humain)
<b>SK</b>	S14	endopeptidase Clp ( <i>Escherichia coli</i> )
<b>SM</b>	S41	protéase-1 C-terminal ( <i>Escherichia coli</i> )
<b>SX</b>	S19 S38 S46 S48 S49 S54	protéase chymotrypsin-like ( <i>Coccidioides immitis</i> ) protéase PrtB putative chymotrypsin-like ( <i>Treponema denticola</i> ) dipeptidyl-peptidase 7 ( <i>Porphyromonas gingivalis</i> ) endopeptidase HetR ( <i>Anabaena variabilis</i> ) protéase IV ( <i>Escherichia coli</i> ) Rhomboïde-1 ( <i>Drosophila melanogaster</i> )
<b>PA(S)</b>	<b>S1</b> S3 S6 S7 S29 S30 S31 S32 S35 S39 S43 S55	<b>chymotrypsine A</b> ( <i>Bos taurus</i> ) togavirine (virus Sindbis) endopeptidase à sérine spécifique IgA1 ( <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ) flavivirine (virus « yellow fever ») hepacivirine (virus de l'hépatite C) protéinase de potyvirus P1 peptidase polyprotéine de pestivirus NS3 endopeptidase à sérine de virus équin protéase à sérine de capillovirus protéinase de sobemovirus porine protéine D2 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) peptidase SpoIVB ( <i>Bacillus subtilis</i> )
<b>PB(S)</b>	S45 S58	précurseur de la pénicilline acylase ( <i>Escherichia coli</i> ) aminopeptidase DmpA ( <i>Ochrobactrum anthropi</i> )
<b>PC(S)</b>	S51	dipeptidase E ( <i>Escherichia coli</i> )

Les protéases appartenant à la famille S1 (chymotrypsine, figure 1.2A) sont rencontrées chez les micro-organismes procaryotes et eucaryotes, les plantes et les animaux vertébrés tandis que celles appartenant à la famille S8 (subtilisine, figure 1.2B) sont uniquement rencontrées chez les bactéries. Ces deux familles possèdent la même orientation géométrique du site actif (figure1.3) et partagent le même mécanisme catalytique (figure1. 4), par contre le repliement de leur protéines ainsi que leur structures tertiaires sont complètement différentes, ceci confirme la convergence dans l'évolution [39;40;41] .

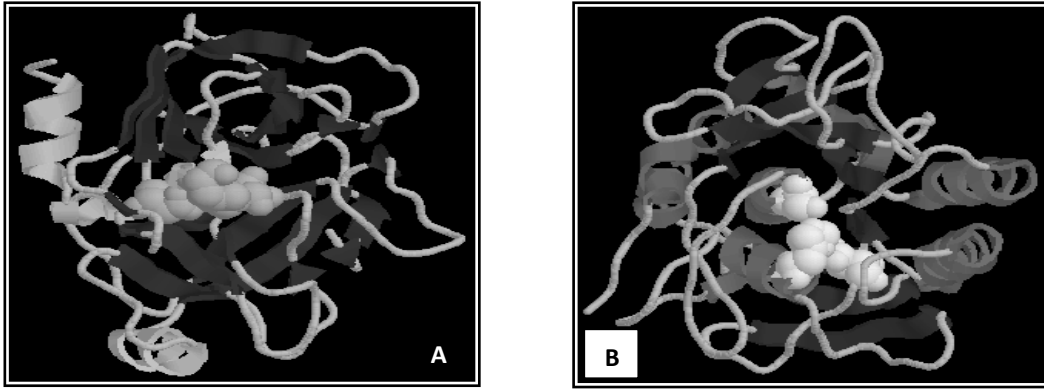


Figure 1.2 : Comparaison structurale entre la chymotrypsine (A) et la subtilisine (B). [44].

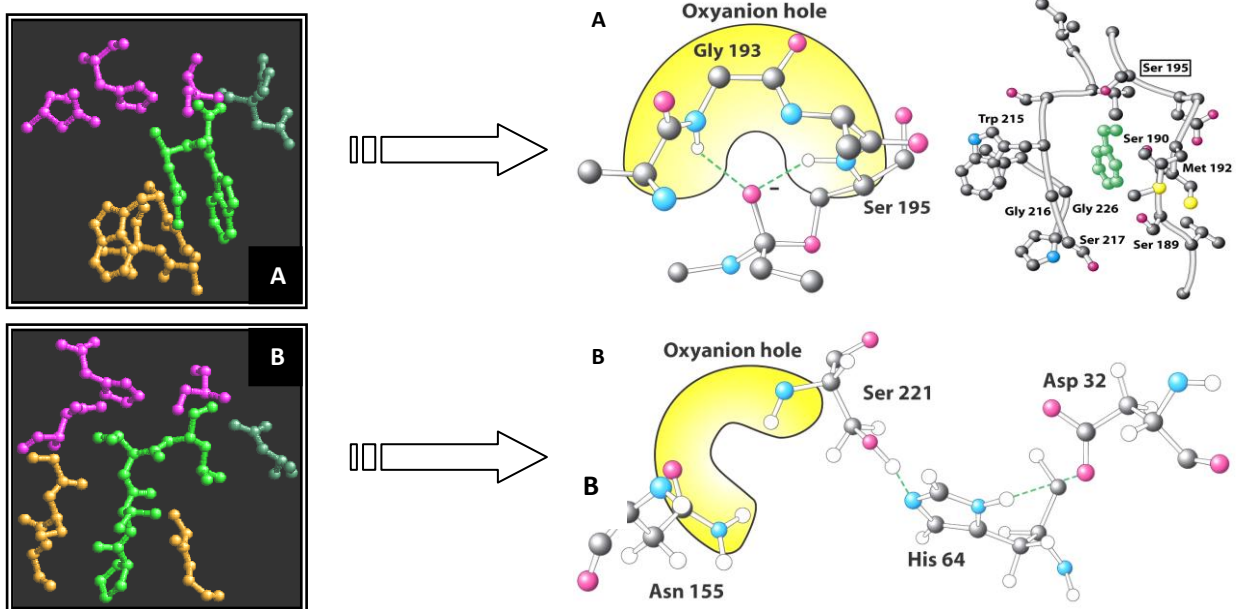


Figure 1.3 : Topologie spatiale du site actif et les résidus d'acides aminés impliqués dans le mécanisme catalytique chez la chymotrypsine (A) en comparaison à ceux chez la subtilisine (B).

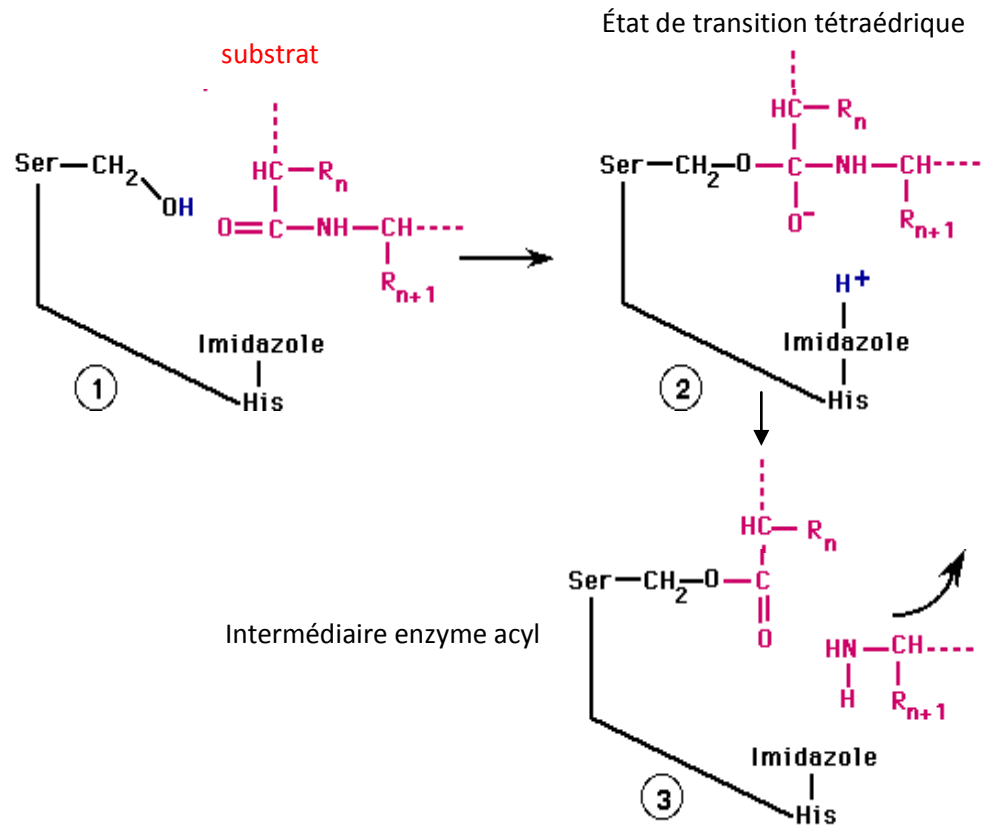
Les résidus d'His57, d'Asp102 et de Ser195 forment la triade catalytique de la chymotrypsine. Tandis que, les résidus d'Asp32, d'His63 et de Ser220 ou d'Asp32, d'His64 et de Ser221 forment la triade catalytique pour, respectivement, la subtilisine Carlsberg [44] et la subtilisine Novo [45]. Toutefois, certains auteurs ont montré qu'il existe des différences importantes entre les peptidases à sérine, notamment concernant les résidus d'acides aminés impliqués dans le mécanisme catalytique[46].

### 1.2.1.2. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique implique de manière générale, en plus du résidu de sérine qui porte le nucléophile, un donneur de proton (base). Chez les clans PA(S), SB, SC et SH, le donneur de proton est un résidu d'histidine et il existe une triade catalytique puisqu'un troisième résidu est nécessaire, probablement en raison de l'orientation de l'anneau imidazole de l'histidine. Il s'agit le plus souvent d'un acide aspartique mais il peut s'agir aussi d'un autre résidu d'histidine, comme c'est le cas pour le clan SH. Chez les clans SE et SF, c'est un résidu de lysine qui possède le rôle de donneur de proton, et dans ce cas, un troisième résidu catalytique n'est pas nécessaire. Chez le clan SF, certaines peptidases ont une diade catalytique Ser/His[34]. Quant à la catalyse à proprement parlé, les protéases à sérine ont en commun le mécanisme de coupure (figure 1.4), basé sur la polarisation de la liaison peptidique par un groupement sérine sous forme alcoolate. Pour atteindre cet état, une histidine et un aspartate, formant une triade avec la sérine, doivent être positionnés pour que la liaison OH de la sérine soit très fortement polarisée. Le mécanisme se déroule en deux temps (mécanisme de type ping-pong)[13] :

Parmi les protéases qui fonctionnent selon ce mécanisme, on trouve la chymotrypsine (résidus hydrophobes), la trypsine (résidus basiques), l'élastase (résidus peu encombrant) et la subtilisine (résidus hydrophobes pas trop gros), ainsi que la thrombine, la plasmine, la kallikréine et l'acrosine.

## Acylation



## Désacylation

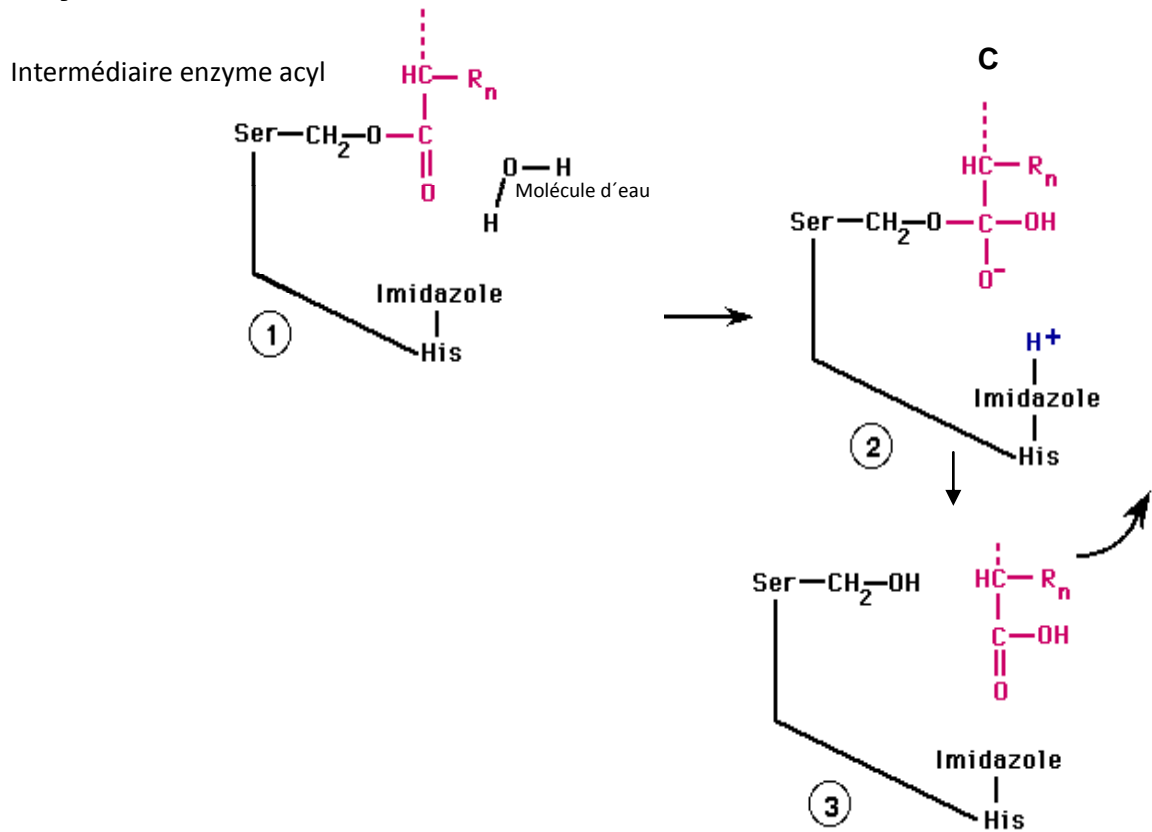


Figure 1.4: Représentation schématique des deux étapes du mécanisme catalytique des protéases à sérine [47].

### 1.2.1.3. Données structurales et phylogénétiques

Étant donné que les études biochimiques, moléculaires et structurales ont été plus avancées chez la chymotrypsine que chez la subtilisine. La structure de la chymotrypsine bovine est constituée de deux domaines (1 et 2), chacun étant constitué essentiellement d'un tonneau  $\beta$ , formé de 6 brins  $\beta$  antiparallèles. Il y a une certaine similarité de séquences entre les deux domaines, si bien que l'on suppose qu'ils découlent d'un gène unique ancestral, dupliqué ensuite, et qui a fait l'objet de mutations indépendantes. Les éléments de la triade sont fixés sur les deux domaines, qui participent ainsi tous les deux au même acte catalytique : D et H sont sur le domaine 1, tandis que S est sur le domaine 2 (figure 1.5).

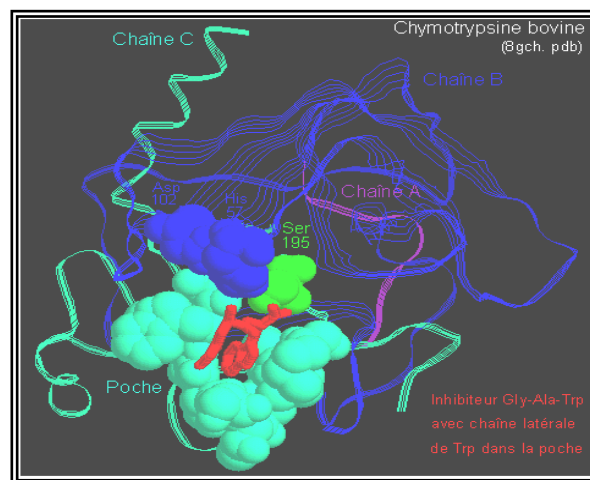


Figure 1.5 : Etude structurale de la chymotrypsine. La chymotrypsine active comprend 3 chaînes peptidiques A, B et C liées par deux ponts disulfures (non représentés ici). Deux des acides aminés de la triade catalytique D102 et H57 appartiennent à la chaîne B alors que S195 fait partie de la chaîne C ainsi que tous les résidus dont les chaînes latérales bordent la poche dans laquelle vient se placer ici la chaîne latérale apolaire de Trp.

Les éléments structuraux qui expliquent la catalyse, ayant une structure tridimensionnelle détaillée sur la figure 1.6



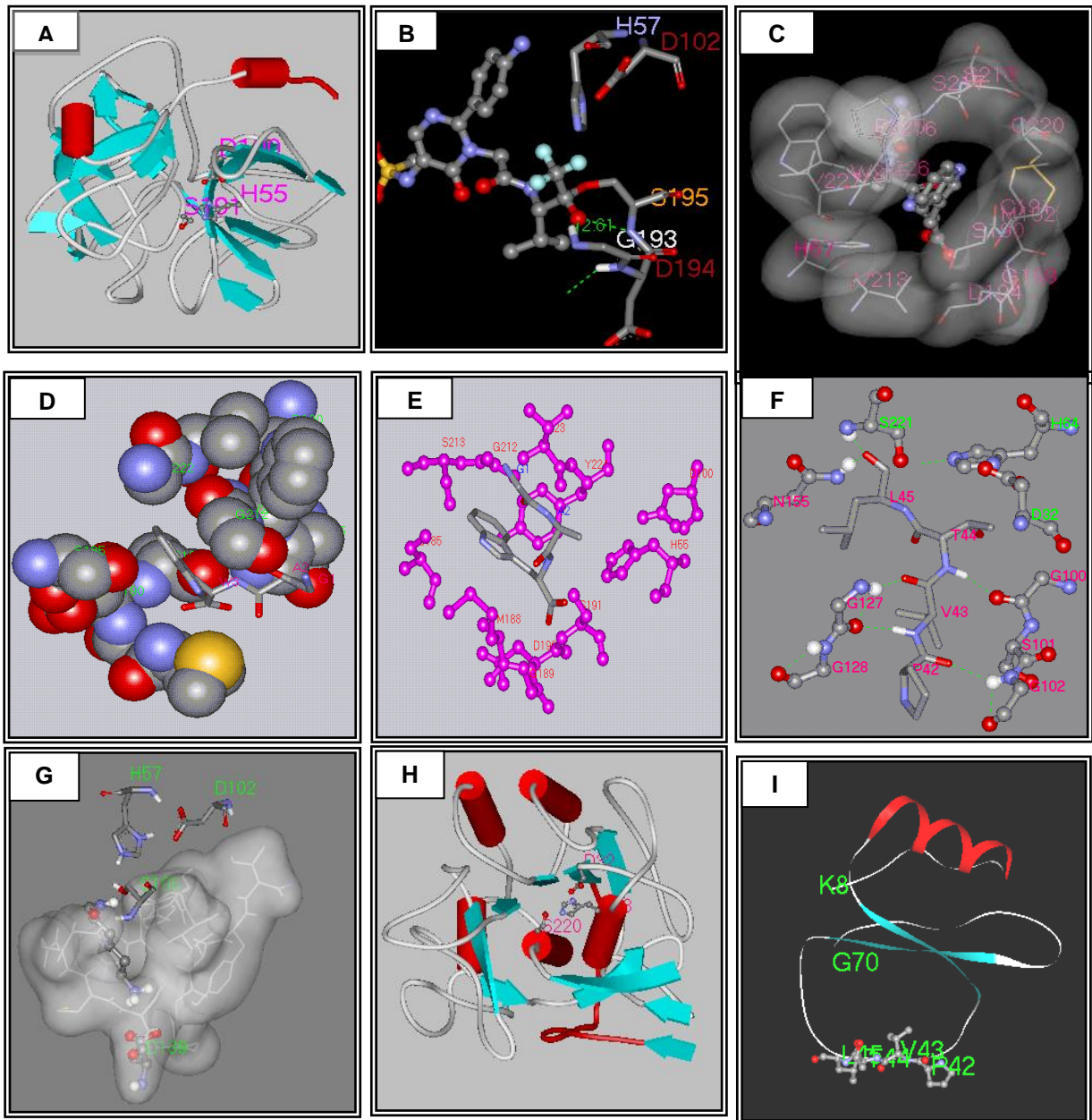


Figure 1.6 : Les éléments structuraux qui expliquent la catalyse dans le cas de (D), la chymotrypsine gamma (code-pdb : 8GCH) complexée avec le tripeptide Gly-Ala-Trp, (E), la trypsine (code-pdb : 1SMF) complexée par l'inhibiteur de Bowmann-Birk ( $K_{11}$  de 22 aas) et (F), la subtilisine Carlsberg (code-pdb : 1CSE) complexées avec un inhibiteur peptidique ( $P_{42}V_{43}L_{44}T_{45}$  de 70 aas). (G), poche de trypsine, (H), cas de subtilisine et (I), substrat. Ces acides aminés 42-45 sont représentés au milieu des acides aminés de l'enzyme (comportant des boules représentant chaque atome).

La spécificité de la coupure est apportée par les acides aminés autour de la liaison peptidique coupée ( $P_1$ - $P_1'$ ) dans la nomenclature:  $P_4$ - $P_3$ - $P_2$ - $P_1$ - $P_1'$ - $P_2'$ - $P_3'$ - $P_4'$  (figure 1.7A). Pour mieux visualiser la spécificité des protéases, Schechter et Berger (1967) ont proposé une nomenclature (figure 1.7B). Selon cette nomenclature, le lien peptidique hydrolysé se situe entre les résidus  $P_1$  et  $P_1'$  sur la protéine, alors que les sites d'interaction sur l'enzyme sont représentés par  $S_1$  et  $S_1'$

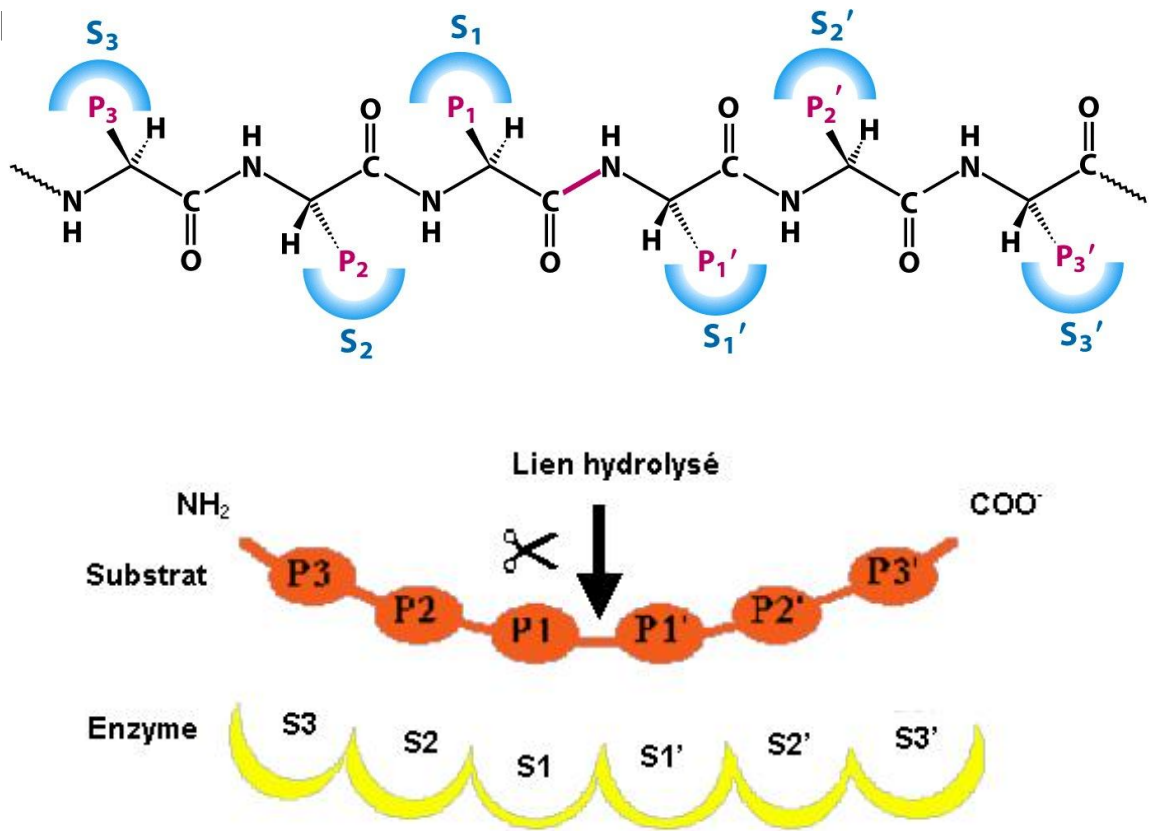


Figure 1.7 : Nomenclature de Schechter et Berger (1967) de la spécificité de coupure suite à l'interaction du complexe protéase-substrat. Le lien peptidique hydrolysé est en position  $P_1$ - $P_1'$  et les sites d'interactions sur l'enzyme sont identifiés par  $S_1$  et  $S_1'$ .

### 1.2.2. Peptidases à cystéine ou à thiol

Les peptidases, où le nucléophile est un groupement sulfhydryle d'un résidu de cystéine, sont connues comme peptidases à cystéine. Le mécanisme catalytique est similaire à celui des peptidases à sérine dans la mesure où un nucléophile et un donneur de protons (base) sont nécessaires. Le donneur de proton, chez toutes les peptidases à cystéine, est un résidu d'histidine (comme

pour la majorité des peptidases à sérine). Bien qu'il existe l'évidence, chez certaines familles, de la nécessité d'un troisième résidu pour orienter l'anneau imidazole de l'His (rôle similaire à celui de l'Asp102 observé chez quelques peptidases à sérine) ; la plupart des peptidases à cystéine n'ont besoin que d'une diade catalytique. Le mécanisme catalytique se déroule donc à travers la formation d'un intermédiaire covalent où sont impliqués les deux résidus de Cys25 et d'His159 selon la numérotation de la papaïne [49] qui jouent le même rôle que la Ser195 et l'His57 chez la chymotrypsine. Le nucléophile est un ion thiolate qui est stabilisé par la formation d'une paire d'ions avec le groupement imidazole de l'His159 voisin.

Généralement, les peptidases à thiol sont inhibées par le pCMB, l'iodoacétamide et la N-éthylmaléimide (NEM), leur pH optimum se situant au voisinage de la neutralité. Cependant, un petit nombre d'entre elles, telles que les protéases lysosomales, présentent un maximum de fonctionnement aux pH acides[3]. On rencontre les protéases à cystéine chez les micro-organismes ex : Prot 1 de *Botrytis cinerea*[50], les plantes et les animaux. Elles semblaient être composées d'au moins 4 super-familles [37]. La plus étudiée des protéinases à cystéine est la papaïne (EC 3.4.22.2), présente dans le latex de la plante subtropicale « *Carica papaya* » [51;52;53] et qui appartient à la superfamille à qui elle a donné son nom.

Comme pour les peptidases à sérine, les connaissances se sont accélérées durant ces dernières années. En se basant sur le nouveau système de classification, les peptidases à cystéine se divisent en 51 familles et 8 clans :. En plus de ces 8 clans, il existe un clan supplémentaire CX où sont regroupées 4 de ces familles qui n'ont pas encore pu être attribuées à un clan particulier (tableau 1.2).

La papaïne (figure1.8) fait partie de la famille C1 et du clan CA. Les structures cristallographiques de la papaïne et de plusieurs peptidases de la famille C1 ont été déterminées et les résidus catalytiques ont été identifiés. Il s'agit de la cystéine 158, l'histidine 292 et l'asparagine 308 [54].

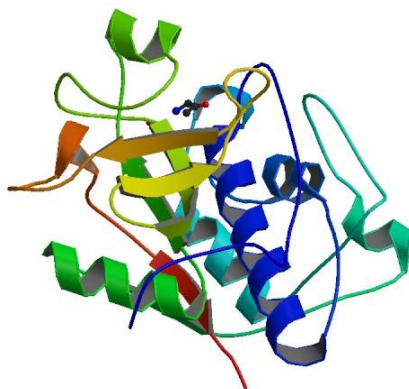


Figure 1.8 : Structure en ruban de la papaïne code-pdb : 1hkp [54].

Tableau 1.2 : Clans et familles des peptidases à cystéine. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS [33].

<u>Clans</u>	<u>Familles</u>	<u>Exemples de peptidases</u>
<b>CA</b>	C1	papaïne ( <i>Carica papaya</i> )
	C2	m-calpaïne ( <i>Homo sapiens</i> )
	C6	protéinase de potyvirus « helper component » (potato virus Y)
	C7	protéinase « chestnut blight fungus virus p29 » ( <i>Cryphonectria hypovirus</i> )
	C8	hypovirus)
	C9	protéinase « chestnut blight fungus virus p48 » ( <i>Cryphonectria hypovirus</i> )
	C10	hypovirus)
	C12	protéinase sindbis virus-type nsP2 (Sindbis virus)
	C16	streptopaïne ( <i>Streptococcus pyogenes</i> )
	C19	ubiquitine C-terminal hydrolase UCH-L1 ( <i>Homo sapiens</i> )
	C21	endopeptidase 1 papaïne-like de coronavirus d'hépatite murine
	C23	murine
	C27	protéase 14 ubiquitine-spécifique ( <i>Homo sapiens</i> )
	C28	endopeptidase de tymovirus
	C31	endopeptidase de carlavirus
	C32	endopeptidase de virus rubella
	C33	protéinase du virus de la maladie « foot and mouth »
	C34	protéinase à cystéine (« lactate-deshydrogenase-elevating virus »)
	C35	virus »)
	C36	protéinase à cystéine du virus équin (« equine arteritis virus »)
	C39	protéinase à cystéine du type arterivirus équin Nsp2
	C42	endopeptidase papaïne-like de closterovirus putative
	C47	endopeptidase papaïne-like de capillovirus putative
	C51	endopeptidase papaïne-like de furovirus (« beet necrotic yellow vein virus »)
	C54	yellow vein virus »)
	C58	peptidase « bacteriocin-processing » ( <i>Pediococcus acidilactici</i> )
	endopeptidase papaïne-like (beet yellows virus)	

		staphopaïne ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) endopeptidase D-alanyl-glycyl ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) peptidase Aut2 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) peptidase YopT ( <i>Yersinia pestis</i> )
<b>CD</b>	C11 C13 C14 C25 C50	clostripaïne ( <i>Clostridium histolyticum</i> ) legumaïne ( <i>Canavalia ensiformis</i> ) caspase-1 ( <i>Rattus norvegicus</i> ) gingipaïne R ( <i>Porphyromonas gingivalis</i> ) séparase ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
<b>CE</b>	C5 C48 C55 C57	adénaïne (adénovirus type 2 humain) endopeptidase Ulp1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) protéase YopJ ( <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ) peptidase « vaccinia virus 17 processing » ( <i>Vaccinia virus</i> )
<b>CF</b>	C15	peptidase I pyroglutamyl ( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> )
<b>CH</b>	C46	protéine « hedgehog » ( <i>Drosophila melanogaster</i> )
<b>CX</b>	C40 C41 C53 C60	dipeptidyl-peptidase VI ( <i>Bacillus sphaericus</i> ) protéinase à cystéine (virus de l'hépatite E) endopeptidase de pestivirus Npro sortase A ( <i>Staphylococcus aureus</i> )
<b>PA(C)</b>	C3 C4 C24 C30 C37 C38	picornaïne 3C de poliovirus-type (poliovirus type 1 humain) endopeptidase « nuclear-inclusion-a » (potyvirus plum pox) endopeptidase du virus 3C de la maladie hémorragique du lapin protéase (virus de la gastroentérite transmissible porcine) peptidase « Southampton virus-type processing » peptidase « parsnip yellow fleck virus putative processing »
<b>PB(C)</b>	C44 C45	précurseur de l'amidotransférase glutamine phosphoribosylpyro -phosphate précurseur « acyl-coenzyme A : 6-aminopenicillanic acid acyl- transférase »
<b>PC(C)</b>	C26 C56	hydrolase gamma-glutamyl ( <i>Rattus norvegicus</i> ) endopeptidase Pfpl ( <i>Pyrococcus furiosus</i> )

### 1.2.3. Peptidases à acide aspartique

Ce sont des endopeptidases dont l'activité catalytique dépend d'un résidu d'aspartate ou de glutamate dans le site actif. Ce dernier est situé dans le motif Asp-Xaa-Gly, où Xaa peut être une sérine ou une thréonine. Comme nous l'avons déjà mentionné, 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. Les résidus, impliqués dans le mécanisme catalytique, sont des acides aminés qui agissent comme des ligands. Les peptidases à acide aspartique sont ainsi dénommées car des résidus d'acide aspartique sont les ligands de la molécule

d'eau activée (figure 1.9). Le meilleur exemple est certainement la pepsine, enzyme responsable de la digestion des protéines alimentaires dans l'estomac des animaux supérieurs et qui est sans aucun doute la protéinase à acide aspartique la plus étudiée. Cette enzyme scinde préférentiellement les liaisons peptidiques incluant la fonction amine de la tyrosine ou de la phénylalanine. Chez la pepsine, les chaînes latérales de deux résidus d'acide aspartique maintiennent une molécule d'eau en place.

Cependant, il est possible que l'endopeptidase de nodavirus et celle de la scytalidopepsine B aient pour diade catalytique un acide aspartique et une asparagine. Chez l'endopeptidase de tetravirus, le résidu d'acide aspartique est remplacé par un résidu d'acide glutamique [34].

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 3,0 à 4,0), leurs MM varient de 30 à 45 kDa et elles sont inhibées par la pepstatine A [55];[56]. Si nous considérons à présent la nouvelle classification, les peptidases à acide aspartique sont divisées en 17 familles et en 5 clans : AA, AB, AC, AD et AF. En plus de ces 5 clans, il existe un clan supplémentaire AX, où sont regroupées 2 de ces familles qui n'ont pas encore pu être attribuées à un clan en particulier (tableau 1.3).

La chymosine (ayant une MM de 30,7 kDa), enzyme synthétisée sous forme d'un zymogène (36,2 kDa), au niveau des caillottes de veaux, possède un pH optimum de 4,8 [57]. C'est la protéase à acide aspartique type de la famille A1 (famille de la pepsine) et du clan AA. Une autre protéinase très étudiée est la rénine «pepsin-like», enzyme abondante dans l'estomac des nouveaux nés de la majorité des mammifères. Sa MM est de 31 kDa et est également activée soit par la pepsine soit par autoclivage et elle est très utilisée dans la production du lait caillé avec une saveur stable [13].

Tableau 1.3 : Clans et familles des peptidases à acide aspartique. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS [33].

<b><u>Clans</u></b>	<b><u>Familles</u></b>	<b><u>Exemples de peptidases</u></b>
<b>AA</b>	A1 A2 A3 A9 A11 A12 A16 A17 A18	pepsine A ( <i>Homo sapiens</i> ), chymosine ( <i>Bos taurus</i> ) HIV-1 rétropepsine endopeptidase de « cauliflower mosaic virus-type » spumapepsine (spumaretrovirus humain) transposon Copia ( <i>Drosophila melanogaster</i> ) endopeptidase de rétrotransposon bs1 ( <i>Zea mays</i> ) peptidase de rétrotransposon Tas ( <i>Ascaris lumbricoides</i> ) peptidase de rétrotransposon Pao ( <i>Bombyx mori</i> ) protéinase putative de rétrotransposon Skippy ( <i>Fusarium oxysporum</i> )
<b>AB</b>	A6 A21	endopeptidase de nodavirus (virus « flock house ») endopeptidase de tétravirus (omega virus <i>Nudaurelia capensis</i> )
<b>AC</b>	A8	signal peptidase II ( <i>Escherichia coli</i> )
<b>AD</b>	A22 A24	préséniline 1 ( <i>Homo sapiens</i> ) type IV prépiline peptidase type M1 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )
<b>AF</b>	A26	omptine ( <i>Escherichia coli</i> )
<b>AX</b>	A4 A5	aspergillopepsine II ( <i>Aspergillus niger</i> ) thermopsine ( <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> )

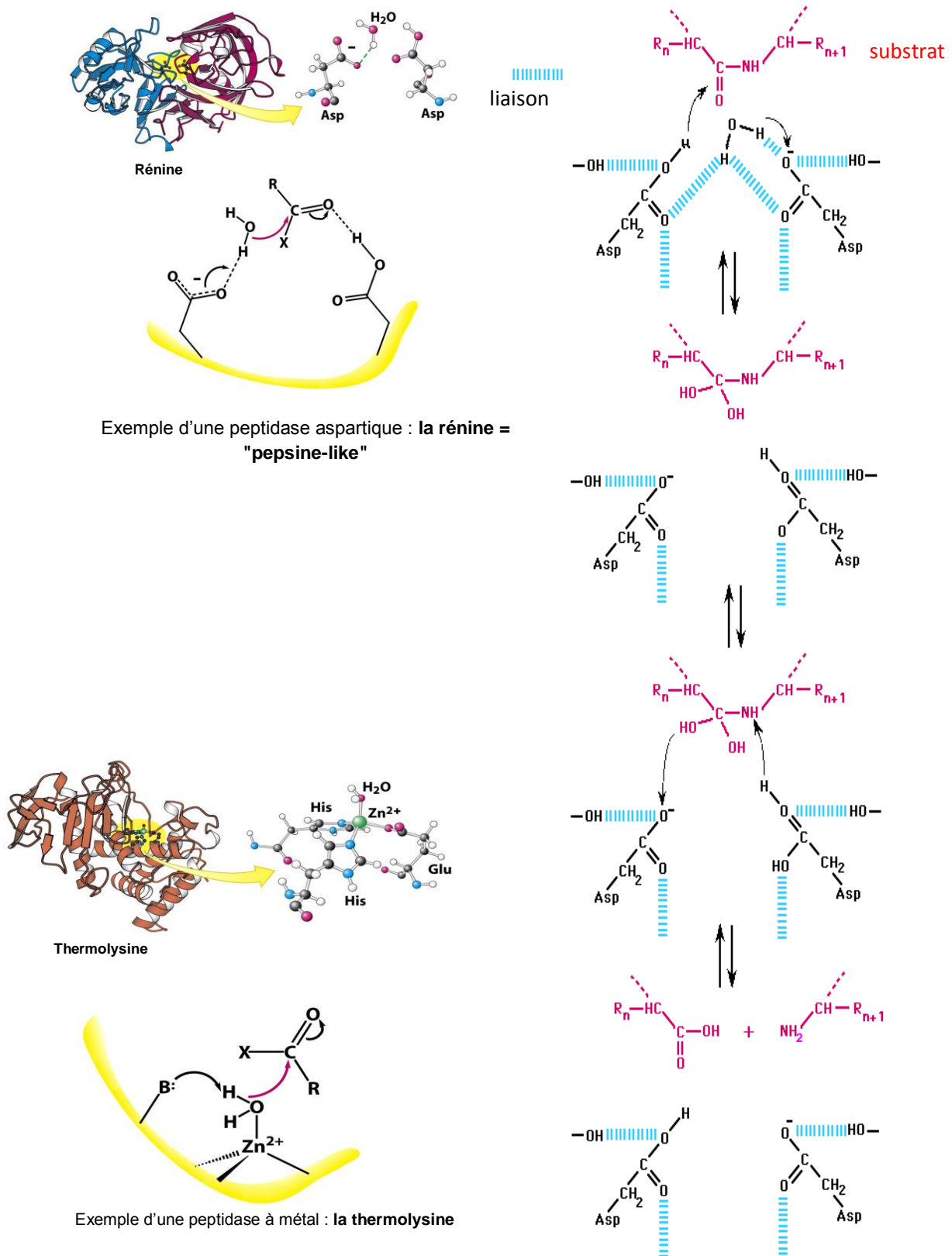


Figure 1.9 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des protéases à acide aspartique [47]. Le nucléophile qui attaque la liaison peptidique est une molécule d'eau. Les résidus d'acide aspartique agissent comme des ligands.



#### 1.2.4. Peptidases à métal

Les peptidases à métal 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 comme nous venons de le voir). 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. L'ion métallique se maintient en place à l'aide de ligands qui sont des acides aminés des chaînes latérales, normalement au nombre de trois[58;59].

Chez de nombreuses peptidases à métal, un unique ion zinc est nécessaire, mais chez certaines familles, il existe deux ions métalliques qui agissent de manière co-catalytique. Toutes les peptidases à métal, pour lesquelles le cobalt ou manganèse sont essentiels, ont besoin de deux ions métalliques. Ces enzymes sont inhibées par les agents chélateurs tels que l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) ou l'acide éthylène glycol-bis-( $\beta$ -aminoethyl éther)-N,N-tétra-acétique (EGTA). 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 [58;59;56].

Les ligands des ions métalliques connus chez les peptidases à métal sont les résidus histidine, acide glutamique, acide aspartique ou lysine. En plus des ligands de l'ion métallique, au moins un résidu supplémentaire est nécessaire pour le mécanisme catalytique. Il s'agit d'un acide glutamique pour la plupart des peptidases à métal, mais les résidus lysine et arginine sont également impliqués dans l'activité de certaines enzymes [34].

Les protéases à métal (EC 3.4.24), sont largement distribuées chez les bactéries, les champignons et les organismes supérieurs. Elles sont divisées en 51 familles et en 13 clans . En plus de ces 13 clans, il existe un clan

supplémentaire MX, où sont regroupées 6 de ces familles qui n'ont pas encore pu être attribuées à un clan en particulier (tableau 1.4). Les peptidases des clans MA(E), MA(M), MC, MD and ME ont seulement un ion zinc catalytique. Par contre, les peptidases des clans MF, MG et MH ont deux ions métalliques qui agissent de manière co-catalytique. Il s'agit du zinc ou manganèse pour le clan MF et du cobalt ou manganèse pour le clan MG.

Tableau 1.4 : Clans et familles des peptidases à métal. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS [33].

<u>Clans</u>	<u>Familles</u>	<u>Exemples de peptidases</u>
<b>MA(E)</b>	M1	aminopeptidase ( <i>Homo sapiens</i> )
	M2	peptidase unité 2 angiotensine « converting enzyme » ( <i>Homo sapiens</i> )
	M3	oligopeptidase thimet ( <i>Rattus norvegicus</i> )
	M4	thermolysine ( <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> )
	M5	mycolysine ( <i>Streptomyces cacaoi</i> )
	M9	collagénase microbienne ( <i>Vibrio alginolyticus</i> )
	M13	néprilysine ( <i>Homo sapiens</i> )
	M26	endopeptidase à métal IgA1-spécifique ( <i>Streptococcus sanguis</i> )
	M27	
	M30	tentoxilysine ( <i>Clostridium tetani</i> )
	M32	hycolysine ( <i>Staphylococcus hyicus</i> )
	M34	carboxypeptidase Taq ( <i>Thermus aquaticus</i> )
	M36	facteur létal anthrax ( <i>Bacillus anthracis</i> )
	M41	fungalysine ( <i>Aspergillus fumigatus</i> )
	M47	endopeptidase FtsH ( <i>Escherichia coli</i> )
	M60	peptidase à métal PRSM1 putative ( <i>Homo sapiens</i> )
M61	enhancine (nucléopolyhédrovirus Lymantria dispar) glycyl aminopeptidase ( <i>Sphingomonas capsulata</i> )	
<b>MA(M)</b>	M6	inhibiteur immunitaire A ( <i>Bacillusthuringiensis</i> )
	M7	snopalysine ( <i>Streptomyces lividans</i> )
	M8	leishmanolysine ( <i>Leishmaniamajor</i> )
	M10	collagénase 1 ( <i>Homo sapiens</i> )
	M11	gamétolysine ( <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> )
	M12	astacine ( <i>Astacus astacus</i> )
	M35	deutérolysine ( <i>Aspergillus flavus</i> )
	M43	cytophagalysine ( <i>Cytophaga</i> sp.)
	M46	pappalysine-1 ( <i>Homo sapiens</i> )
	M57	prtB g.p. ( <i>Myxococcus xanthus</i> )
	M64	protéase IgA ( <i>Clostridium ramosum</i> )
<b>MC</b>	M14	carboxypeptidase A1 ( <i>Homo sapiens</i> )
<b>MD</b>	M15	carboxypeptidase zinc D-Ala-D-Ala ( <i>Streptomyces albus</i> )

<b>ME</b>	M16 M44	pitrylsine ( <i>Escherichia coli</i> ) peptidase à métal du virus-type Vaccinia
<b>MF</b>	M17	endopeptidase Clp ( <i>Escherichia coli</i> )
<b>MG</b>	M24	méthionyl aminopeptidase type 1 ( <i>Escherichia coli</i> )
<b>MH</b>	M18 M20 M28 M42	aminopeptidase 1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) carboxypeptidase glutamate ( <i>Pseudomonas</i> sp.) peptidase mername-AA022 ( <i>Streptomycesgriseus</i> ) glutamyl aminopeptidase ( <i>Lactococcus lactis</i> )
<b>MJ</b>	M19 M38	dipeptidase de membrane ( <i>Homo sapiens</i> ) beta-aspartyl dipeptidase ( <i>Escherichia coli</i> )
<b>MK</b>	M22	endopeptidase O-sialoglycoprotéine ( <i>Pasteurella haemolytica</i> )
<b>ML</b>	M52 M63	endopeptidase HybD ( <i>Escherichia coli</i> ) protéase gbr ( <i>Bacillus megaterium</i> )
<b>MM</b>	M50	protéase S2P ( <i>Homo sapiens</i> )
<b>MN</b>	M55	D-aminopeptidase DppA ( <i>Bacillus subtilis</i> )
<b>MX</b>	M23 M29 M48 M49 M56 M67	beta-lytic endopeptidase à métal ( <i>Achromobacter lyticus</i> ) aminopeptidase T ( <i>Thermus aquaticus</i> ) endopeptidase Ste24 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) dipeptidyl-peptidase III ( <i>Rattus norvegicus</i> ) peptidase BlaR1 ( <i>Bacillus licheniformis</i> ) peptidase Poh1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )

#### 1.2.5. Peptidases à thréonine

Ce nouveau type catalytique n'a été découvert que très récemment grâce aux recherches effectuées sur les protéasomes. Un protéasome est, en effet, un complexe de protéases impliquées dans la dégradation protéique. 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. Ces protéasomes ont été décrits au départ uniquement chez les eucaryotes. Par la suite, la recherche chez les procaryotes de particules ressemblant à ces protéasomes [60;61] a conduit à la découverte d'un complexe protéolytique chez *Thermoplasma acidophilum* [63]. Dans un premier moment, la particule était dénommée protéinase multicatalytique (prosome) puis, le nom protéasome, a été adopté. Ce nom a été choisi pour décrire son activité protéolytique « protéa- » mais aussi sa taille et sa complexité « -some ». [63]. Cela semblait indiquer que le protéasome n'appartenait pas aux groupes de peptidases "classiques" et qu'elle fait partie d'une nouvelle classe de peptidases où le résidu de la thréonine N-terminal fonctionne comme un nucléophile. Les peptidases à thréonine sont regroupées en 3 familles et un clan (tableau 1. 5) constitué d'un nombre relativement restreint comparé aux autres peptidases.

Tableau 1.5 : Clan et familles des peptidases à thréonine. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS [33].

<u>Clan</u>	<u>Familles</u>	<u>Exemples de peptidases</u>
<b>PB(T)</b>	T1 T2 T3	protéasome archaean, beta component ( <i>Thermoplasma acidophilum</i> ) précurseur glycosylasparaginase ( <i>Homo sapiens</i> ) gamma-glutamyltransferase 1 ( <i>Escherichia coli</i> )

### 1.2.6 Peptidases non classées

La section 3.4.99 de la liste EC est réservée aux protéinases dont le mécanisme catalytique n'a pas encore été identifié. Elle peut être considérée comme une liste d'attente pour les enzymes qui, une fois purifiées et caractérisées, vont émerger comme membres d'un des autres groupes et/ou constituera un nouveau groupe.

La consultation du site du Comité de Nomenclature de l'IUBMB, montre que la moitié (27) des peptidases regroupées dans cette section 3.4.99 (46 membres) ont été soit « éliminées », soit attribuées à un des types catalytiques. Chacune de ces enzymes devaient en effet, avoir déjà été « découverte » et comme nous l'avions déjà mentionné, une même enzyme peut se retrouver avec plusieurs dénominations, entraînant alors une certaine confusion. Comme exemple d'enzyme reclassée, la peptidase 3.4.99.1, devenue 3.4.23.28., une endopeptidase à acide aspartique.

Actuellement, on observe aussi dans le site de MEROPS la présence de peptidases dont le mécanisme catalytique est inconnu (tableau 1.6). Elles sont regroupées en 13 familles. À l'exception d'U61 (EC 3.4.17.13), ces peptidases n'ont pas encore été incluses dans les recommandations de l'IUBMB.

Tableau 1.6 : Clan et familles des peptidases à type catalytique inconnu. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS [33].

<u>Clan</u>	<u>Familles</u>	<u>Exemples de peptidases</u>
<b>UX</b>	U4 U6 U9 U32 U34 U39 U40 U48 U49 U57 U61 U62 U64	facteur de sporulation SpoIIIGA ( <i>Bacillus subtilis</i> ) endopeptidase muréine ( <i>Escherichia coli</i> ) protéinase « prohead » (bactériophage T4) collagénase ( <i>Porphyromonas gingivalis</i> ) dipeptidase A ( <i>Lactobacillus helveticus</i> ) endopeptidase 2 du virus de l'hépatite C endopeptidase protéine P5 muréine (bactériophage phi-6) protéase 2 CAAX prényl ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) protéase Lit ( <i>Escherichia coli</i> ) protéine yabG ( <i>Bacillus subtilis</i> ) carboxypeptidase muramoyl-tetrapeptide ( <i>Escherichia coli</i> ) peptidase Mername-AA136 ( <i>Escherichia coli</i> ) endoisopeptidase Pei pseudomuréine (Methanobacterium phage psiM2)

### 1.3. Sources des protéases

Les protéases sont considérées comme des enzymes ubiquitaires puisqu'elles sont physiologiquement nécessaires à la vie cellulaire. Elles sont issues de diverses sources. Elles peuvent être d'origines végétale, animale ou microbienne.

#### 1.3.1. Les protéases d'origine végétale

Les protéases d'origine végétale les plus connues sont :

✓ La papaine : c'est la protéase végétale la plus utilisée [48]. Elle est extraite à partir du latex des fruits d'une plante équatoriale et tropicale (*Carica papaya*). C'est une protéase à cystéine, active dans une zone de pH comprise entre 5 et 9 et stable jusqu'à 90°C en présence de son substrat. La préparation enzymatique brute a une large spécificité due à la présence de plusieurs isoenzymes. La performance de l'enzyme dépend de la plante elle-même, des conditions climatiques de croissance et des méthodes employées pour son extraction et sa purification [64].

- ✓ La broméline : elle est extraite à partir de l'Ananas (*Ananas comosus merr*). La broméline est une protéase à cystéine active à des pH allant de 5 à 9. Elle s'inactive à partir de 70°C. La broméline est utilisée pour la préparation des hydrolysats de haute valeur nutritive, à partir de la viande, destinés à l'alimentation humaine [65].
- ✓ La ficine: elle est extraite du latex des fruits d'une plante tropicale (figuier). Elle appartient à la classe des protéases à cystéine (papaïne-like). La masse moléculaire de la ficine purifiée est d'environ 25 kDa [40].

### 1.3.2. Les protéases d'origine animale

Les protéases les plus connues de cette famille sont :

- ✓ La trypsine : sa masse moléculaire est de 23 kDa. Elle est d'origine pancréatique et responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires au niveau de l'intestin. Son pH optimum d'action se situe à 8. C'est une protéase à sérine la plus spécifique des protéases connues, qui coupe après la lysine ou l'arginine. La trypsine est utilisée pour la préparation des hydrolysats de caséine (Tryptone), utilisés dans les milieux bactériologiques, dans la culture cellulaire et dans des applications médicales spécialisées[73;74].
- ✓ La chymotrypsine : c'est une protéase à sérine de 24 kDa, extraite de pancréas d'animaux. Elle coupe après les acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine ou le tryptophane. La chymotrypsine est synthétisée au niveau du pancréas sous forme d'un précurseur inactif, le chymotrypsinogène qui est activé par la trypsine par hydrolyse de deux dipeptides (les acides aminés 14 et 15 et les acides aminés 147 et 148) donnant lieu à trois chaînes peptidiques A, B et C liées par deux ponts di-sulfures. Elle est utilisée dans les diagnostics et les applications analytiques [67;68;10].
- ✓ La chymosine : c'est une protéase aspartique extraite des caillettes de veaux et elle est utilisée dans la fabrication du fromage [66]. Elle a une action spécifique sur la caséine : elle hydrolyse la liaison 105-106 entre la phénylalanine et la

méthionine de la caséine k, provoquant la coagulation du lait [67;68;10].

✓ La pepsine : c'est une protéase acide de 35 kDa, qu'on trouve dans l'estomac de presque tous les vertébrés. L'optimum de son activité est situé entre pH 1 et 2 et elle est complètement inactivée à partir de pH 6. La pepsine hydrolyse les liaisons peptidiques qui se trouvent entre deux acides aminés hydrophobes. Elle est thermosensible en solution à des températures supérieures à 55°C, ce qui limite son utilisation en technologie. Elle peut être utilisée en brasserie, au cours de la stabilisation colloïdale et dans la préparation du fromage Cheddar [67;10].

✓ La rénine : elle est produite comme précurseur inactif (prorénine) dans l'estomac des nourrissons de mammifères. Elle devient active après l'action de la pepsine ou par autolyse. Sa masse moléculaire est de l'ordre de 37 kDa. Elle est largement utilisée en industrie laitière [67;10].

### 1.3.3. Les protéases d'origine microbienne

L'incapacité des organismes végétaux et animaux de répondre à la demande actuelle mondiale en protéases a porté un grand intérêt pour les protéases microbiennes. De plus, les micro-organismes représentent une excellente source d'enzymes variées, grâce à leur large diversité biochimique et leur susceptibilité aux manipulations génétiques. En effet, les protéases microbiennes représentent approximativement 40 % du marché mondial des enzymes [69]. Elles sont préférées aux enzymes d'origines animale et végétale puisqu'elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirables pour leurs applications biotechnologiques [69;4].

#### 1.3.3.1. Les protéases fongiques

Les champignons produisent un spectre plus large d'hydrolases que les bactéries. Par exemple, *Aspergillus oryzae* produit des protéases acides, neutres et alcalines. En fait, les protéases fongiques sont actives dans une large gamme de pH (entre 4 et 11) et montrent une large spécificité vis-à-vis des substrats.

Cependant, elles ont un rendement réactionnel et une thermotolérance plus faible que les protéases bactériennes [13].

Les protéases fongiques acides présentent un optimum d'activité compris entre 3 et 5 et sont stables à des pH allant de 2,5 à 6. Elles sont particulièrement utilisées dans l'industrie fromagère. Les protéases fongiques neutres sont des métalloprotéases actives à un pH voisin de 7 et sont inhibées par les agents chélatants comme l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA). Elles sont utilisées pour compléter l'action des protéases végétales, animales et bactériennes et pour réduire le goût amer des hydrolysats protéiques alimentaires.

Les protéases alcalines fongiques sont aussi utilisées dans la modification des protéines alimentaires[13]. Elles sont produites par certaines espèces telles que : *Trichoderma harzianum* [70], *Aspergillus fumigatus* [71] et *Aspergillus clavatus* [72].

#### 1.3.3.2. Les protéases bactériennes

La plupart des protéases commercialisées essentiellement les protéases alcalines et les protéases neutres sont produites par le genre *Bacillus*. Les protéases bactériennes neutres sont actives à des pH allant de 5 à 8, elles sont faiblement thermotolérantes et grâce à leur faible vitesse de réaction, ces protéases génèrent moins de produits amères lors de l'hydrolyse des protéines alimentaires, comparées à celles d'origine animale, d'où leur utilisation dans l'industrie alimentaire, la Neutrased, protéase neutre, utilisée en brasserie est insensible aux inhibiteurs naturels des protéases végétales [4;13].

D'autre part, les protéases alcalines bactériennes telles que les subtilisines, sont caractérisées par leur importante activité à des pH alcalins, dans une zone de pH de 8 à 12. Leur température optimale d'activité est autour de 60°C. Elles sont caractérisées par leur large spécificité vis-à-vis des substrats.



Les kératinases, enzymes capables de dégrader les liaisons peptidiques des protéines fibreuses (kératine, collagène, gélatine...), présentent aussi une classe d'enzymes très intéressante dans diverses applications. Elles sont produites par certaines espèces de bactéries et de champignons [69;4;13].

#### 1.3.3.3. Les bactéries protéolytiques

Les protéases peuvent être d'origine fongique (*A. niger*, *A. oryzae*,...) et bactérienne, provenant essentiellement du genre *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*,...), en plus .dans l'industrie agroalimentaire sont employées les enzymes protéolytiques produites par les genres *Brevibacterium*(*B.linens*),*Mycobacterium* .

#### 1.3.3.3.1. Les bactéries du genre *Bacillus*

##### 1.3.3.3.1.1. Caractères bactériologiques

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des bacillacées (*Bacillaceae*), l'ordre des bacillales (*Bacillales*), la classe des bacilles (*Bacilli*) et le phylum des firmicutes (*Firmicutes*). Ces bactéries sont généralement des bacilles mobiles à Gram positif, le plus souvent catalase et oxydase positive, sporulantes et aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs[73].

L'aspect des colonies obtenues sur milieu gélosé est extrêmement variable[73] :

- Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus weihenstephanensis* donnent des colonies de grande taille (2 à 7 mm de diamètre), mates ou granuleuses et dont la forme est variable (circulaires ou non, à bords réguliers ou crénelés ou filamenteux).
- Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides* donnent des colonies rhizoïdes et adhérentes qui s'étalent sur l'ensemble de la gélose et recouvrent toute la surface du milieu en 48 heures.
- Les colonies de *Bacillus licheniformis* ont un aspect de lichen, elles sont sèches et adhérentes à la gélose.

-*Bacillus subtilis* produit des colonies de formes irrégulières (contours ondulés ou pouvant présenter des filaments), de consistance crémeuse et dont le diamètre est compris entre 2 et 4 mm. Dans les vieilles cultures, les colonies prennent un aspect sec, rugueux et elles s'incrudent dans la gélose.

-*Bacillus circulans* donne des colonies qui envahissent les milieux gélosés (essaimage).

-Les colonies des autres espèces isolées en bactériologie médicale (*Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*) ne présentent pas de caractéristiques particulières.

-Certaines espèces ou certaines souches produisent des pigments lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux particuliers (pigment rouge pour *Bacillus cereus*, pigment jaune pour *Bacillus fastidiosus*, rose pour *Bacillus sphaericus*, jaune, orange, brun ou rose pour *Bacillus subtilis*...).

Le genre *Bacillus* apparaît extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique [le GC% des diverses espèces varie de 34 à 53[74;75] que phénotypique (type respiratoire, métabolisme des sucres, composition de la paroi, etc). L'analyse des ARNr 16S confirme cette hétérogénéité et montre que le genre *Bacillus* doit être scindé en plusieurs genres. Ainsi, cinq groupes phylogénétiques ont été caractérisés [76].

#### 1.3.3.3.1.2. Classification et caractérisations morphologiques et microscopiques

La réorganisation de ce genre a été initiée en 1992 par la création du genre *Alicyclobacillus* rassemblant trois espèces acidophiles et thermophiles. Ultérieurement ont été proposés et validés les genres *Paenibacillus* (1994), *Amphibacillus* (1995), *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Halobacillus* (1996), *Virgibacillus* (1998), *Gracilibacillus*, *Salibacillus* (1999), *Geobacillus*, *Marinibacillus*, *Ureibacillus*, *Filobacillus*, *Jeotgalibacillus* (2001) et *Lysinibacillus* (2007) qui tous rassemblent au moins une espèce ancestrale initialement incluse dans le genre *Bacillus*.

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

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

- **Le sous-groupe IA** constitué des bacilles d'un diamètre supérieur à 1  $\mu\text{m}$  et contenant des inclusions de poly- $\beta$ -hydroxy butyrate (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*).
- **Le sous-groupe IB** rassemblant des bacilles d'un diamètre inférieur à 1  $\mu\text{m}$  et dépourvus d'inclusions de poly- $\beta$ -hydroxy butyrate (***Bacillus pumilus***(figure1.), *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, etc.).

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

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

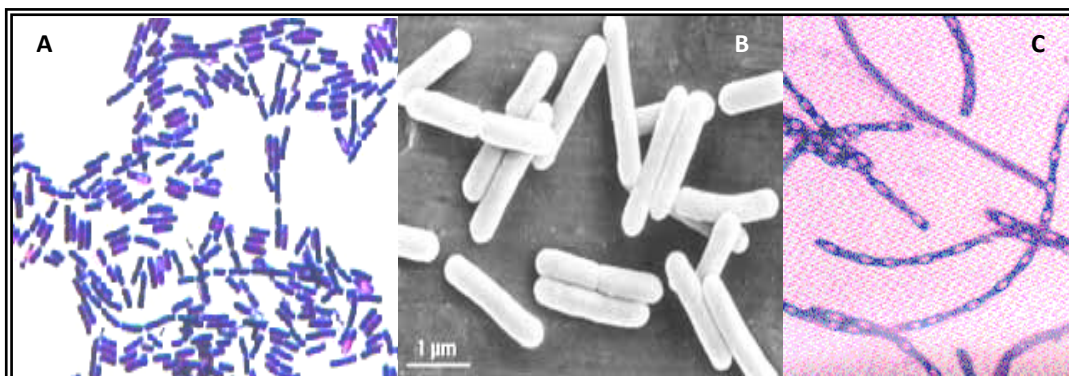


Figure 1.10 : Aspect morphologique de la souche *Bacillus pumilus*. (A), Coloration de Gram, (B), observation par microscopie électronique, (C), spores en forme elliptiques centrales.

#### 1.3.3.3.1.3. Métabolites produits

Les bactéries de ce genre sont capables de produire de nombreux bactériocines contre des bactéries à Gram positif notamment, la tetaine[77], la pumiline [78] et la pumilicine 4 [79] et à Gram négatif[80].

Les *Bacillus* présentent également un effet inhibiteur sur la croissance de nombreuses espèces fongiques : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*[81;82].

#### 1.3.3.3.1.4. Enzymes produites

Certaines souches de *Bacillus* sont capables de produire des protéases : la subtilisine[83 ;84;85] et la kératinase [86;87], une panoplie d'enzymes à savoir : la carbohydrase[88], la chitinase[89], esterase [90] et la lipase [91;92].

#### 1.3.3.3.2. Les bactéries coryneformes

Les germes de ce groupe intéressant l'industrie alimentaire appartiennent essentiellement aux genres *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Brevibacterium* et *Caseobacter*. Ce sont des bactéries gram positif, asporulés, immobiles, non capsulés, présentant de forme et coloration irrégulières. Ils sont généralement renflés en massue et leur arrangement est irrégulière., ils possèdent une catalase et ils sont oxydase négative et généralement aérobies facultatifs, ils jouent un rôle non négligeable dans l'industrie fromagère notamment ***Brevibacterium linens*** dont la protéolyse et la lipolyse dû à cette espèce sont à l'origine de nombreux arômes au cours de l'affinage [93;94].

Il est admis que *B. linens* participe activement à la protéolyse des fromages en libérant des acides aminés précurseurs de nombreux arômes [95]. La plus part des souches de cette espèce possèdent des décarboxylases capables de dégrader l'arginine, la lysine, les acides glutamique et aspartique [96].

Chez plusieurs souches de bactéries coryneformes prises chez les espèces *Brevibacterium linens* et *Arthrobacter luteus* une activité protéasique exocellulaire a pu être mise en évidence. Selon FUNATSU et coll.(1975) ; BOYAVAL et DESMAZEAUD(1983), Il s'agit en générale de plusieurs enzymes de nombres 3 a 6 qui sont des protéinases à serine. Leurs activités optimales sont obtenues à pH 7 ou nettement au dessus, il est de 11 dans le cas de la souche de *B linens* isolé par HAYASHI et al. (1990).Plusieurs publications démontrent l'activité protéolytique intense de *B linens* envers les caséines [4].

#### 1.3.3.3.3. Les Microcoques

Ce sont des coques appartenant à la famille des *Micrococcaceae* groupe II (groupe I:*Staphylococcus*), le genre *Micrococcus*.ils ont un rôle utile dans l'industrie notamment pour la maturation des fromages ou dans les produit salés ou en saumure.[95] Ce sont des bâtonnets, gram positif, immobiles, asporulés ,groupés généralement en amas irréguliers ,ils sont catalase positive , le type respiratoire étant aérobie ou aéro-anaérobie ;la fermentation des sucres donne de l'acide lactique mais la présence d'une chaine respiratoire ne les fait pas considérés comme bactéries lactiques ,ils sont alcool-acido résistants .Leurs colonies sont lisses et fréquemment pigmentées[93;94].La différenciation entre les espèces s'effectuait selon le schéma suivant (selon BAIRD PARKER )[94;95]:

1-Acetoïne +:*Staphylococcus .saprophyticus* sous-groupe 1 à 4

2- Acetoïne -:

2-1Fermentation de lactose +:*M.varians*

2.2 Fermentation de lactose -:pigement rose :*M.roseus* ;pas de pigment *M.luteus*

Actuellement cette classification a été remaniée les caractéristiques des espèces de *Micrococcus* sont représentées dans le tableau 1.7

Tableau 1.7: Caractéristiques des principales espèces de *Micrococcus* [94]

Groupe et genre Sous-groupe	Groupe II <i>Micrococcus</i>							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Pigment rose	-	-	-	-	-	-	-	+
Fermentation anaérobie du glucose	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation arabinose	-	-	-	+	+	v	-	-
Lactose	-	+	v	+	+	+	-	-
Maltose	V	+	+	+	+	+	-	-
Mannitol	-	-	+	+	+	+	-	-
Production d' Acétoïne	+	+	+	+	-	-	-	-
Coagulase	-	-	-	-	-	-	-	-
Phosphatase	-	-	-	-	-	+	-	-

1-4: *S.saprophyticus* ,5et 6: *M. varians* ,7: *M. luteus* 8: *M. roseus*.

Les *Micrococcus* produisent une endoprotéase exocellulaire. C'est une métallo-protéase. Ils possèdent en outre une exopeptidase intracellulaire plus active à pH neutre, cette activité est forte, ces bactéries ont aussi une activité de dégradation des acides amines [4].

## CHAPITRE 2

### LES PROTÉASES DANS L'INDUSTRIE FROMAGÈRE

#### 2.1. Applications biotechnologiques des protéases

Les protéases alcalines participent en grande partie dans le marché des enzymes [40;69]. En effet, les protéases alcalines surtout celles produites par le genre *Bacillus*, trouvent plusieurs applications dans de nombreux domaines et secteurs industriels, tels que : la détergence, l'industrie alimentaire, la synthèse de peptides, la tannerie, le traitement de la soie, l'industrie pharmaceutique et le traitement des rejets industriels et des ordures ménagères, ....

##### 2.1.1. L'industrie alimentaire

Les protéases microbiennes sont traditionnellement exploitées dans différents secteurs d'industrie alimentaire. En fait, la fonction principale des protéases est l'hydrolyse protéique qui a été exploitée pour la préparation des hydrolysats protéiques de haute valeur nutritionnelle. Ces hydrolysats protéiques peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la pression sanguine, ils sont introduits aussi dans la formulation des produits alimentaires pour nourrissons, dans des produits thérapeutiques spécifiques des régimes alimentaires et dans la fortification des jus de fruit et des boissons non alcoolisées [100;99].

Les protéases alcalines sont aussi utilisées dans la préparation d'hydrolysats protéiques naturels variés dont l'une des applications les plus intéressantes est le renforcement des arômes. En effet, plus l'hydrolyse produit des acides aminés libres et des peptides de petites tailles, plus l'arôme est intense. Ainsi, le complexe d'endopeptidases et d'exopeptidases de la préparation Flavourzyme de Novo Nordisk permet d'atteindre un degré d'hydrolyse supérieur à 50 % (plus de la moitié des liaisons peptidiques d'une molécule protéique est hydrolysée). Les fabricants d'exhausteurs d'arômes, d'hydrolysats de levures, de protéines végétales hydrolysées (PVH) et de protéines animales hydrolysées (PAH) font appel à ce nouveau traitement enzymatique pour relever les arômes.

Ces produits aromatiques sont très utilisés dans les soupes, les sauces, les bouillons cubes, les assaisonnements et les plats cuisinés[10;4].

REBECA et *al.* [101] ont rapporté la production d'hydrolysats de poisson de haute valeur nutritionnelle en utilisant les protéases de *B. subtilis*.

L'alimentation animale est aussi l'une des applications des enzymes dans l'industrie alimentaire. En effet, les protéases sont utilisées dans la dégradation des polymères constitutifs de la matière végétale afin d'améliorer la digestibilité et la qualité nutritive de certaines substances alimentaires[6;4].

Des essais effectués au Japon ont montré que les combinaisons d'enzymes produites par Novo Nordisk et conçues pour dégrader les protéines et les fibres (Biofeed pro et Biofeed plus) améliorent de façon significative la digestibilité chez les porcelets, ce qui accroît nettement la production de la viande [102].

Certaines protéases alcalines, douées d'activité kératinase, sont utilisées pour hydrolyser la kératine de plumes de volailles afin de produire un concentré protéique pour l'alimentation animale [103].

Les protéases sont utilisées aussi en :

- \* Panification : Amélioration de l'élasticité de la pâte (les protéases fongiques) ;
- \* Biscuiterie : Amélioration des qualités organoleptiques ;
- \* Charcuterie : Amélioration de la qualité de la viande ;
- \* Brasserie : Prévention du trouble au froid de la bière par action de la papaïne ;
- \* Préparation des hydrolysats de protéines à usage microbiologique telles que peptone, tryptone....



- \* Industries laitière et fromagerie : Coagulation des protéines du lait et son arômatization par action de la présure puis de la Neutrase [4;10;6].

### 2.1.2. La détergence

De nos jours, l'utilisation des enzymes dans la formulation des détergents est devenue très courante surtout dans les pays développés. En effet, en 1994 le marché total des enzymes industrielles était au alentours de 1,3 milliard de dollar. En valeur marchande, le secteur de la détergence est celui qui consomme le plus d'enzymes avec environ 40 % du total des ventes mondiales [104]. Les premières enzymes fournies à cette industrie étaient les protéases, qui occupent aujourd'hui encore une position dominante. Les protéases représentent environ 60 % des ventes mondiales d'enzymes pour les détergents ménagers et environ 50 % des enzymes pour les détergents pour lave vaisselle automatique. Elles facilitent l'élimination des taches comme l'herbe, le sang, l'œuf et la sueur. Dans les détergents pour les vaisselles, elles aident à supprimer les films d'aliments protéiques comme l'œuf et le jus de viande [105]. Les détergents à base d'enzyme sont caractérisés par :

- une meilleure performance de lavage ;
- une minimisation du temps de lavage par une dégradation rapide des salissures ;
- une réduction de la consommation d'énergie par utilisation des basses températures ;
- une réduction de la consommation de l'eau grâce à la haute efficacité de nettoyage ;
- une minimisation de l'impact environnemental, grâce à la biodégradabilité des enzymes (par réduction du contenu en phosphates) ;
- une garantie de la blancheur du linge, préservation de l'éclat des couleurs et lutte contre la redéposition de la saleté [106].

### 2.1.3. Synthèse de peptides

Les protéases sont fréquemment utilisées pour la synthèse de peptides qui consiste en une réaction inverse de l'hydrolyse catalysée par les enzymes hydrolytiques dans les milieux non conventionnels [107;108;109;110].

Comparée aux méthodes chimiques, la synthèse enzymatique de peptides offre plusieurs avantages. La réaction peut être stéréospécifique et les réactants n'exigent pas de groupements protecteurs. En plus il y a une augmentation de la solubilité des substrats non polaires ou un changement de l'équilibre thermodynamique en faveur de la synthèse par rapport à l'hydrolyse. De même, cette réaction enzymatique nécessite moins de groupes de protection, de solvants organiques ou de produits chimiques nocifs, ce qui amène à un coût de production compétitif avec ceux des méthodes chimiques [110]. Cependant, la limitation majeure dans l'utilisation des protéases pour la synthèse peptidique est la réduction importante de l'activité de l'enzyme dans les conditions anhydres. En effet, les protéases sont utilisées avec succès pour la synthèse de dipeptides [111] et tripeptides et l'hydrolyse stéréosélective de peptide-ester [112].

Toutefois, la nature et le type du solvant organique utilisé ont un grand effet sur l'activité de la protéase [113]. Castro [114] a étudié l'effet de 14 solvants organiques sur l'activité enzymatique de la subtilisine et il a montré que la subtilisine présente une activité, dans le glycérol, 500 fois plus grande que celle obtenue dans l'éthylène glycol, le N-méthylformamide ou dans le 1-2 ou le 1-3-propanediol.

NAGASHIMA et *al.* [115] ont étudié également l'effet de la nature de l'enzyme, du solvant, du milieu et du substrat en utilisant l' $\alpha$ -chymotrypsine, la subtilisine BPN et la subtilisine Carlsberg de la souche *B. subtilis* 72, sur la synthèse des peptides dans les solvants organiques.

#### 2.1.4. Synthèse chimique

Certaines protéases sont impliquées aussi dans la synthèse de divers produits chimiques. La protéase alcaline de *B. subtilis* a été récemment utilisée en synthèse chimique en milieu non conventionnel contenant la pyridine. En effet, elle

a permis de polymériser la cytarabine avec une sélectivité et un rendement important [71]. Ce polymère est un médicament anticancéreux.

WANG et *al.* (2005) ont utilisé la même enzyme, protéase alcaline de *B. subtilis*, dans des réactions de transestérification dans un solvant organique : le DMF, pendant trois jours, pour préparer trois autres comprimés anti-inflammatoires non stéroïdiennes :  $\beta$ -cyclodextrines de configurations différentes.

### 2.1.5. La tannerie

L'utilisation des enzymes en tannerie, comme alternative des produits chimiques, a été un succès dans l'amélioration de la qualité du cuir et dans la réduction de la pollution de l'environnement. Cette approche enzymatique est préférée car elle permet un contrôle facile et rapide du processus avec réduction des pertes [116]. Les protéases sont utilisées pour l'hydrolyse sélective des constituants non collagèneux de la peau et pour la transformation des protéines non fibrillaires comme l'albumine et la globuline. Elles sont utilisées dans les étapes de transformation successives suivantes [117] :

- Trempage : L'utilisation des protéases dans le cas des peaux séchées permet la dégradation des protéines inter-fibrillaires, ce qui facilite l'adsorption de l'eau et raccourcit l'opération de trempage. La société Novo Nordisk propose une protéase, Aquaderm, qui agit à des pH compris entre 8 et 9.
- Epilage ou pélanage : Les protéases permettent de réduire presque de moitié le temps de pélanage et d'entraîner des améliorations des propriétés physiques de la peau telle qu'une trame de fibres plus relâchée et une surface de fleur plus propre. L'enzyme proposée par Novo est appelée Nue ; elle agit à des pH compris entre 12 et 13.
- Confitage : Pour rendre le cuir plus souple, il est nécessaire de soumettre la matière première à un traitement protéolytique avant le tannage. La Pyrase, de Novo, est proposée pour assurer cette opération.

#### 2.1.6. Le traitement de la soie

Parmi les dernières exploitations de l'utilisation des protéases est le traitement de la soie, pour rendre la soie plus soyeuse. La soie est formée de fibres de fibroïne (substance protéique blanche, douce et brillante) et de fibres de séricine (substance protéique raide et terne) qu'il faut éliminer. Cette dernière qui représente 25 % de la soie brute a été conventionnellement éliminée par l'utilisation de l'amidon [118]. Ce processus étant généralement coûteux, pour cette raison une méthode alternative suggérant l'utilisation des préparations enzymatiques a été mise au point. Le traitement enzymatique de la soie s'opère en plaçant les fibres dans une solution contenant l'Alcalase de Novo à pH 8 et une température comprise entre 55 et 60°C [105].

#### 2.1.7. L'industrie pharmaceutique et usage médical

Les protéases sont aussi utilisées dans le développement de produits d'intérêt médical. KUDRYA et SIMONENKO [119] ont exploité l'activité élastase de *B. subtilis* 316 M pour la préparation d'élastotérase qui est appliquée pour le traitement des brûlures, des plaies, des furoncles etc. KIM et *al.* [120] ont rapporté l'utilisation de protéases alcalines de *Bacillus* sp CK, ayant une activité fibrinolytique dans le traitement de thromboses.

D'autre part, une large diversité de protéases est utilisée pour la production d'agents à usage thérapeutique tels que les peptides et les dipeptides comme l'aspartame qui est utilisé comme édulcorant non énergétique. L'administration orale de protéases : Luizym et Nortase d'*Aspergillus oryzae*, a été utilisée comme une aide digestive pour corriger certains syndrômes de déficience en enzymes lytiques. La protéase alcaline de *Conidiobolus coronatus* s'est révélée capable de remplacer la trypsine dans les cultures de cellules animales pour séparer les cellules en hydrolysant les protéines responsables de l'adhérence[13].

#### 2.1.8. Le traitement des rejets industriels et des ordures ménagères

Récemment, l'utilisation de protéases alcalines est introduite aussi dans le traitement des déchets de différentes industries alimentaires et des activités

ménagères. En effet, les protéases solubilisent les déchets protéiques et ainsi aident à baisser la demande biologique en oxygène.

DALEV [121] a rapporté l'utilisation d'une protéase de *B. subtilis* pour le traitement des déchets de volailles (plumes). JACOBSON et al. [122] ont décrit la composition d'un produit contenant des enzymes protéolytiques de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* et *Streptomyces* sp. avec un agent réducteur qui active la dégradation des cheveux et aide dans le nettoyage des conduites bouchées. Ce produit a été préparé et breveté par Genex.

#### 2.1.9. Traitement des films photographiques

Les films photographiques sont formés de polyester, comme matière de base, enveloppés par une couche de gélatine et une couche d'argent (1,5 à 2 % par unité de masse). La gélatine, protéine fibreuse formée par des fibrilles de collagène raccourcies par chauffage intense, n'est pas dégradée par la plus part des protéases. Cependant, cette activité a été détectée pour les protéases kératinolytiques. En effet, ces dernières jouent un rôle critique dans la récupération de l'argent qui recouvre les films photographiques [123 ; 124]

Conventionnellement, cet argent est récupéré par le traitement thermique des films, ce qui est à l'origine de la pollution et d'émanation indésirable. De plus, cette méthode ne permet malheureusement pas la récupération du polyester (matière de base du film). Néanmoins, le traitement protéolytique de la couche de gélatine permet l'extraction de l'argent délimité par cette couche de protéine et le recyclage du film de polyester. Plusieurs protéases ont été utilisées dans ce type d'application, telle que la protéase alcaline de *B. subtilis* qui permet la décomposition de la couche de gélatine et la récupération de l'argent à la suite d'une incubation à 50-60°C pendant 30 min [123].

D'autres souches du genre *Bacillus* produisant des protéases gélatinolytiques ont été isolées par d'autres chercheurs [124;125;126].

## 2.2. Les protéases dans l'industrie fromagère

Premier secteur industriel où l'homme a exploité la catalyse enzymatique, le domaine agroalimentaire offre de multiples et divers raisons d'utiliser les enzymes .Elles sont essentiellement utilisées, soit d'ordre technologique :accélération ou régulation de phénomènes enzymatiques, amélioration des qualités techno-fonctionnelles du produit fabriqué ....,soit d'ordre économique: amélioration des conditions de travail ,régularisation des prix sur le marché . Les protéases sont utilisées dans trois principaux domaines agroalimentaires : les produits de boulangerie, la production et la maturation des fromages et comme agents d'attendrissement des viandes [6 ; 4].

### 2.2.1. Le fromage

Les fromages sont des formes de conservation et de report ancestrales de la matière utile du lait (protéines, matière grasse ainsi qu'une partie du calcium et phosphore), dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans presque toutes les régions du globe [10].

La définition «fromage» est réservée au produit fermenté ou non ,affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitières (lait, lait partiellement ou totalement écrémé ,babeurre) utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la phase aqueuse ;la teneur minimale en matière sèche du produit ainsi défini doit être de 23g pour 100g de fromage (bien que pour des produits maigres de type pâte fraîche ,elle soit inférieure à 13% [127].

Le fromage peut être assimilé à une concentration des éléments majeurs du lait (protéines, matières grasses), réalisée par égouttage d'un coagulum obtenu par acidification et ou action d'une enzyme (le plus souvent la présure extraite de la caillette des jeunes bovins avant sevrage).la fabrication proprement dite comporte quatre phases ;standardisation du lait, coagulation, égouttage et affinage[10;68].

## 2.2.2. Caséines

### 2.2.2.1. Fractions caséiniques

Les caséines forment près de 80% des protéines du lait, et se regroupent sous une forme sphérique appelée micelle [4; 10;68].

La caséine entière est composée de quatre constituants majeurs les caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  et certains composés mineurs tels que la caséine gamma .

Toutes les caséines sont des phosphoprotéines de 150 à 200 acides aminés, possédant des groupements phosphates unis à la chaîne latérale de la sérine (groupe phosphoséryl) [10;68].

Les sites phosphoséryls ne se répartissent pas uniformément tout au long de l'enchaînement, mais sont groupés dans certaines régions qui, de ce fait, sont les moins hydrophobes et les plus chargées négativement. La présence de groupements phosphoséryls confère aux caséines une très grande affinité vis-à-vis du calcium et du magnésium .

Les groupements acides des résidus glutamyl, aspartyl et phosphoséryl plus nombreux que les fonctions  $-NH_2$  de la lysine et des autres acides aminés basiques, confèrent à la caséine entière un point isoélectrique de 4.65, une charge nette négative importante au pH du lait frais normal avec des propriétés acides [128].

### 2.2.2 .2. Micelle de caséine

La micelle de caséine est une particule de taille variant de 100 à 500 nm avec un diamètre moyen de 180 nm, elle est formée par l'association des caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  et de quelques fragments peptidiques les caséines  $\gamma$  (issus de la protéolyse de la caséine  $\beta$ ) et de composants salins dont le calcium et le phosphate. Son poids moléculaire moyen est de l'ordre de 108 Da et renferme entre 20 000 et 150 000 molécules de caséine [128; 68].

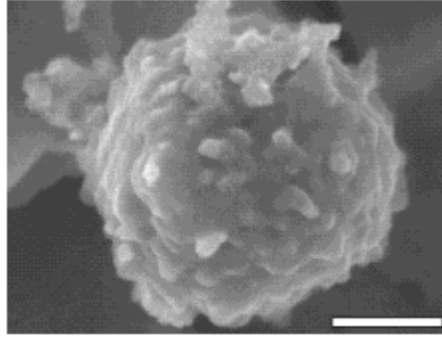


Figure 2.1 micrographe d'une micelle de caséine individuelle [129]

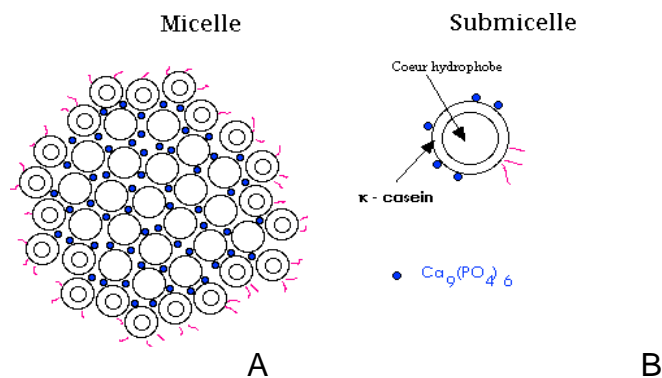


Figure 2.2 Micelles(A) et Submicelles (B) [67]

### 2.2.3. Enzymes coagulantes

La coagulation du lait par des enzymes protéolytiques est une des plus anciennes opérations de transformation alimentaire. Les agents coagulants sont des enzymes protéolytiques. Elles interviennent, en fabrication fromagère, pour faire coaguler le lait. Elles agissent ensuite au cours de l'affinage, en influençant la texture et l'aromatisation des fromages [6 ;68 ;127].

Traditionnellement, l'enzyme protéolytique utilisée est la présure extraite des caillettes de jeunes veaux non sevrés. L'utilisation de succédanés d'origine animale, végétale et microbienne s'est développée au cours des trente dernières années et cela pour des raisons économiques, religieuses ou culturelles [130].



### ❖ Les protéases d'origine animale

Les protéases gastriques des mammifères adultes sont désignées de pepsine A et pepsine C (gastriscine), alors que la chymosine est associée au développement néonatale du très jeune mammifère. Les protéases extraites du jus gastrique sont secrétées sous formes inactives (zymogène), et sont activés par les conditions acides du jus gastrique[4].

a. Les présures : Les présures sont des extraits qui proviennent de la caillette de jeunes bovidés nourris au lait et qui présentent un rapport: masse de chymosine active /masse de pepsine bovine active > 1,38.

La chymosine est une holoprotéine dont le poids moléculaire est voisin de 31400 Da. Elle hydrolyse la liaison phe105-met106 de la caséine  $\kappa$  et possède une activité protéolytique générale faible pendant l'affinage du fromage.

L'activité protéolytique de la chymosine est fortement influencée par les facteurs de milieu et principalement par le pH et la température. L'activité optimale de la présure se situe dans un intervalle de pH de 5 à 5.5 et à la température de 42°C.

b. les pepsines : La pepsine est extraite de l'estomac des mammifères adultes ou des proventricules de volailles. Elle hydrolyse la plupart des protéines naturelles telles que la caséine, la globuline, et certaines enzymes telles que la trypsine, la papaïne et les amylases. Elle attaque préférentiellement les peptides contenant de la L-Phénylalanine ou de la L-Tyrosine et plus généralement les acides aminés à noyau aromatique.

b.1 *La pepsine porcine*: L'extraction et l'utilisation de la pepsine porcine ont débuté durant la première guerre mondiale pour pallier une pénurie de la présure, mais n'a été réellement industrialisé qu'à partir des années 60. Elle est extraite de l'estomac de porcs sous forme inactive, puis activée par acidification à pH 2, son poids moléculaire est de 34500 Da [130].

L'emploi de la pepsine porcine présente pour la coagulation du lait des difficultés, à cause d'une activité protéolytique supérieure à celle de la présure, avec présence d'arrière goût et d'amertume pour certains fromages [131].

*b.2 La pepsine bovine* :C'est un des constituants mineurs normaux de la présure, (Alais, 1974 ; Fox,1982 ; cité par Ernstrom [130 ]). Elle est extraite des caillettes de bovidés adultes, et son poids moléculaire est de 33400 Da.

L'activité coagulante de la pepsine bovine n'est pas aussi dépendante du pH que celle de la pepsine porcine, et peut coaguler le lait à des pH supérieurs à 6.9, son activité protéolytique est proche de celle de la présure. Elle est utilisée en fromagerie en mélange 50:50 avec la présure , la pepsine bovine présent un rapport:masse de chymosine active/ masse de pepsine bovine active<0,154[4].

Deux mélanges de présure et de pepsine bovine sont autorises dans des rapports 2/2 ou 3/1 selon leur richesse en chymosine.

Par ailleurs, le gène de la chymosine A a été clone dans plusieurs micro-organismes afin de produire cette enzyme par fermentation [4].Parallèlement, des techniques de détection de cette nouvelle préparation ont été développées, basées soit sur l'immunologie par la méthode Elisa , soit sur l'électrofocalisation [132]. Dans de nombreux essais couvrant les différents types de fromages, cette chymosine a été comparée a la présure de veau. Les comparaisons ont porte sur la coagulation et le temps de raffermissement du coagulum, l'acidification et l'égouttage sous presse, l'évolution des fromages au cours de l'affinage, notamment la protéolyse. Dans tous les cas cette chymosine est apparue comme un excellent coagulant de remplacement, puisque son comportement et les résultats obtenu sont identiques à ceux observes avec la présure de veau. Un exemple d'utilisation en fabrication d'emmental [133].

b.3 *La Pepsine de poulet* : La pepsine du poulet est extraite du proventricule ou ventricule succenturié qui est un renflement fusiforme de 3 cm de long en moyenne, situé au dessus du gésier[134].

Le pepsinogène du poulet est composé de 387 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 43000 Da. La pepsine elle, est composée de 308 résidus d'acides aminés et un poids moléculaire de 35000 Da[134].

Le pH optimum de la pepsine du poulet est de 2.8. L'enzyme reste stable à pH 8, et devient inactive à pH 8,5. Cette stabilité est très liée à la température.

Plusieurs études ont été réalisées afin d'introduire la pepsine de poulet comme succédané de la présure. Des travaux de MICHAEL-ESKIN[135], ont conduit à la fabrication de fromage de type cheddar à l'aide de la pepsine du poulet, mais le produit obtenu était de qualité inférieure, il présentait un corps mou, peu d'arômes et un arrière goût assez prononcé due à une protéolyse excessive.

D'autres travaux de GREEN *et al* [134], ont montré que le cheddar préparé par un mélange de pepsine de poulet et de pepsine porcine était similaire à celui préparé par de la présure.

GORDIN et ROSENTHAL [136] ont utilisé la pepsine de poulet pour la fabrication de l'emmental et un autre fromage traditionnel de type Kashkaval, qui sont des fromages à pâte molle ; ils ont obtenu de meilleurs résultats et des fromages de qualité comparable à celles obtenues par la présure. Ils ont attribué cette différence aux conditions de production et spécialement à la température de 85°C nécessaire pour l'emmental contre 52°C. Lors de la cheddarisation ; ce qui implique une inactivation de la pepsine et par conséquent une diminution de la protéolyse.

### ❖ Les protéases d'origine microbienne

L'industrie de fermentation s'est intéressée à la production de protéases susceptibles de remplacer la présure, à partir de micro-organismes. Dans ce but, de multiples espèces de bactéries et de champignons inférieurs ont été étudiées afin de pallier la pénurie mondiale de présure.

a. *Origine bactérienne* : La recherche d'enzymes pour substituer la présure a conduit à de multiples travaux sur plusieurs bactéries: *Streptococcus liquifaciens*, *Micrococcus caseolyticus*, *Bacillus cereus*, et *Bacillus coagulans*. Les protéases extraites de ces bactéries ont plusieurs inconvénients, tels que la non spécificité de l'hydrolyse, la protéolyse excessive qui a pour conséquence un faible rendement fromager et une modification des caractéristiques organoleptiques des fromages (goût acide, amertume) [130].

Des travaux de génie génétique ont permis de préparer une présure formée de chymosine pure, par clonage de gène sur *Escherichia coli*, sur *Aspergillus ssp*, et sur *Bacillus subtilis*. Ce qui a donné naissance à la chymosine recombinante, qui est identique en masse molaire, séquence d'acides aminés, propriétés immunologiques et profil chromatographique à la chymosine naturelle [67;68]. De nombreuses études ont montré que la production fromagère, le rendement et la qualité du produit fini est le même quelle que soit la chymosine utilisée. La chymosine recombinante est pratiquement impossible à distinguer de la chymosine authentique [10].

b. *Origine fongique* : Les travaux réalisés sur différents types de levures et moisissures, ont permis de sélectionner trois types de moisissures dont les propriétés coagulantes et protéolytiques de leurs enzymes se rapprochent le plus de celles de la présure. Ces moisissures sont : *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* et *Mucor pusillus* [4].

❖ Préparations d'origine végétale:

Selon FERNANDEZ DEL POZO et *al* [137], des préparations d'origine végétale (extrait des fleurs de *Cynara cardunculus*) sont éventuellement utilisées pour certains fromages traditionnels. Les protéases d'origine végétale sont par ordre d'intérêt en technologie laitière la papaïne extraite d'une plante équatoriale et tropicale (*Carica papaya*), la broméline extraite de l'ananas (*Ananas comosus*), la ficine issue de la figue [62].

a. *La papaïne* : La papaïne extraite du latex de *Carioca papaya*, est caractérisée par une activité coagulante assez forte, mais également un fort pouvoir protéolytique.

b. *La ficine* : est une sulfhydryl enzyme, extraite du latex de *Ficus genus* ou *Ficus carica*. Comme la papaïne, elle a un pouvoir coagulant important mais son utilisation est limitée par son fort pouvoir protéolytique.

c. *La broméline* : est une enzyme extraite de l'ananas (*Ananas comosus*), elle a été considérée comme substituant possible de la chymosine. Des travaux de Murachi (1970) ; cité par Ernstrom [130], ont prouvé qu'elle a un pouvoir protéolytique défavorable au rendement et à la qualité organoleptique dans l'industrie fromagère.

#### 2.2.3.1. Comparaison entre l'action des différentes protéases

Les différentes protéases acides ont un poids moléculaire voisins, compris entre 30000 et 40000 Da. Leur pH optimum varie de 1.5 à 5. Dans le lait leur activité augmente avec la diminution du pH. L'activité coagulante diminue nettement quand le pH dépasse respectivement 6,8 – 6,6 et 5,5 pour la chymosine, la pepsine bovine et la pepsine porcine [131].

Ces enzymes sont irréversiblement dénaturées à des pH alcalins, uniquement la pepsine du poulet reste stable à pH 8 [131] alors que la chymosine est instable à pH 6.5 [138] et la pepsine porcine à pH 6 [139].

La pepsine de poulet diffère de la pepsine bovine et porcine par sa stabilité dans les solutions à pH neutre et modérément alcalin. La pepsine de poulet est stable aux pH de 8 à 8,5 alors que la plupart des autres pepsines sont inactives à pH 6,5 à 7 [131].

La chymosine attaque la liaison phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> de la  $\kappa$ -caséine, alors que l'hydrolyse de la  $\beta$ -caséine et la  $\alpha$ -caséine est très faible dans les conditions de la coagulation (pH, température et force ionique). La protéolyse générale est donc très réduite au cours de la coagulation, mais s'accroît lors de la maturation [10;67]. La pepsine porcine possède un pouvoir protéolytique plus prononcé [138], alors que la pepsine bovine semble avoir un pouvoir protéolytique assez proche de la chymosine [139]. Selon RICHARDSON [140] le taux de protéine totale du gel est stable entre 15 et 60 min pour la présure et la pepsine.

#### 2.2.4. Coagulation

La coagulation est une étape importante de la préparation du fromage. Elle provoque d'importantes modifications biochimiques et rhéologiques du lait qui affectent la structure des micelles de caséines [140]. En fromagerie, on distingue essentiellement deux types de coagulation entre lesquelles figure une coagulation mixte [67;10].

2.2.4.1. L'acidification lactique du lait ou l'addition d'acide à pH 4,65 précipite la caséine entière déminéralisée ; ce mode de coagulation, ou de floculation, est peu utilisé, il donne un caillé friable [141;10].

2.2.4.2. La coagulation par la présure, ou une autre protéase coagulante La coagulation du lait par des protéases acides se fait en deux étapes distinctes, l'une enzymatique et l'autre non enzymatique [141].

#### **Etape enzymatique (Hydrolyse de la $\kappa$ Caséine)**

La phase primaire de la coagulation est une étape enzymatique, durant laquelle la protéase attaque la liaison phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> de la  $\kappa$  caséine. Cette

coupure conduit à la destruction des propriétés stabilisantes de la  $\kappa$  caséine par la libération du glycomacropéptide [142]. La paracaséine  $\kappa$  reste accrocher à la micelle qui perdant son pôle hydrophile stabilisant, précipite [141; 10]. Cette étape est complètement indépendante des ions calciques [142].

La coagulation du lait par la présure se produit rapidement à pH 6.3-6.8 et dans des conditions où l'activité protéolytique est très basse [78;20]. La phase primaire de la coagulation dépend essentiellement du pH, de la température, de la force ionique, et des différents traitements subits par le lait [68].

### **Etape non enzymatique (phase d'agrégation)**

La phase secondaire est la phase de floculation, non enzymatique et dépend strictement de  $\text{Ca}^{2+}$  et du phosphate de calcium colloïdale. Durant la phase secondaire, les micelles de caséine se regroupent en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , cette agrégation se produit avant l'apparition visible de la floculation [141;143].

#### 2.2.5. Protéases de l'affinage

L'affinage est un processus complexe et lent. La composition et la structure du caillé, variables avec les types de fromages, la diversité extrême des agents de la maturation et leurs conditions d'interventions, la foule des produits formés sont autant de facteurs qui expliquent cette complexité. On peut dire que chaque type de fromage est caractérisé par son propre mécanisme d'affinage [68].

Toute fois trois grands phénomènes se retrouvent, à des degrés divers, dans tous les mécanismes: la fermentation du lactose ; l'hydrolyse de la matière grasse ; la dégradation des protéines [10; 68].

##### 2.2.5.1. Rôle des agents coagulant

Au cours de l'égouttage une partie de l'agent coagulant est retenu dans le

caillé, cette enzyme interviendra comme agent d'affinage, on considère que 40% de la présure est retenue dans le fromage de type camembert et environ 10% à 15% dans les fromages comme le Gouda, 22% dans le cas de Saint-Paulin [144].

Cette fraction de l'enzyme coagulante retenue dans le caillé représente souvent le premier agent protéolytique impliqué dans le mécanisme général de l'hydrolyse des caséines au cours de l'affinage. Cette protéolyse modifiera la texture du caillé et préparera l'action des enzymes microbiennes. Car les peptides libérés seront à leur tour hydrolysés en peptides plus courts et en acides aminés, par les peptidases microbiennes [145].

La présure commerciale, dans un caillé, libère essentiellement des peptides de haut poids moléculaire et n'intervient pratiquement pas dans la libération des très courts peptides et acides aminés libres [144]. Elle attaque très rapidement la caséine. L'attaque de la caséine  $\beta$  par la présure est beaucoup moins marquée [145]. La libération des peptides par la présure commerciale seule est suffisamment importante pour atteindre des valeurs d'azote soluble à pH 4,6 comparables à celles obtenues dans des fabrications classiques comme le saint-paulin, soit 18% de l'azote total du caillé [8].

Les enzymes coagulantes microbiennes se comportent de façon assez semblable à la présure de veau au cours de l'affinage des fromages. Ces enzymes coagulantes étant plus protéolytiques que la présure peuvent se comporter comme enzymes d'affinage [146].

#### 2.2.5.2. Protéases natives du lait

Le système protéasique endogène du lait a été abondamment étudié ces dernières années. On a pu ainsi montrer qu'il était constitué de plusieurs activités protéolytiques différentes [147]. Parmi celles-ci « la protéase alcaline du lait » ou plasmine exerce une activité prédominante. En plus de la plasmine, indiquant la présence d'une autre protéase alcaline qui serait analogue à la thrombine [7;148]. L'existence d'une protéase acide dans le lait, de type cathepsine D, a été mise en



évidence [148;149]. D'autres travaux font part de l'existence d'activités aminopeptidasiques. L'action de ces enzymes dans le lait est très mal connue, elle reste toutefois plus faible que celle de la plasmine [7;150].

La plasmine appartient au groupe des protéases à sérine, elle est en effet inactivée par les inhibiteurs spécifiques de ces enzymes tels que le D.F.P. (di-isopropyfluorophosphate). Elle coupe spécifiquement les liaisons peptidiques de type Lys-X. Certaines liaisons de type Arg-X sont également hydrolysées mais beaucoup plus lentement[149;150].

L'activité protéolytique de la plasmine s'exerce préférentiellement sur les caséines  $\beta$  et  $\alpha$ , qui sont hydrolysées sensiblement à la même vitesse[150]. La plupart des auteurs situent la température optimale pour l'activité de la plasmine à 37° C [149; 148 ; 151].

La plasmine possède un maximum d'activité à pH légèrement alcalin. De nombreux auteurs s'accordent pour situer le pH optimum aux environs de 8,0, la zone d'activité maximum se situe entre pH 6,5 et 9,0. A des pH inférieurs à 5,0 ou supérieurs à 9,0 la plasmine perd sa stabilité [150;151;148].

La perte d'activité de la plasmine purifiée commence à être notable à des températures supérieures à 50°C. Par chauffage à 80°C pendant 10 min la plasmine est totalement inactivée. La thermostabilité de l'enzyme serait dépendante du pH. A pH acide elle serait moins stable qu'à un pH voisin de la neutralité [152;149;150].

En fabrication fromagère, la protéolyse par la plasmine peut également avoir des incidences technologiques. On considère toutefois que son action au cours de l'affinage est relativement faible [152]. Des expériences effectuées sur des caillés expérimentaux de type gouda (pH 5,2) ne contenant ni présure ni micro-organismes, ont montré qu'après 6 mois d'affinage le taux de protéolyse représente 12% de la protéolyse totale des fromages témoins [153]. Cette protéolyse se traduit en particulier par l'hydrolyse de la caséine  $\beta$  et l'augmentation des teneurs en caséines gamma des caillés [154]. Son action dans

les fromages est fonction du pH de la pâte. par exemple, en fin d'affinage, elle s'intensifie dans la zone externe du camembert car le pH est alors plus élevé et proche de son optimum d'action [154]. Notons également les fromages à pâte cuite dans lesquels la totalité des protéases coagulantes est inactivée par le chauffage et où la plasmine résiduelle joue probablement un rôle plus important que dans les autres fromages [155].

### 2.2.5.3. Protéases des microorganismes d'affinage

Pendant l'affinage, les enzymes microbiennes vont jouer un rôle majeur. la dégradation des protéines va être conduite par toute une série de protéases et de peptidases, les acides aminés produits seront oxydés par désamination oxydative, dégradés par de simples décarboxylases ou par des lyases [10;68].

#### 2.2.5.3.1. Protéases des champignons

Au cours de l'affinage, les premiers microorganismes qui s'implantent à la surface des fromages sont, en générale, les levures. Peu d'espèces possèdent une activité endopeptidasique extracellulaire, c'est cependant le cas des *Yarrowia lipolytica*, trouve occasionnellement à la surface des fromages à croûte lavée, mais surtout de *Geotrichum candidum*. Trois protéases exocellulaires ont été identifiées chez cette espèce elles ont un pH optimal compris entre 5,5 et 6 et une température optimale de 55°C. [156].

Au contraire, de nombreuses espèces de levures possèdent une activité endoprotéasique intracellulaire, ainsi que une activité exopeptidasique importante. notamment les genres *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* et *Saccharomyces* présentant à la fois des activités exopeptidasiques et endopeptidasique. Chez *Geotrichum candidum*, deux activités aminopeptidasiques ont été mises en évidence, l'une intracellulaire et l'autre exocellulaire. Leur pH optimum est voisin de 8 et leurs températures optimales sont respectivement de 50°C. et 40°C. Elles sont, en plus, assez thermostables [156].

Les deux espèces de *Penicillium* (*P.camemberti* et *P roqueforti*) ont des activités proteasiques exocellulaires élevées . la protéolyse par ces moisissures est très efficace Puisque 35% de l'azote total est sous forme soluble dans un Camembert en fin d'affinage et 50% dans le cas de Roquefort . Pour *P.camemberti* cette activité globale est en général nettement supérieure à celle qui a pu être mesurée avec *Geotrichum candidum* en utilisant de l'azocaséine comme substrat [157]. Ces deux espèces de penicillium développent deux types d'endopeptidase : une aspartyl protéase et une métalloprotéase [157].

L'aspartyl protéase possède une activité élevée aux pH 3,5 et 5,5, ces optima dépendent entre autres facteurs du substrat à dégrader[158] . Leur température optimale est de 50°C. Les différences d'activité observées entre les deux espèces de *Penicillium* sont faibles. Les enzymes produites par ces deux espèces sont très proches. Plusieurs activités peptide hydrolases acides et intracellulaires ont été rapportées chez 5 souches de *Penicillium roqueforti*. La parenté avec l'aspartyl protéase extracellulaire est probable[156]. Ces enzymes diffèrent par leurs masses molaires qui s'étalent de 34 000 à 44 000, sans doute à cause de niveaux de glycosylation différents . Les variations d'activité de cette aspartyl protéase chez différentes souches sont corrélées positivement avec l'amertume de fromages fabriqués avec ces même souches ; sans doute par libération de peptides amers [4].

Une métalloprotéase est produite par *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* . Les propriétés des enzymes produites par ces deux espèces sont très proche : température optimale 50°C , pH optimal 5,5-6,0 . Le zinc est nécessaire à l'expression catalytique de ces protéines. Ces protéases sont peu spécifiques [156; 4].

#### 2.2.5.3.2. Protéases des bactéries

A la surface des fromages à pâte molle, les deux familles les plus importantes sont les micrococcacées et les bactéries coryneformes. Globalement ces deux groupes bactériens ont une activité protéolytique faible puisque LENOIR

[157] rapport que 80% des micrococccacées et 90% des bactéries coryneformes ne manifestent aucune action appréciable sur la caséine. Néanmoins des activités enzymatiques conduisent à la dégradation des fractions azotées des fromages été étudiées chez certaines espèces de ces deux groupes [95].

Les bactéries de la famille des micrococccacées et en particulier les genres ***Micrococcus*** et ***Staphylococcus*** produisent une endoprotéase exocellulaire. C'est une métallo-protéase, une enzyme de ce type isolée d'une souche de *S. hyicus* dénommée Ructaline entraîne une intensification de la protéolyse ayant un impact net sur le goût et la texture du fromage. Les micrococccacées possèdent en outre une exopeptidase intracellulaire plus active à pH neutre, cette activité est forte, ces bactéries ont aussi une activité de dégradation des acides aminés [4].

Une activité protéasique exocellulaire a été mise en évidence chez plusieurs souches de bactéries coryneformes (***Brevibacterium linens*** et ***Arthrobacter luteus***). Il s'agit des protéinases à serine. Leurs activités optimales sont obtenues à pH 7 ou nettement au dessus, il est de 11 dans le cas de la souche de *B linens* isolé par HAYASHI et *al.* [98]. Ces enzymes ont une activité optimale qui varie de 40 à 55 °C et reste relativement stable à 70 °C. Plusieurs publications démontrent l'activité protéolytique intense de *B linens* envers les caséines [4].

En outre, plusieurs souches de *B linens* possèdent une activité aminopeptidasique exocellulaire présentant une activité optimale à pH 9 et 40°C. Ces enzymes ont été utilisées conjointement à la Neutrase de ***Bacillus subtilis*** dans la fabrication de Cheddar. Ces aminopeptidases augmentent significativement l'intensité de la flaveur des fromages en comparaison avec ceux produits avec la Neutrase seule [98].

Cette espèce possède un ensemble de système enzymatique capable de dégrader les acides amines et permettant de produire des composés d'arôme ou des précurseurs directs de composés d'arômes. En particulier la plus part des souches de cette espèce possèdent des décarboxylases capables de dégrader l'arginine, la lysine, les acides glutamique et aspartique [96]. *B linens* possède

aussi des activités désaminantes qu'il s'agisse de désaminases ou de L-serine déshydratases[98; 96] . En fin on ne peut parler du métabolisme azoté de cette espèce sans parler de ses activités envers les acides amines soufres qui sont à l'origine de l'odeur typique des fromages à pâte molles croûte lavées.

Les bactéries lactiques sont caractérisées par la présence d'enzymes protéolytiques intracellulaires . ils ont été isolé chez ***Streptococcus lactis***, leur pH optimale d'activité se situe entre 6 et 6,5 , ce sont elles qui interviennent d'une manière prépondérante dans le fromage à pâte ferme[93;95 ;157]. En effet dans les dix premiers jours de la maturation le nombre de *Str. Lactis* passe de  $10^9$  à  $10^6$  par gramme ce qui constitue libération considérable des enzymes à travers les cellules autolysées [157].

Les Lactobacilles ont également une activité protéolytique intracellulaire mais certains d'entre eux, thermophiles, secrètent aussi des protéases extracellulaires. *Lactobacillus casei*, espèce mésophile, présente en grand nombre dans les pâtes cuites a une activité protéolytique intracellulaire optimale a pH 5,5-6 [93]. Les nombreuses amino-peptidases caractérisées chez les divers espèces de bactéries lactiques, ont un rôle essentiel, outre leur rôle nutritionnel pour les bactéries lactiques , ces activités vont permettre de limiter l'amertume des peptides libérés par les protéases ,que celles-ci viennent du lait , de la présure ou des microorganismes [157].

#### 2.2.6. L'affinage et problème d'amertume

Durant les processus de maturation des fromages, des modifications en majeure partie d'origine enzymatique affectent les protéines, la matière grasse, les sucres et transforment le caillé frais en un fromage affine, ayant ses caractéristiques organoleptiques propres [4]. La protéolyse a dans ce cas deux répercussions essentielles. D'une part, en attaquant le réseau protéique qui constitue de l'armature des fromages, elle en modifie la texture et d'autre part, elle participe a la formation de la flaveur en produisant des peptides ainsi que des acides amines libres dont certains sont des précurseurs de composés d'arômes. La methioninase bactérienne est employée pour la génération d'arômes dans le

fromage Cheddar. Elle transforme les acides amines contenant un atome de soufre en méthane-thiol, l'un des constituants typique de l'arôme Cheddar. Cependant, les protéases doivent être employées avec précaution car elles sont susceptibles d'engendrer des défauts d'arômes par relargage de résidus hydrophobes [6;10;4].

Du fait de leur activité protéolytique au cours de l'affinage des fromages, la présure de veau, comme les autres enzymes coagulantes, peut être à l'origine de peptides au goût amer. Ce qui aggrave le problème d'amertume des fromages. A fin de remédier à ce problème d'amertume plusieurs solutions ont été entreprises telle que l'encapsulation des protéases d'affinage dans des liposomes ; la maturation et le chauffage du lait à des températures élevées avant emprésurage ; la recherche de souches protéolytiques dites «non amères» [10;4].

## CHAPITRE 3

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

La présente étude a un double objectif : l'isolement, purification et criblage des souches bactériennes protéolytiques alcalines d'une part et la sélection et l'identification d'une souche performante qui fera l'objet d'une étude de potentialité d'application industrielle d'une autre part.

La réalisation de cette étude a fait appel à plusieurs organismes :

- Les différents laboratoires (contrôles et analyses microbiologique, physicochimique, biochimie, traitement des eaux et production des corps gras) de l'institut national spécialisé de la formation professionnel en Industrie agroalimentaire-Abou Baker Belkayed-de Blida;
- Les laboratoires de microbiologie et fermentation de l'unité BIOTIC SAIDAL d'El harrach
- Les différents laboratoires (stérilité, microbiologie, physicochimie et fermentation) du complexe ANTIBIOTICAL SAIDAL de Médéa.
- L'abattoir communal de la wilaya de Blida.
- Les laboratoires de microbiologie et physicochimie de la laiterie LBT-Blida.

#### 3.1. Matériel

##### 3.1.1. Matériel biologique

- Souche de *Streptomyces*

La souche de *Actinomycète* de référence *Streptomyces* sp. strain AB1 a été isolée à partir d'un échantillon du sol de la plaine de la Mitidja. Par ailleurs, elle a été identifiée par des études phénotypiques et la chimiotaxonomie par Badis et al. [158 ;159] L'identification complète de cette souche est poursuivie par la Galerie API CH 50 , Galerie API ZYM ainsi que par la technique de la biologie

moléculaire (la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal, ARNr 16S) [160] (voir appendice B). Cette souche a été retenue pour sa capacité à produire une protéinase alcaline prometteuse d'intérêt industriel, elle est donc utilisée en tant que souche de référence au cours de notre étude.

### 3.1.2. Le lait

Le lait utilisé dans la présente étude est reconstitué à partir d'une poudre de lait écrémé traité thermiquement à basse température reconnue de bonne qualité fromagère. Au cours de la préparation le lait est reconstitué en proportion et dans des diluants différents selon l'utilisation : milieu de culture (voir appendice C) et également utilisé comme substrat pour mesurer l'activité coagulante.

### 3.1.3. La présure

La présure employée est une présure bovine en poudre commerciale de force 1/100.000 (comporte 80% de chymosine et 20% de pepsine) fabriquée par le groupe français Texel Poulenc. La poudre de présure est conservée à 4 °C. À partir de cette poudre, nous avons préparé une solution mère par reconstitution de 1 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée.

### 3.1.4. Verrerie, matériel et équipements

- ❖ **Verrerie du laboratoire** (erlenmeyers, tubes à essai, bécher, pipettes Pasteur, seringues, entonnoir, jarres d'anaérobiose...etc) ;
- ❖ **Matériel** (Boîtes de pétri, bec Bunsen, anse de platine, portoir, agitateur, balance, dessiccateur....) ;
- ❖ **Équipements** (Réfrigérateur, bain Marie, étuves, autoclave, plaques d'agitations, Shaker hotte microbiologique, centrifugeuse, vortex spectrophotomètre UV-Visible, pH-mètre, microscope optique.....).



## 3.2. MÉTHODES

### 3.2.1. Isolement et criblage des souches bactériennes proteolytiques

#### 3.2.1.1. Milieux et conditions de culture

##### 3.2.1.1.1. Milieu solide pour la détection des activités protéolytiques (GNL: Gélose Nutritive au Lait)

Ce milieu est constitué de : 3g/l d'extrait de levure ; 5g/L de peptone ; 750 ml d'eau distillée et 15g/L d'agar. Avant la stérilisation à 120 °C pendant 20 min, le pH du milieu est ajusté à 7,4. Un volume de 250ml de lait écrémé (stérile) est ajouté aseptiquement au milieu après stérilisation et refroidissement jusqu'à 60 °C.

##### 3.2.1.1.2. Milieu LB (*Luria-Bertani*) pour la croissance des bactéries

Ce milieu est utilisé en préculture pour la croissance des souches : il est composé de : 10 g/L de peptone ; 5 g/L d'extrait de levure et 5 g/L de NaCl. Le pH du milieu est ajusté à 7 avant la stérilisation à 120 °C pendant 20 min.

##### 3.2.1.1.3. Milieu de production de protéases

Les protéases sont produites sur milieu liquide dont la composition est la suivante : 10 g/L Gélatine ; 5 g/L Extrait de levures ; 5 g/L CaCl<sub>2</sub> ; 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,4 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O ; 0,01 g/L MnSO<sub>4</sub> ; 0.01 g/L FeSO<sub>4</sub>.

Le pH est ajusté à 10 avec la soude (0,1 N) avant la stérilisation. La gélatine est stérilisée séparément et elle est rajoutée au milieu après refroidissement.

Ce même milieu a été amélioré pour la production des protéases en ajoutant 1 ml/L d'oligoéléments (40mg ZnCl<sub>2</sub> ; 200mg FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O ; 6.5mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ; 13.5mg MoNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O qui sont solubilisés dans l'eau qsp 100 ml) [161].

#### 3.2.1.1.4. Conditions de culture

En milieu solide, les souches bactériennes sont cultivées dans des boîtes de Pétri contenant un milieu gélose au lait. Les boîtes sont incubées par la suite à différentes températures à 30, 37, et 45 °C pendant 24, 48 et 72 heures.

En milieu liquide, les cellules sont cultivées en erlenmeyer contenant le milieu de culture. La mise en culture est toujours effectuée à partir d'une préculture repiquée par une colonie bactérienne, puis les cultures ont été incubées à 30, 37, et 45 °C et sous une agitation constante de 200 rpm.

#### 3.2.1.2. Isolement des souches bactériennes protéolytiques

Les souches bactériennes ont été isolées, à partir de plusieurs échantillons des rejets des abattoirs : eau usée et sol, par étalement sur une gélose GNL (milieu utilisé pour déceler les activités protéolytiques extracellulaires) et incubées en aérobie et en anaérobie à différentes températures (30, 37 et 45 °C) pendant 24, 48 et 72h. Ce test semi-qualitatif est visualisé par la diffusion des protéases secrétées dans la gélose environnante tout en hydrolysant les protéines du lait ce qui se traduit par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie. Le diamètre d'halo est proportionnel à la quantité d'enzymes libérée par la bactérie.

En milieu liquide, les souches ont été cultivées sur milieu optimisé [10 g gélatine ; 5 g extrait de levure ; 1 g  $K_2HPO_4$  ; 1 g  $KH_2PO_4$  ; 5 g  $CaCl_2$  et 0,1% (v/v) oligoéléments (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) dans un litre d'eau distillée et ajuster le pH à 10,0]. La mise en culture est effectuée à partir d'une préculture. La culture est incubée selon les conditions appropriées (température, durée, aéro/anaérobie et agitation) .

#### 3.2.1.3. Conservation des souches

Pour la conservation à longues périodes, les souches sont mises en culture dans un milieu liquide approprié. La suspension cellulaire est mélangée avec du glycérol stérile à une concentration finale de 20%. Elle est répartie dans des cryotubes puis conservée à -18 °C.

### 3.2.1.5. Cinétiques de croissance et production de protéases

Les précultures des isolats sont effectuées sur milieu LB dans un erlenmeyer de 250 ml avec un volume utile de 25 ml. L'incubation se fait pendant 18 h aux températures correspondantes et sous une agitation de 200 rpm.

Les cultures de ces isolats sont réalisées sur milieu précité, inoculés par 1 ml de la préculture à 3 unités  $DO_{600}$ . L'incubation se fait pendant 72 h à 30 °C ou à 37°C et sous agitation de 200 rpm. Des prélèvements réguliers de 2 ml ont été effectués. Les activités protéolytiques, la croissance bactérienne ( $DO_{600}$ ) et le pH final ont été évalués lorsque la culture atteint la production maximale de protéase.

### 3.2.1.6. Dosage de l'activité protéolytique

- Méthode de Kembhavi

L'activité protéolytique a été dosée dans le surnageant selon la méthode de Kembhavi [162], particulièrement l'activité caséinolytique, en déterminant la concentration des peptides solubles dans l'acide trichloro-acétique (TCA) à la concentration finale de 6,6%. L'activité protéolytique est estimée selon le protocole suivant :

- ✓ Mélanger 0,5 ml d'une solution de caséine (1% p/v) dans un tampon désiré en présence de 2 mM  $CaCl_2$  avec 0,5 ml de la solution enzymatique préalablement diluée.
- ✓ Incuber, la réaction enzymatique, à une température appropriée pendant 15 min.
- ✓ Arrêter la réaction par addition de 0,5 ml de TCA à 20% (p/v) (le TCA précipite la caséine non hydrolysée).
- ✓ Incuber à température ambiante pendant 15 min.
- ✓ Centrifuger (dans une centrifugeuse frigorifique à 4°C) le milieu réactionnel à 10000 x rpm pendant 15 min.
- ✓ Mesurer l'absorbance à 280 nm (correspond au maximum d'absorbance

des aas).

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 (appendice D), à partir de laquelle nous avons déduit que 1 µg/ml de tyrosine correspond à une  $DO_{280\text{ nm}}$  de 0,0055. L'activité protéasique (U/ml) est déduite à partir de l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité} = DO \times D \times d / t \times 0,0055$$

Avec D : dilution de l'enzyme dans le Volume final du milieu réactionnel

d : dilution de l'enzyme

t : temps en minutes

- Méthode de Lorwy-Folin

L'activité protéolytique est mesurée dans le surnageant, en déterminant la concentration des peptides solubles dans le TCA à la concentration finale de 6,6% [163]. L'activité protéolytique est estimée selon le protocole suivant :

- ✓ Mélanger 2,5 ml d'une solution de caséine (1% p/v) dans un tampon désiré en présence de 2 mM  $CaCl_2$  avec 0,5 ml de la solution enzymatique préalablement diluée.
- ✓ Incuber à une température appropriée pendant 20 min.
- ✓ Arrêter la réaction par addition de 2,5 ml de solution TCA (0,11 M TCA + 0,22 M acétate de sodium + 0,33 M acide acétique).
- ✓ Incuber à température ambiante pendant 30 min.
- ✓ Centrifuger le milieu réactionnel à 10000 rpm pendant 15 min.
- ✓ 0,5 ml d'une solution claire (après filtration du surnageant sur papier Whatman no. 3).
- ✓ Ajouter 2,5 ml d'une solution 0,5 M  $Na_2CO_3$ .
- ✓ Ajouter 0,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (50%).

- ✓ Incuber à température ambiante pendant 30 min.
- ✓ Mesurer l'absorbance à 660 nm (correspond au maximum d'absorbance du réactif de folin).

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. Nous avons déduit que 1 µg/ml de tyrosine correspond à une  $DO_{660\text{ nm}}$  de 0,0075. L'activité protéasique (U/ml) est déduite à partir de l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité (U)} = DO \times V_{ET} \times d / t \times V_E \times 0,0075$$

Avec  $V_{ET}$  : correspond au volume total de l'enzyme.  
 $d$  : dilution de l'enzyme dans le Volume final du milieu réactionnel.  
 $V_E$  : correspond au volume réactionnel de l'enzyme.

### 3.2.2. Caractérisation physicochimique des préparations enzymatiques des meilleures souches

En vue d'évaluer les niveaux de production de protéases par les souches retenues et de vérifier leur capacité d'hydrolyser les protéines en milieu liquide, nous avons réalisé des cultures sur milieu à base de gélatine (10 g/L) comme substrat carboné et d'extrait de levure (5 g/L) comme source azotée à pH initial de 10,0. Le choix d'un tel pH découle du fait qu'on vise la recherche des souches productrices des protéases alcalines pouvant être éventuellement utilisées en fromagerie notamment en étape d'affinage.

les cultures des différentes souches ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml avec un volume utile de 25 ml. Les dosages d'activité protéolytique sont effectués après 24, 48 et 72 h d'incubation aux températures appropriées et sous une agitation de 200 rpm. Nous avons également mesurer pour chaque souche, l'absorbance à 600 nm et le pH final lorsque la culture atteint la production maximale de protéase.

### 3.2.2.1.Détermination du pH optimum d'activité

L'activité protéolytique est mesurée à différents pH de 4 à 11 et à la température appropriée. Plusieurs tampons sont choisis : le tampon acétate (0.1M) pour les pH 4 et 5 ; le tampon phosphate (0.1M) pour le pH 6 ; le tampon Tris-HCl (0.1M), pour les pH 7 et 8 et le tampon glycine NaOH (0.1M) pour le pH allant de 9 à 11. Pour chaque test la caséine est solubilisée dans le tampon adéquat.

### 3.2.2.2.Détermination de la température optimale d'activité

L'influence de la température sur l'activité de l'enzyme a été étudiée. Des mesures d'activité protéolytique au pH optimum pour chaque souche et à différentes températures (40, 50, 60, et 70 °C.) ont été réalisées en utilisant la caséine comme substrat pour la réaction enzymatique.

### 3.2.2.3.Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique

L'activité protéolytique est mesurée aux conditions optimales pour chaque souche étudiée en présence de 2 mM d'ions métalliques : **CuSO<sub>4</sub>** ; **MgSO<sub>4</sub>** ; **CaCl<sub>2</sub>** ; **ZnSO<sub>4</sub>** ; **KCl**. Les activités résiduelles ont été déterminées par rapport à l'enzyme non additionnée d'ion.

### 3.2.2.4.Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme

La préparation enzymatique est pré-incubée pendant une nuit à différents pH allant de 4 à 11. L'activité résiduelle est ensuite mesurée aux pH et température optimales. L'enzyme non incubée est considérée comme témoin pour le calcul des activités résiduelles.

### 3.2.2.5. Effet de la température sur la stabilité de l'enzyme

La préparation enzymatique est préincubée pendant 60 minutes à différentes températures allant de 30 à 60 °C. L'activité résiduelle est ensuite mesurée dans les conditions optimales.

### 3.2.3. Identification de la souche retenue

L'identification de la souche a été accomplie par des études morphologiques physiologiques et basées sur des observations microscopiques et complétée par l'étude biochimique.

#### 3.2.3.1. Études morphologiques et observation microscopique

L'observation microscopique à l'état frais d'une goutte de culture permet de déterminer la morphologie et la mobilité de la bactérie.

##### 3.2.3.1.1.Examen direct à l'état frais

L'observation microscopique à l'état frais d'une goutte de culture permet de déterminer la morphologie et la mobilité de la bactérie [164]. Le montage se fait à l'aide d'une pipette Pasteur ou l'anse à ensemencement, sur une lame propre, une goutte de prélèvement, de culture en milieu liquide ou d'une suspension réalisée dans de l'eau distillée à partir des colonies ayant poussées sur un milieu solide. La préparation est alors recouverte d'une lamelle porte-objet. L'observation est réalisée au grossissement 40X dans la plus part des cas, avec un éclairage relativement faible. Cet examen met en évidence la présence des bactéries, leur forme, leur mode de groupement, leur densité, leur mobilité, leurs associations [165].

##### 3.2.3.1.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste DANOIS HANS CHRISTIAN GRAM qui a mis au point le protocole en 1884. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classifier. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme (voir Appendice D) [164].

La présence des spores peut être mise directement en évidence par examen

microscopique d'un frottis coloré par la méthode de Gram. Elles se présentent sous forme de particules endocellulaires sphériques ou ovales non colorées et réfringentes [164]. Dans des cas douteux, une coloration spécifique par le vert de malachite peut être réalisée.

### 3.2.3.2. Études physiologiques

#### 3.2.3.2.1. Test de l'oxydase

Ce test est essentiel pour orienter l'identification des bacilles et coques GRAM négatifs. Une parcelle de culture est déposée sur un disque de papier filtre (disque oxydase) imprégné de réactif. Une coloration rose se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive [165].

#### 3.2.3.2.2. Test de la catalase

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram positifs. La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air, des hydrogènes transportés par la voie oxydative directe. Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche de  $H_2O_2$  à 10 volumes. Une effervescence sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de  $H_2O_2$  sous l'action de la catalase [165].

#### 3.2.3.2.3. Test de l'indole

La production de l'indole est mise en évidence sur une eau peptonée, après ensemencement et incubation à 37 °C pendant 18 à 24h, quelques gouttes de réactif de Kovacs sont ajoutées au milieu, après agitation, la présence d'indole se manifeste par apparition d'un anneau rouge en surface [165].



#### 3.2.3.2.4. Test de mannitol-mobilité

Ce test permet à la fois l'étude de la dégradation du mannitol qui est un produit de dégradation du mannose et aussi déterminer la mobilité. Les tubes sont ensemencés par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit, et incubés pendant 24h à la température adéquate. Un virage de la couleur rouge du milieu vers le jaune à orange se manifeste en cas de réaction positive et la lecture de la mobilité est comme suit [164] :

- ✓ Envahissement du milieu = La bactérie est dite mobile ;
- ✓ Croissance concentrée autour de la piqure centrale = La bactérie est dite immobile

#### 3.2.3.2.5. Détermination du type respiratoire

La détermination du type respiratoire d'une bactérie nécessite un milieu de culture riche contenant un gradient de pression partielle en oxygène ; le principale milieu utilise est la gélose Viande-Foie.

La gélose est régénérée par ébullition pendant environ 30 min puis couler dans des tubes à essais. Ensemencement des tubes à 45°C à l'aide de pipette Pasteur boutonnée en remontant du fond du tube vers le haut en spirales et incubation à 37 °C pendant 24h.

#### 3.2.3.3. Études biochimiques

L'identification de la souche S3F a été complétée par des tests biochimiques moyennant des approches de la taxonomie classique : Galerie API. Il s'agit de galeries biochimiques miniaturisées comportant des capsules en nombre variable.

Suite aux résultats des tests de l'identification phénotypiques de la souche S3F qui a permis son rattachement au genre *Bacillus*, nous avons choisi la galerie adéquate à savoir la galerie API CH50 (API CH50 EHB-E<sub>1</sub> Medium). Cette galerie permet d'étudier le métabolisme de 49 substrats de carbohydrates et leurs dérivés

par bactéries. Le microorganisme à tester est mis en suspension dans le milieu puis inoculé dans chaque micro tube de galerie. Pendant l'incubation le catabolisme des glucides produit des acides organiques qui font virer l'indicateur du pH. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique de la souche et servant à son identification à l'aide du logiciel d'identification. La lecture s'effectue après incubation à la température adéquate pendant 20 h puis 48 h. Les profils biochimiques ou numériques sont interprétés à l'aide de tableaux, de catalogues analytiques ou logiciels.

#### 3.2.4. Etude des potentialités d'application industrielle de la préparation protéasique de la souche retenue

Les objectifs que nous nous sommes fixés dans cette partie sont l'optimisation de la production de la préparation enzymatique de la souche retenue, d'une part et l'évaluation des performances de la préparation protéolytique extraite.

##### 3.2.4.1. Production de protéase par la souche S3F

La production des protéases par la souche protéolytique 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 [166;167;168]. 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 [169]. 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 [170;171].

Au cours de cette première étape, nous nous sommes proposé d'évaluer la production de la protéase produite par la souche S3F. Au fait nous sommes partie d'un milieu de base appelé milieu initial N (non optimisé) composé de : 5 g/L source de carbone ; 2 g/L source d'azote ; 1 g/L  $\text{CaCl}_2$  ; 1 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à pH 10. A partir de ce milieu nous avons alors cherché à optimiser les

différents composants.

#### 3.2.4.1.1. Effet de différentes sources de carbone sur la production de l'enzyme

La production des protéases par la souche retenue a été testée sur le milieu N additionné de différentes sources de carbone : gélatine, glycérol, amidon, saccharose, glucose et maltose à raison de 5 g/L.

#### 3.2.4.1.2. Effet de la concentration de la gélatine sur la production de l'enzyme

Etant donné, que la meilleure production est obtenue sur le milieu N additionné de gélatine, nous étions amenés à optimiser la concentration en gélatine (de 0 à 15 g/L) afin de déterminer la concentration optimale pour la production des protéases sur milieu contenant : 2 g/L extrait de levure ; 1 g/L  $\text{CaCl}_2$  ; 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 1 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

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

L'effet de différentes sources d'azote organique (extrait de levure, extrait de viande, urée) et inorganique (sulfate d'ammonium  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2]$  et chlorure d'ammonium  $[\text{NH}_4\text{Cl}]$ ) sur la croissance et la production des enzymes a été étudié, à une concentration de 2 g/L, en comparaison à une culture témoin sans source d'azote.

#### 3.2.4.1.4 Effet de la concentration d'extrait de levure sur la production de l'enzyme

La concentration d'extrait de levure comme source d'azote a été optimisée sur milieu N à des concentrations de 0 à 7 g/L.

#### 3.2.4.1.5. Optimisation de la concentration en $\text{CaCl}_2$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , $\text{KH}_2\text{PO}_4$ sur la production d'enzyme

Afin de mettre en évidence l'importance du calcium, du phosphore, du potassium nous avons étudié l'effet de concentrations croissantes en  $\text{CaCl}_2$  (0,2 à 5 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,5 à 5 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5 à 5 g/L) sur la production des protéases.

#### 3.2.4.1.6. Effet de l'agitation

Pour mettre en évidence l'importance de l'agitation nous avons étudié l'activité enzymatique dans les conditions optimales en statique et en cinétique en variant légèrement l'agitation de 200rpm à 250rpm en utilisant le shaker.

#### 3.2.4.2. Cinétique de production des protéases

La production des protéases par la souche S3F est réalisée dans un erlenmeyer de 500 ml avec un volume utile de 50 ml sur milieu M optimisé à une température de 37 °C et sous une agitation de 200 rpm. Des prélèvements réguliers ont été effectués et la croissance bactérienne (DO à 600 nm) ainsi que l'activité protéolytique (U/ml) ont été déterminées chaque 2h pendant 8, 16, 24 et 48 heures d'incubation.

#### 3.2.4.3. Étude de l'aptitude technologique de la préparation enzymatique

Pour la détermination des aptitudes technologiques de la protéase de la souche retenue, nous nous sommes limités dans la présente étude à une caractérisation de l'activité coagulante de la préparation enzymatique extraite tout en comparant avec celle de la présure commerciale, avec une évaluation de rendement fromager.

##### 3.2.4.3.1. Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante est mesurée selon la méthode de BERRIDGE 1945 modifiée par COLLIN et al. 1977. Elle est réalisée sur le substrat standard de BERRIDGE par la dissolution de la poudre de lait à 10% (P/V) dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  (0,01M) et ajuster le pH à 6,5 à l'aide d'une solution de NaOH 0,1N [172].

Un volume de 10 ml de lait est versé dans un tube à essai et porté à 30 °C dans un bain marie. Au temps zéro, 1ml de la solution enzymatique est ajoutée et le

chronomètre déclenché. Le tube immergé est maintenu incliné, de telle sorte que le niveau de l'eau soit au-dessus de celui du lait. Il est régulièrement animé d'un mouvement rotatif autour de son axe. Le lait forme ainsi un film mince et homogène. Au moment de la floculation, des flocons apparaissent au sein même de ce film.

Une unité enzymatique ou unité présure (UP) correspond, selon la formule de BERRIDGE, au nombre d'unités de poids ou de volumes de lait (substrat standard de BERRIDGE) qui peuvent être coagulés par 1 ml de préparation coagulante en 100 secondes et à 30 °C [172].

$$UP = \frac{10 \times V}{Tc \times Q}$$

Avec : UP : unité présure ;

V : volume de substrat standard utilisé ;

Tc : volume d'extrait coagulant ;

Q : temps de coagulation.

L'activité coagulante des extraits enzymatiques peut être également exprimée en « force coagulante de SOXHLE » (F), selon la relation suivante :

$$F = UP/0,0045 [173]$$

#### 3.2.4.3.2. Détermination de temps de floculation

La coagulation enzymatique du lait peut être appréhendée à travers le temps de floculation [174]. En fromagerie, le temps de floculation est la grandeur appelée «temps de prise» ou temps de Berridge. Il s'agit du temps écoulé depuis l'emprésurage jusqu'à l'apparition des premiers flocons visibles à l'œil [02]. Lors de la coagulation enzymatique du lait c'est l'état floconneux qui évolue selon une vitesse appelée « vitesse de durcissement », pour aboutir au coagulum ferme.

La méthode de Berridge modifiée par Collin et *Coll.* consiste en la mesure du temps nécessaire à l'apparition des premiers flocons ( $t_f$ ) dans le lait préalablement porté à 30 °C pendant 15 minutes, dans un bain marie, puis additionné de 10% (V/V) de préparation coagulante.

#### 3.2.4.3.3. Caractérisation du lait

##### 3.2.4.3.3.1. Détermination du pH et de l'acidité

Le pH et l'acidité titrable sont deux mesures pour évaluer l'acidité du lait. Le pH permet de déterminer les ions  $H^+$ , alors que l'acidité titrable exprime la quantité d'acide lactique. Cependant, le résultat de l'acidité titrable exprime une acidité due en partie à la caséine, aux acides organiques et aux substances minérales, en acide lactique.

Le pH du lait à 25 °C, change normalement dans une marge relativement étroite de 6,5 à 6,7 et une acidité titrable de 0,12 à 0,18% acides lactiques soit 12 à 18 °D (1°D représente 0.1g d'acide lactique) [173].

Le pH du lait est mesurée par pHmètre (Knick pHmeter 766 calimatic).  
L'acidité exprimée en degré Dornic, est déterminée par titration directe de l'acide lactique par l'hydroxyde de sodium 0.1N en présence de phénolphtaléine.

#### 3.2.4.3.3.2. Détermination de l'extrait sec du lait et fromage

La matière sèche correspond au poids du résidu restant après dessiccation de l'échantillon à 105°C dans un humidimètre (Precisa HA 60, Swiss). Le principe consiste à sécher 1ml de lait (2g:de poudre de lait, fromage) par infrarouge et à contrôler en continu le poids à l'aide d'une balance intégrée jusqu'à poids constant. Le pourcentage d'humidité est calculé par la différence entre le poids initial et le poids finale sur base humide. L'extrait sec est déterminé pour 1g de poudre de lait ,1g de fromage et 1ml pour le lait reconstitué.

#### 3.2.4.3.4. Fabrication des fromages et calcul du rendement fromager

Un litre de lait de vache dont le pH initial de 6.7, est pasteurisé en vrac puis laissé à mature par la flore banale endogène pendant 4 h à la température ambiante. Il est ensuite additionné soit de présure diluée soit de notre extrait enzymatique dilué, à ce stade le pH est à 5,9. La durée de la coagulation est de 6 h. Après un léger tranchage et 2 h d'égouttage, le caillé est lissé à l'aide d'un robot (Moulinex).

Le rendement fromager brut (RBR) est le pourcentage de la masse totale de fromage par rapport à la masse initiale du lait. Le rendement fromager en matière sèche (RMS) est le pourcentage de matière sèche totale récupérée dans le fromage par rapport à la matière sèche totale initiale du lait.

## CHAPITRE 4

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 4.1. Isolement et criblage de souches bactériennes sécrétrices de protéases intéressantes

Dans le cadre de la recherche de nouvelles souches bactériennes productrices de protéases, nous avons isolé 135 nouveaux isolats à partir de différents biotopes d'Algérie à savoir le sol anciennement contaminé par les déchets d'abattoirs, les eaux stagnantes contenant les rejets de l'abattoir municipal de la wilaya de Blida. En plus, nous avons criblé la souche préexistante AB1. Toutes ces souches ont été criblées par repiquage sur gélose nutritive au lait (GNL : milieu utilisé pour déceler les activités protéolytiques extracellulaires) et incubation pendant une nuit à 30, 37 et 45 °C. Ce test semi-qualitatif est visualisé par la diffusion des protéases secrétées dans la gélose environnante tout en hydrolysant les protéines du lait (notamment les caséines) ce qui se traduit par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie (figure4.1).



Figure 4.10 : Mise en évidence d'activités protéolytiques produites par différentes souches bactériennes sur gélose nutritive au lait (test-semi qualitatif) (photos originales).



En se basant sur le rapport du diamètre de l'halo (mm) sur le diamètre de la colonie (mm), nous avons montré que parmi les 135 souches testées :

- 40 souches ne présentent pas d'activité protéasique ou elles possèdent une activité très faibles ;
- 83 souches présentent des rapports inférieur à 1.4 ;
- 12 souches montrent des rapports supérieur à 1.4. (tableau 4.1) ont été retenues pour la poursuite de la sélection des souches à fort potentiel protéolytique en se basant sur le dosage quantitatif de leur activité sur milieu liquide.

Tableau 4.1: Tableau récapitulatif des activités protéolytiques sur milieu solide GNL (test semi-qualitatif) des souches bactériennes retenues.

<b>SOUCHE</b>	<b>RAPPORT HALO</b>	<b>SOUCHE</b>	<b>RAPPORT HALO</b>
1-S1F	1.91*	7-S2F	1.50
2-S7F	1.71	8-S13F	1.47
3-S3F	1.65	9-S9F	1.42
4-S6F	1.62	10-S4F	1.42
5-S10F	1.62	11-S5F	1.41
6-S8F	1.58	12-S12F	1.41
	13-AB1	1.4	

\* Toutes les mesures et les déterminations des activités protéolytiques ont été reproduites trois fois.

## 4.2. Caractérisation microbiologique et biochimique des préparations protéolytique

### 4.2.1. Evaluation du niveau de croissance et de production des protéases

Tableau 4.2 : Activités protéolytiques sur milieu liquide (test qualitatif) des souches bactériennes retenues. Les valeurs de la DO<sub>600</sub> et du pH correspondent pour le temps de culture où nous avons observé la meilleure production.

<b>SOUCHE</b>	<b>Activité (UI) T0</b>	<b>Activité (UI) T24</b>	<b>Activité (UI) T48</b>	<b>Activité (UI) T72</b>	<b>DO<sub>600</sub> pour l'activité max</b>	<b>pH pour l'activité max</b>
1-S1F	83,63	240	131,63	98,18	7,1	9,23
2-S2F	85,81	166,18	198,36	86,54	5,45	9,72
3-S3F	61,45	344,36	196,72	157,63	7,32	7.41
4-S4F	86,9	144,72	177,45	84	4,90	8,51
5-S5F	47,8	80,63	177,09	67,03	4,67	9,00
6-S6F	66,32	65,45	133,81	78,9	4,70	7.9
7-S7F	32,72	480	209,81	124,72	9,3	8,5
8-S8F	99,27	190,18	142,54	109,81	5,54	8,11
9-S9F	137,45	142,9	78,9	48,36	5,56	9,2
10-S10F	120,36	120,18	256,54	150,18	6	9,5
11-S12F	72,72	173,45	116,36	64,72	6,90	9,28
12-S13F	77,81	113,45	110,9	130,09	5,67	8,71
13-AB1	47,27	89.09	230,34	98,30	5,98	8,94

Les résultats mentionnés dans le tableau 4.2 montrent clairement que les souches sélectionnées poussent bien sur le milieu de culture utilisé. Toutefois, elles présentent des niveaux de production de protéases variables avec des maximums d'activités atteints après 24h pour les souches S1F ; S3F ; S7F ; S8F ; S9F ; S12F et à 48h pour les souches restantes. La différence des niveaux de production de protéases sur milieu liquide dépendrait des exigences des souches, de la composition du milieu, des concentrations des constituants et des conditions de production (vitesse d'agitation, température) [164 ;3].

Nous remarquons que l'activité protéolytique diminue en fonction du temps. Cette diminution est probablement due à plusieurs phénomènes :

- Epuisement des éléments nutritifs dans le milieu de culture ;
- Une dégradation par les enzymes endogènes libérés suite à la lyse cellulaire ou à une autoprotéolyse ;
- Inhibition par excès de surproduction d'enzymes.

Le phénomène d'instabilité de l'activité protéolytique lors de la fermentation a été également décrit pour d'autres souches comme *Bacillus subtilis* ATCC 14416 [175] et *Erwinia chrysantemi* [176].

Nous avons remarqué aussi que le pH est variable et qu'aucune souche ne présente un pH plus alcalin que celui de départ (pH 10,0). Cinq (05) souches présentant un niveau de production supérieur à 200 U/ml ont été retenues pour une étude plus approfondie. Il s'agit des souches AB1, S1F, S10F, S3F et S7F produisant respectivement 233,4 ; 240 ; 256,54 ; 344,36 et 480 U/ml. Parmi les souches retenues, on constate que le maximum d'activité de la souche S3F est atteint au pH 7,41 ce qui semble très intéressant pour l'application fromagère.

#### 4.2.2. Propriétés physico-chimiques des protéases

Nous nous sommes proposé pour la suite de ce travail, de caractériser les préparations protéolytiques des 5 souches retenues. Ainsi, nous avons été amenés à déterminer la température optimale d'action et le pH optimum de fonctionnement ainsi que la stabilité des préparations protéolytiques. En fait, ces deux facteurs abiotiques influencent sensiblement la croissance bactérienne et plusieurs travaux ont démontré qu'ils affectent fortement la production des protéases [1;162;166].

##### 4.2.2.1. Étude de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité des préparations protéolytiques

Le pH est un paramètre essentiel pour la sélection d'une protéase en fromagerie, notamment les étapes coagulation et affinage, qui doit présenter un optimum de pH généralement compris entre 4,0 et 6 [6;177]. L'activité des différentes préparations enzymatiques a été déterminée à des pH variant entre 4,0 et 11,0 et à une température de 40 °C (cf. Figure 4.2).

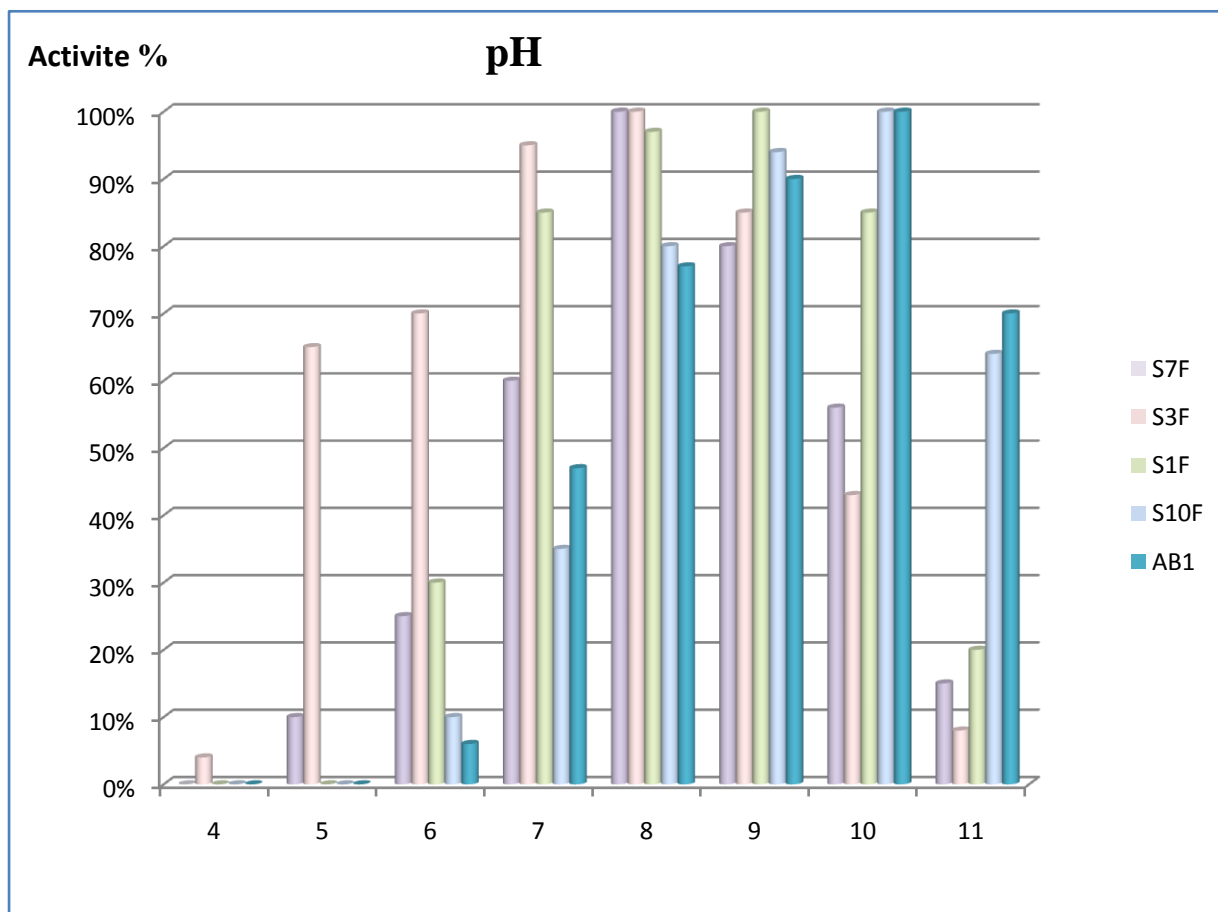


Figure 4.2: Effet du pH sur les activités des préparations enzymatiques des cinq souches retenues.

Les études de l'effet du pH sur les activités protéolytiques (figures 4.2) montrent que la souche S3F apparaît la plus intéressante puisqu'elle produit une ou plusieurs protéases actives dans une large gamme de pH allant de 5,0 à 9,0 avec un optimum se situe entre 5 et 7 dont les activités relatives sont de l'ordre de 65 % et 95% respectivement avec un maximum à pH 8. L'activité de la souche S7F est optimale à 8 mais relativement plus élevée que la souche S3F puisqu'elle garde la moitié de son activité à pH 10 alors que celle de la souche S3F n'est qu'à 43%. La souche S1F semble être également intéressante puisqu'elle produit une enzyme dont l'optimum d'action est observé entre pH 7,0 et 8,0 avec des activités relatives de 97 et 85% à pH 8,0 et 10,0 respectivement. Les souches AB1 et S10F sécrètent des enzymes possédant un pH optimum de fonctionnement basique entre 9 et 11. Dans l'ensemble l'optimum des activités des souches est atteint entre 8 et 10, ses activités commencent à s'annuler à partir du pH 6, sauf pour la souche S3F dont l'activité s'annule au pH 4.

Plusieurs travaux ont décrit la production de protéases alcalines par des souches du genre *Bacillus* [5;178;179]. La préparation protéolytique de *B. licheniformis* MIR 29 [180] n'est pas aussi active que celles obtenues par nos souches surtout dans la zone de pH de 7 à 9. A pH 7, l'activité protéolytique n'est que de 20 % pour MIR 29 par contre l'activité de la préparation de *B. pumilus* CBS [161] à la même valeur de pH est de 71%. Par ailleurs, les protéases produites par *Bacillus alcalophilus*, qui sont des protéases à sérine, sont stables et actives dans une gamme de pH variant de 6 et 12 [178].

HAYASHI et al. (1990) ont isolé des protéases à sérine à partir de la souche de *Brevibacterium linens* impliqués dans l'affinage du fromage, dont l'activité présente un optimum entre 7 et 11. Selon LENOIR [156], deux activités aminopeptidasiques ont été mises en évidence chez *Geotrichum candidum*, présentant un optimum d'activité à 8, la protéase alcaline de *Aspergillus oryzae* NRLL 2160 a un optimum de pH entre 7 et 8,5 et elle est stable entre 4,5 et 9 [156]. Donc, les préparations enzymatiques issues de nos souches locales présentent l'avantage de pouvoir être utilisées dans une large gamme de pH et pour de nombreuses applications industrielles.

Les protéases détergentes la *Subtilisin NOVO* marquent un optimum entre pH 6 et 7. Tandis que, la *Subtilisine Carlsberg* et la *Subtilisine BPN* présentent un optimum d'activité à un pH de 10,5 [181]. Aussi, les protéases produites par *Bacillus* sp, *Thermus aquaticus*, *Vibrio metschnikovi* sont actives à pH 10,5 [182;183]. Ces résultats coïncident avec l'optimum des activités des AB1 et S10F, ce qui nous permet d'envisager une application en détergence pour ces dernières souches.

Certains auteurs ont démontré que le pH affecte les mécanismes de régulation métabolique de la production des protéases chez les *Bacillus licheniformis* [178] et *Bacillus subtilis* [162].

Le tableau 4.3 récapitule les activités des préparations protéolytiques des cinq souches bactériennes retenues vis-à-vis des variations du pH.

Tableau 4.3 : Tableau récapitulatif des activités des préparations protéolytiques des 5 souches bactériennes retenues en fonction du pH

SOUCHE	ACTIVITE (%) EN FONCTION DU pH				
	5,0	6,0	7,0	9,0	11,0
S3F	63	90	100	74	00
S1F	25	60	100	75	33
S7F	08	41	100	97	45
S10F	10	24	100	56	12
AB1	00	15	95	100	57

La stabilité des préparations protéolytiques des cinq différentes souches retenues vis-à-vis du pH a été également déterminée par préincubation des extraits enzymatiques dans des tampons à différents pH allant de 4,0 à 11,0 pendant une nuit (16h) et à 40 °C (presque toutes les préparations sont stables à cette température). Les activités résiduelles ont été mesurées dans les conditions optimales de température et de pH de chaque préparation. De l'analyse des résultats, il en ressort que pour le pH 4, l'activité est nulle pour toutes les souches à l'exception celle de la souche S3F qui était de 15 %, alors que au pH 5 les souches montrent des activités négligeables. Dans des pH allant de 7,0 à 9,0, toutes les préparations enzymatiques sont quasiment stables et montrent des activités résiduelles de l'ordre de 100%. La stabilité des souches étudiées diminue considérablement pour les pH 10,0 et 11,0 avec des activités résiduelles, nulle pour la souche S3F à 11 et variables de 15 à 25% pour les quatre autres souches.

#### 4.2.2.2. Étude de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité des préparations protéolytiques

L'effet de la température sur l'activité protéolytique des différentes préparations enzymatiques a été également étudié à des températures de 40, 50, 60 et 70 °C et au pH optimum pour chaque préparation. Les résultats sont consignés dans la figure 4.3 et le tableau 4.4.

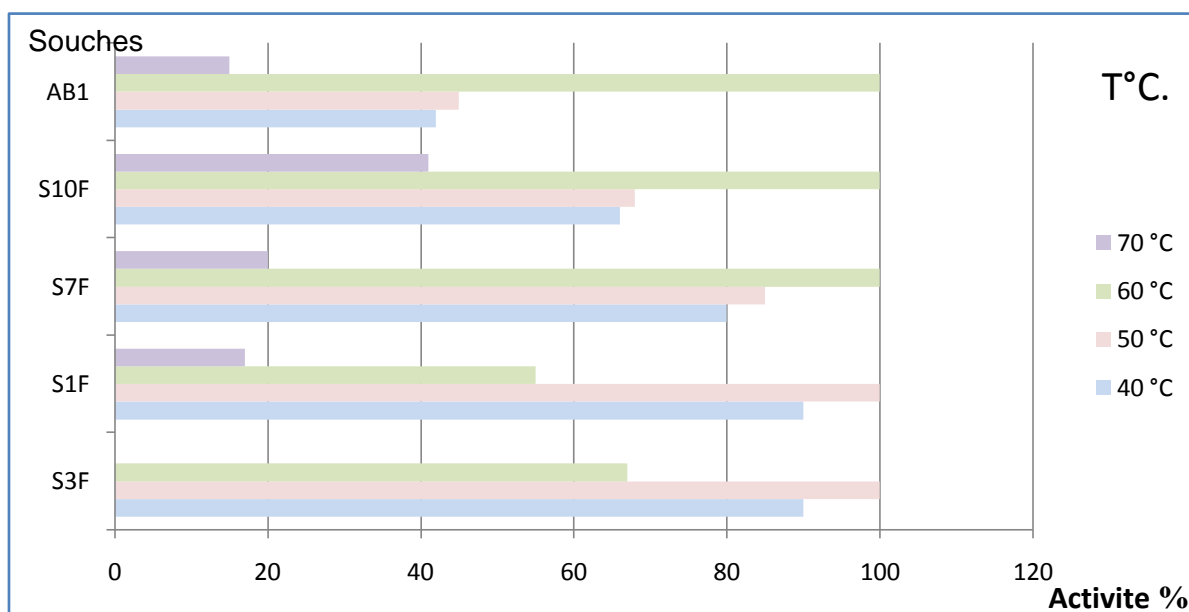


Figure 4.3 : Effet de la température sur l'activité des cinq souches



Tableau 4.4 : Tableau récapitulatif des activités des préparations protéolytiques des cinq souches bactériennes retenues en fonction de la température

Les souches	Activité (%) en fonction de la température à pH optimum pour chaque préparation			
	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C
<b>S3F</b>	<b>90</b>	<b>100</b>	67	0
<b>S1F</b>	90	<b>100</b>	55	17
<b>S7F</b>	80	85	<b>100</b>	20
<b>S10F</b>	66	68	<b>100</b>	41
<b>AB1</b>	42	45	<b>100</b>	15

L'analyse des résultats mentionnés dans le tableau 4.4 et la figure 4.3 montre que les préparations enzymatiques étudiées ont une température optimale d'action de 60 °C, excepté celles issues des souches S1F et S3F dont l'optimum est à 50 °C.

En effet, les souches S7F et S10F produisent des enzymes qui semblent être les plus intéressantes puisqu'elles sont actives dans une large gamme de température allant de 40 à 70 °C. Ainsi, l'enzyme issue de la souche S7F garde 80 et 20% de son activité à 40 et 70 °C respectivement ; alors que celle de la souche S10F garde uniquement 66 et 41% dans les mêmes conditions. Néanmoins, les souches S1F et S3F secrètent également des protéases actives dans un intervalle plus bas de température (de 40 à 60 °C). En effet, l'enzyme de S1F garde 90 et 55% de son activité à 40 et 60 °C respectivement et elle maintient 17% de son activité pour la température de 70 °C. Alors que l'enzyme issue de la souche S3F garde le maximum de son activité à 40 et 50°C, elle est de 90 % et 100 % respectivement, tandis ce qu'elle est inactivée à 43% pour 60 °C, et perd toute l'activité (100%) à 70 °C. Cependant, la préparation enzymatique de la souche AB1 ne garde que 42 et 15 % de son activité à 40 et 70 °C, respectivement.

Donc les protéases sécrétées par les souches bactériennes étudiées présentent un optimum d'activité dans un intervalle de températures situe entre 40 et 60 °C. Ceci implique que ce sont des enzymes modérément thermostables.

D'après GUPTA et al [1], les températures optimales pour la production des protéases alcalines varient de 35 à 60 °C selon les souches et le pH optimale est entre 7 et 7,5

HAYASHI et LAW [184] ont purifié deux aminopeptidases de *Brevibacterium linens* présentant une activité optimale à pH 9,3 et 40 °C. Ces enzymes ont été utilisées conjointement à la Neutrase dans la fabrication du Cheddar. Alors que les protéases isolées chez *Brevibacterium linens* [98] montrent un optimum d'activité entre 40 et 55 °C. Néanmoins, une protéase de *Brevibacterium.linens* reste relativement stable à 70 °C [185].

Une température optimale de 70 °C a été trouvée pour une souche halotolérante de *B. licheniformis* [180]. La température optimale d'activité de la préparation protéolytique de *B. licheniformis* MIR 29 [179] et de l'Alcalase (Novozymes) est de 60 °C. Par ailleurs, les travaux effectués par Johnevesly et Naik [186] ont montré que la température optimale de la protéase produite par la souche *Bacillus* sp. JB-99 est de 70 °C. Celle produite par *Bacillus* SB5, utilisée dans la formulation de détergents, est active à 70 °C [187].

La figure 4.4 illustre l'effet de la température sur la stabilité des préparations enzymatiques des souches étudiées.

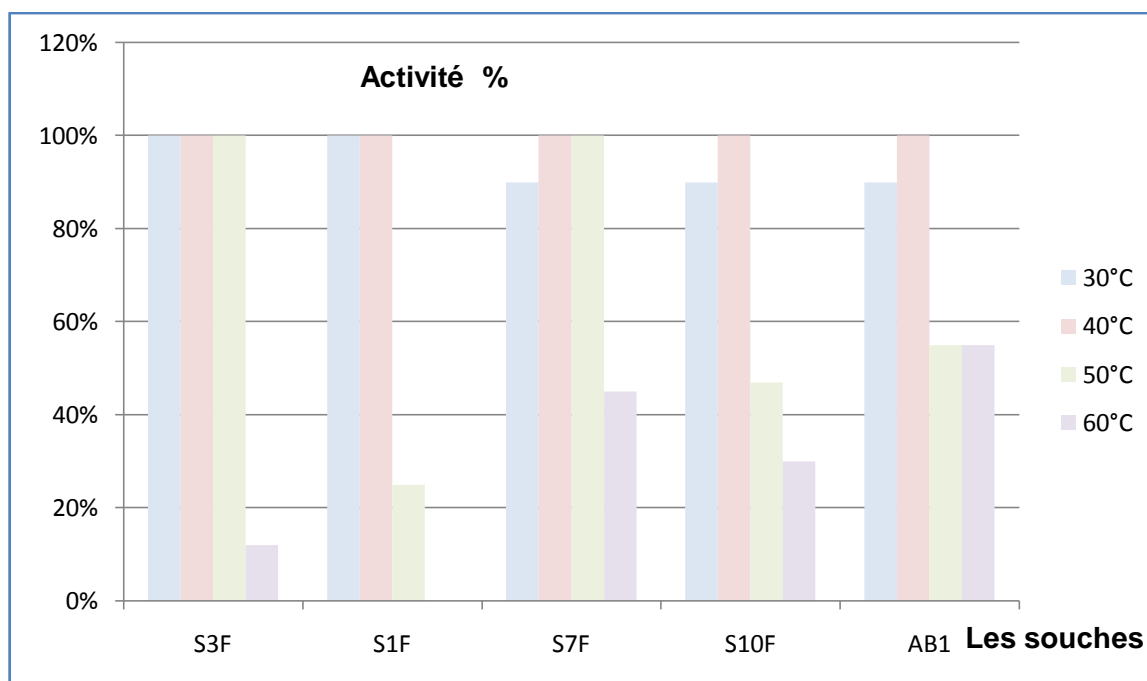


Figure 4.4 : Effet de la température sur la stabilité des préparations enzymatiques des cinq souches.

La stabilité thermique a été étudiée suite à une préincubation des préparations enzymatiques pendant 1 h à 30, 40, 50 et 60 °C. Nous avons constaté que tous les extraits enzymatiques demeurent, pratiquement, stables pendant 1 h à 30 et 40 °C avec 90 à 100% d'activité résiduelle. A 50 °C, les préparations issues des souches S7F et S3F gardent 100% de leur activité alors que celles des souches AB1 et S10F conservent 55 et 47% de leur activité, respectivement. Dans les mêmes conditions, l'extrait protéolytique de la souche S1F montre une chute de l'activité résiduelle de l'ordre de 25%. Les préparations des souches S1F et S3F sont instables et leur activité s'annule après 1 h de préincubation à 60 °C. Cependant, celles des souches AB1, S7F et S10F gardent 55, 45 et 30% de leur activité, respectivement.

Plusieurs études ont démontré la tolérance des protéases alcalines vis-à-vis les hautes températures notamment celles produites par le genre *Bacillus* [1;178;186], en effet la protéase de *Bacillus alcalophilus* est stable pour des hautes températures jusqu'à 70 °C et perd 50% de son activité lorsque chauffée de 84 °C. durant 15 minutes [186].

Par ailleurs, les préparations alcalines de *Bacillus subtilis* et de *Bacillus licheniformis* sont stables et actives à plus de 60 °C pendant 1h 30min tandis que *Bacillus amyloliquefaciens* est sensible à une température de 59 °C. [188].

En outre, chez plusieurs souches de bactéries corynéformes prises chez les espèces *Brevibacterium linens* et *Arthrobacter luteus*, une stabilité thermique de l'activité protéasiques a été déterminée pour des températures comprises entre 40 et 50 °C pendant plus de 1h [184 ;185].

La thermostabilité est un phénomène qui dépend de la structure conformationnelle de l'enzyme et du microenvironnement où elle se trouve. En effet le mécanisme d'inactivation des protéases produites par S3F et S1F est expliqué par la destruction des liaisons non covalentes responsables du maintien de la conformation active à leur température optimale [188]. Ce dépliement est généralement irréversible, on assiste à une agrégation et une précipitation de l'enzyme lorsqu'elle est soumise à des températures élevées [189].

#### 4.2.2.3. Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique

Plusieurs travaux ont montré que l'activité enzymatique de certaines protéases microbiennes exigent la présence d'ions, tels que le calcium ou le fer [190; 191]. Dans notre cas, l'effet de quelques ions métalliques (**CuSO<sub>4</sub>**; **MgSO<sub>4</sub>**; **CaCl<sub>2</sub>**; **ZnSO<sub>4</sub>**; **KCl**) à une concentration de 2 mM, sur l'activité catalytique a été étudié dans les conditions optimales de température et pH optimum pour chaque souche (cf. Figure 4.5).

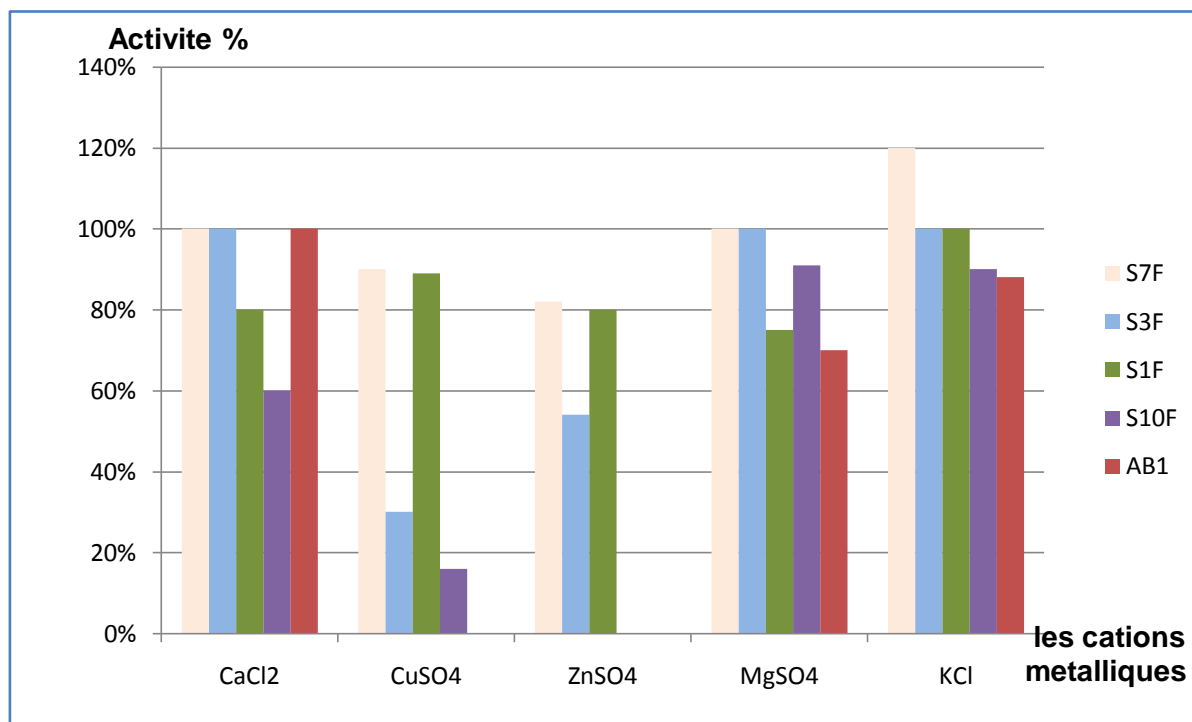


Figure 4.5 : Effet des cations métallique sur l'activité des 5 souches.

De l'analyse de la figure 4.5, il ressort que l'effet des ions métalliques sur l'activité protéolytique est variable selon les souches. En effet, le cuivre et le zinc inhibent partiellement l'activité de la préparation enzymatique de la souche S3F et complètement celles des souches AB1 et S10F. Contrairement, la disponibilité du calcium, magnésium et potassium stimule l'activité enzymatique de l'ensemble des souches testées. Des résultats comparables ont été observés avec la protéase alcaline à sérine de la souche *Bacillus* sp. KSM-K16 où l'activité protéolytique est activée par les ions  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  et  $\text{Cu}^{++}$  [192], les mêmes ions stimulent l'activité des protéases produites par *B. amyloliquefaciens* [181]. Cependant, la préparation protéolytique de la souche *B. cereus* BG1 est considérablement activée par les ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  et inhibée par les ions  $\text{Zn}^{++}$  et  $\text{Cu}^{++}$  [193].

Les peptidases à métal font partie des hydrolases pour lesquelles l'attaque nucléophile d'une liaison peptidique est réalisée par hydrolyse. 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. L'ion métallique se maintient en place à l'aide de ligands qui sont des acides aminés des chaînes latérales, normalement au nombre de trois [58;56].

Les métalloprotéases les plus étudiées sont actives dans des conditions de pH légèrement alcalins (7,0 à 9,0) [58;59;56], et ils sont actives sur une large gamme de pH de 5 à 10 [1;99]. La stabilité augmente considérablement si du  $\text{Ca}^{2+}$  est ajoutée au milieu de culture [1;99;58;59]. Toutefois, les métalloprotéases peuvent être retrouvées seules ou associées à d'autres protéases acides et alcalines chez plusieurs microorganismes. Ainsi, elles sont produites par plusieurs espèces de *Bacillus*, comme *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus stearothermophilus*. Elles sont également présentes dans les préparations protéolytiques issues des moisissures comme *Aspergillus oryzae* où la métalloprotéase se trouve présente avec une protéase acide et une autre alcaline . [1;21]

Il se trouve que les protéases des souches étudiées sont dans l'ensemble activées par certains ions métalliques bivalent mais cela ne peut pas être interprété qu'il s'agit des métalloprotéases alcalines et non plus que les protéases sont associées ou contaminées par des métalloprotéases du fait que l'étude a été menée sur des préparations enzymatiques non purifiées. Donc une telle classification nécessite l'isolement de la protéase, la purification, la caractérisation biochimique et l'identification moléculaire.

A la lumière des études préliminaires de la stabilité notamment vis-à-vis du pH et de la température, nous avons constaté que la préparation protéolytique issue de la souche S3F semble être la plus intéressante pour une éventuelle application en fromagerie, puisqu'elle présente des optima d'activité au voisinage de pH 6,0 à 8,0 avec 63% d'activité maintenue au pH 5 et plus au moins stable à la variation de la température avec un optimum situant entre 30 et 60 °C. En effet l'enzyme issue de cette souche est considérablement activée par le magnésium, le potassium et le calcium ces deux dernières sont abondants dans le lait et jouent un rôle considérable dans la fabrication fromagère.

La fraction minérale du lait est constituée de plusieurs composés qui existent surtout sous forme de sels solubles. Les éléments majeurs, le calcium, le potassium, le magnésium et le sodium forment des sels avec les éléments acides : protéines, phosphates et chlorures [194].

Les sels de calcium et de phosphate ont un rôle important dans la coagulation présure et dans la structure des gels. L'addition du calcium réduit le temps de coagulation en neutralisant les charges négatives des résidus de caséine, ce qui augmente l'agrégation des micelles de caséine [195 ;68].

En effet, la phase primaire de la coagulation est indépendante du calcium, alors que la phase secondaire est liée aux deux formes de calcium, forme ionique  $\text{Ca}^{2+}$  et forme colloïdale en réduisant le potentiel des para-caséines en résidus de phosphosérine négative ou les groupes carboxyliques des caséines  $\alpha$  et  $\beta$  menant à une augmentation de la vitesse d'agrégation des micelles de caséine [146 ;138 ;139] .

Cependant, Le  $\text{Ca}^{2+}$  joue un rôle important dans le maintien de l'activité protéolytique des protéases alcalines à sérines par stabilisation de la conformation active de l'enzyme, sans être impliqué dans la réaction catalytique [178; 58].

Toutefois, les caractéristiques de la préparation enzymatique de la souche S3F la rapproche d'une part, de celles de la flore d'affinage présentant des optimums de pH aux alentours de 7 et 8 et une thermorésistance entre 40 et 55 °C, et d'autre part, de celles des enzymes coagulantes stables entre pH 4 et 7 et une résistance thermique entre 30 et 50 °C et dépendantes au calcium

En effet, les propriétés des enzymes microbiennes qui ont obtenu un succès commercial sont voisines de celles de la présure de veau mais certaines différences sont importantes dans le processus de fabrication du fromage ainsi, la variation de l'activité coagulante du lait avec la température, le pH, et la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  diffère de la pepsine de veau [196;197].

Selon, ALIAS et CHAMBA [198] les enzymes protéolytiques provenant des espèces de *Mucor* sont plus dépendantes de la température que celle du veau, de même que les protéases de *M. pusillus* sont plus affectées par la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ .

Les protéases de *Mucor* se sont avérées excellentes pour la préparation de la plus part des types de fromages après l'ajustement des techniques de production. Puisqu'il semble important de réduire la concentration en enzymes durant le procédé, particulièrement quand les enzymes proviennent de *M. pusillus*, il est souvent recommandé d'augmenter le contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le lait. D'autres modifications dans les techniques de production incluent l'ajustement du brassage, la réduction du temps et la variation des températures. De plus le type et le dosage de la culture de départ peut être adapté en fonction des présures microbiennes [198;197]



Le principal désavantage des protéases de *Mucor* est la température élevée nécessaire pour son inactivation, ce qui a des répercussions importantes dans la fabrication de fromages. En effet, la présure est stable et active à 40 °C, son inactivation thermique commence à partir de 50 °C, et à 61 °C est totale ; en revanche, la protéase de *Mucor* perd 90% de son activité lorsque chauffée à 65 °C pendant 15 minutes [198] alors que la protéase d'*Endopathia parasitica* est inactivée en moins de 5 mn à 60 °C et son activité de coagulation du lait est moins dépendante de la température et du contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  que les protéases de *Mucor* et la présure (dès qu'elle agit sur les micelles de caséines, celle-ci deviennent très sensibles aux ions calcium ce qui influe sur la vitesse de coagulation ) [198]. La protéase d'*Endopathia parasitica* comporte une activité protéolytique supérieure à celle issue de *Mucor*, mais néanmoins n'est pas très utilisée. Du fait qu'elle est très instable à 28 °C. Il est nécessaire de la récupérer rapidement à de faible température et de préférence en absence d'oxygène. De plus quand le pH s'élève, le temps de coagulation sur lait s'accroît sensiblement moins avec l'enzyme d'*Endopathia parasitica* qu'avec la présure par contre l'enzyme coagulante de *Mucor* réagit comme la présure animale [198;199;13].

Les présures microbiennes ont jusqu'à maintenant une position de substituer à la rénine même si cette dernière demeure l'option la plus populaire

### 4.3. IDENTIFICATION DE LA SOUCHE S3F

#### 4.3.1. IDENTIFICATION DE LA SOUCHE S3F

Pour identifier la souche S3F, nous avons eu recours à des approches phénotypiques (morphologiques, physiologiques et biochimiques).

L'observation microscopique (figure 4.6), a montré que la souche S3F est une bactérie en forme de bacille. Par la suite, nous avons effectué des tests bactériologiques préliminaires d'orientation (tableau 4.5) afin de choisir la galerie API adéquate. Cette analyse a révélé qu'il s'agit d'une souche, Gram positive, sporulée, aéro-anaérobie, mobile, ne dégradant pas le mannitol, possédant une catalase et elle est oxydase positive.

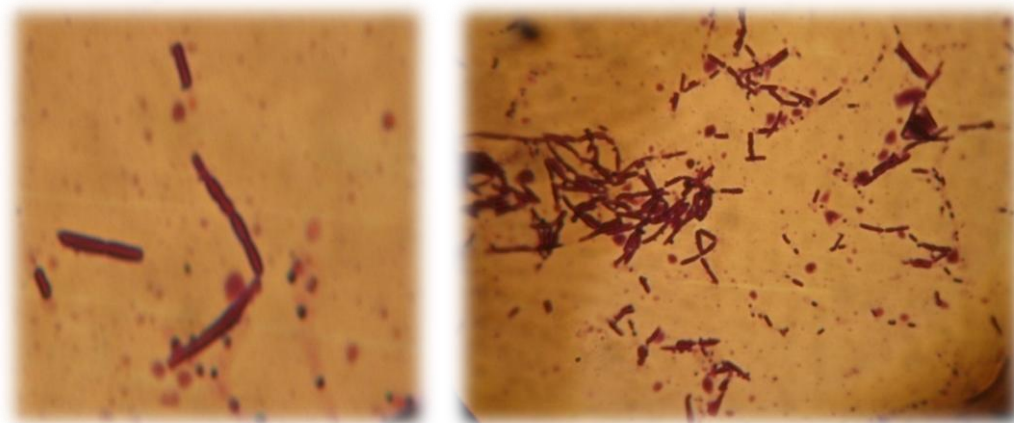


Figure4.6 Aspect des cellules bactériennes sous microscope optique GX10X25X100 (Photos originales).

Tableau4.5 : Résultats préliminaires d'identification.

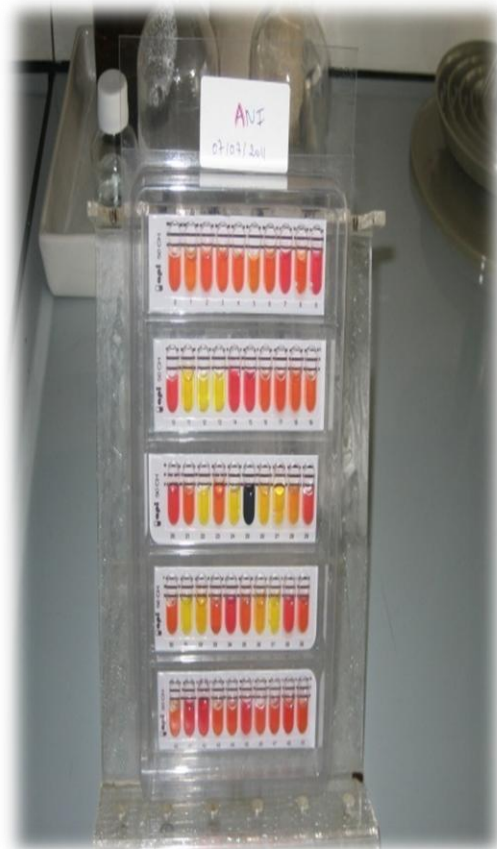
<b>TEST</b>	<b>SOUCHE S3F</b>
<b>Observation à l'état frais</b>	Bacille court
<b>Caractère sporulé</b>	Positif
<b>Coloration de Gram</b>	Positif
<b>Oxydase</b>	+
<b>Catalase</b>	+
<b>Indole</b>	-
<b>Mannitol</b>	-
<b>Mobilité</b>	+

L'identification des bactéries est en grande partie basée sur la mise en évidence de leurs caractères biochimiques, qui constituent souvent la plus grande partie de la galerie d'identification. Le choix de ces galeries est orienté par un certain nombre de caractères tels que morphologie, Gram, catalase, oxydase, type respiratoire, présence de spores [164;165].

Suite aux résultats de l'identification phénotypique de la souche S3F et en se référant aux résultats décrits dans le manuel de Bergey's de la Bactériologie Systématique [200], il a été suggéré que la souche S3F est une bactérie appartenant au genre *Bacillus*. A la lumière de ces résultats, la galerie adéquate pour l'identification moléculaire est la galerie API 50 CH (voir la figure 4.7)



API CH50 après inoculation



API CH50 après 24h d'incubation

Figure 4.7: le test biochimique en utilisant la galerie API CH50 (photos originales)

Tableau 4.6: Résultats des tests de la galerie API CH50

Tests	Résultats	Tests	Résultats
Glycérol	+	Esculine	+
Erytriol	-	Salicine	+
D-arabinose	-	Cellobiose	+
L-arabinose	-	Maltose	+
Ribose	-	Lactose	+
D-xylose	-	Melibiose	-
L-xylose	-	Saccharose	+
Adonitol	-	Trehalose	-
B-méthyle xyloïde	-	Inuline	+
Galactose	+	Melezitose	-
D- glucose	+	D-raffinose	-
D -fructose	+	Starch	-
D-mannose	-	Glycogene	+
L-sorbose	-	Xylitol	-
Rhamnose	-	$\beta$ -gentibiose	-
Dulcitol	-	D-turanose	-
Inositol	-	D-lyxose	-
Manitol	-	D-tagatose	-
Sorbitol	-	D-fucose	-
$\alpha$ -methyl-D- manoside	-	L-fucose	-
$\alpha$ -methyl-D- glucoside	+	D-arabitol	-
N-acetyl- glucosamine		L-arabitol	-
Amygdaline	+	Gluconate	+
Arbutine	-	2 ceto-gluconate	+
	+	5 ceto-gluconate	+

D'après les résultats obtenus et après interprétation de l'API CH50 en utilisant une monographie appropriée à ce genre de galerie (Hand book), la souche **S3F** a été rattachée au genre ***Bacillus anthracis***

Cette investigation a visé l'isolement, le criblage ainsi que l'identification d'une souche bactérienne protéolytique produisant une enzyme active et stable à une large gamme de pH. En effet, à partir de 135 souches testées sur gélose nutritif au lait (test semi-qualitatif), 12 souches ont été retenues du fait qu'elles présentent un rapport du diamètre de l'halo sur le diamètre de la colonie (constitue un premier critère de sélection) supérieure à 1,4. Ces 12 souches ont été sujettes à une étude de production sur milieu liquide pour une étude quantitative. Cette dernière a conduit à la sélection de 5 souches intéressantes à savoir ; AB1, S1F, S10F, S3F et S7F vue qu'elles présentent un niveau de production supérieur à 200 U/ml (constitue un deuxième critère de sélection). Enfin, la souche S3F a été retenue aussi bien pour le niveau d'activité protéase qu'elle produit que pour la qualité de sa (ou de ses) protéase(s). Ceci nous a laissé présumer qu'il s'agit d'une souche prometteuse dans l'industrie fromagère.

L'identification phénotypiques de la souche S3F a permis son rattachement au genre *Bacillus*. Ce qui nous a amené à achever son identification via des tests biochimiques moyennant des approches de la taxonomie classique par la galerie API CH50 qui a permis sa classification comme *Bacillus.anthraxis*

#### 4.4. Etude des potentialités d'application industrielle de la préparation protéasique de la souche retenue

Les enzymes, protéines complexes, étant des catalyseurs accélérant les vitesses de réaction dans des conditions douces de température et de pH, sont donc très adaptées aux transformations laitières [4;100]. D'autre part, leur spécificité d'action permet au technologue d'agir sélectivement sur un constituant du lait, sans en modifier les autres.

Les protéases alcalines sont utilisées dans la production du fromage, du petit lait avec une estimation de production mondiale de  $145 \times 10^6$  t/an [8]. A cet égard, l'utilisation des protéases alcalines dans les produits laitiers pourrait intervenir dans l'amélioration de la qualité du produit final.

Ainsi il y a un besoin clair pour ce genre d'enzyme dans le monde en général et dans notre pays en particulier vue le développement notable du secteur laitier où la consommation du lait et produit laitiers a augmenté de 2,7 million de tonne en 1990 à 3.3 millions de tonne en 2010 avec une production ne dépassant pas 1,3 milliards de litres , et la production fromagère a atteint 1540 tonne en l'an 2000 avec une consommation moyenne de 0.7 kg /personne/an [9].

La production des protéases par la cellule bactérienne peut être stimulée ou réprimée par certaines molécules. En fait, un substrat qui permet une bonne croissance végétative ne mène pas forcément à la production de grandes quantités de protéase. La production des protéases est grandement affectée par l'environnement extérieur de la cellule, dont la nature et la concentration des sources d'azote et de carbone. Il est donc nécessaire de connaître l'effet de ces facteurs sur la production des protéases alcalines afin de bien contrôler les procédés de production et de les rendre plus performant. Donc, les objectifs fixés dans cette partie sont l'optimisation de la production de la préparation enzymatique de la souche partiellement identifiée appartient au genre *Bacillus*, d'une part, et l'évaluation des performances de la préparation protéolytique extraite, d'autre part.

#### 4.5.1. Production de protéase par la S3F

La production des protéases par la souche protéolytique 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 [166;167;168].

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 [169]. 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 [170;171].

#### 4.5.1.1. Effet de différentes sources de carbone sur la production de la protéase

La production de l'enzyme a été testée sur le milieu N additionné de différentes sources de carbone : gélatine, glycérol, amidon, cellulose, saccharose, glucose, fructose, maltose à raison de 5 g/L. Le niveau de production de protéase, de la croissance de la souche S3F ainsi que le pH final de la culture ont été déterminés et l'ensemble des résultats sont consignés dans le tableau 4.7.

Tableau 4.7 : Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de la protéase.

Source de carbone	T	Gélatine	Glycérol	amidon	Saccharose	Glucose	Maltose
Activité (U/ml)	90	<b>380</b>	0	230	110	0	310
Biomasse DO <sub>600 nm</sub>	3	<b>8</b>	2,5	4,2	3,8	2	4,5
pH final	9,7	<b>7,3</b>	9,8	8,4	9,3	9,9	8,4

T : témoin sans ajout de source de carbone

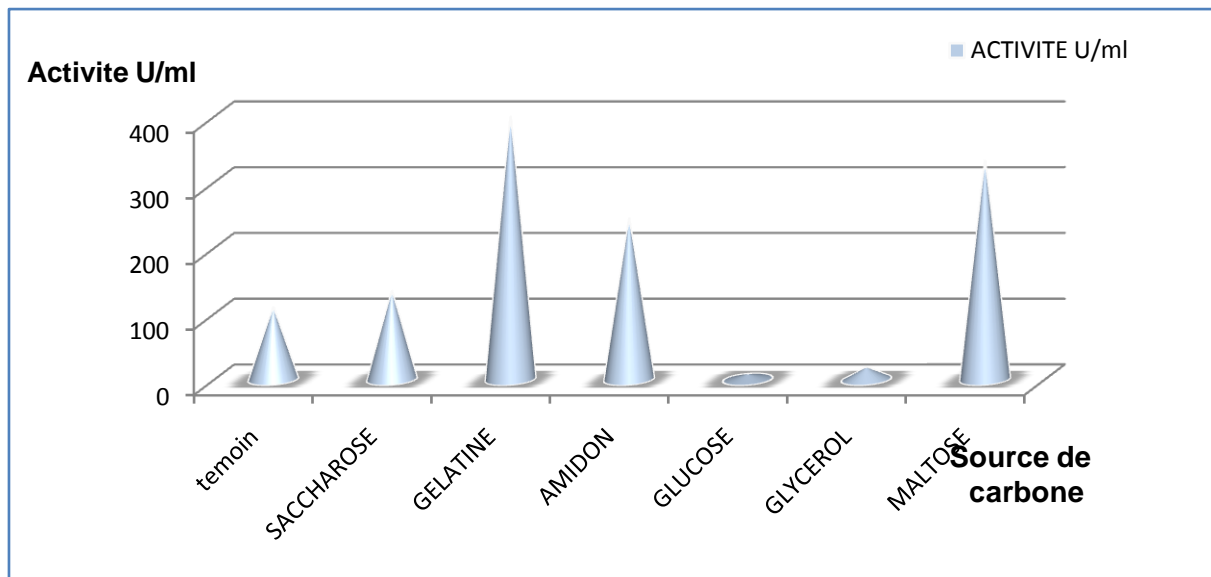


Figure 4.8 : Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de la protéase.

L'analyse des résultats présentés sur le tableau 4.7 et la figure 4.8, met en évidence une bonne croissance de la souche S3F sur les différents substrats carbonés testés. En effet, une meilleure production (environ 380 U/ml) et une croissance significative (absorbance à 600 nm de 8) sont observées sur milieu à base de gélatine. Par conséquent, la gélatine constitue la meilleure source de carbone et d'énergie la plus adéquate pour une telle production et croissance. Ce qui nous amène à supposer l'existence de substances bioactives dans la gélatine favorisant la production de la protéase.

Néanmoins, les niveaux de production sur les milieux contenant l'amidon et le maltose sont quasiment comparables et de l'ordre respectif de 230 et 310 U/ml. Le niveau de production sur le milieu contenant du saccharose, xylose est inférieur (110 U/ml). Cependant, la croissance ainsi que la production de la protéase sur les milieux contenant le glucose, glycérol sont réprimées. Des études similaires [201; 202] ont montré que les carbohydrates, incluant le glucose, répriment totalement la sécrétion de protéases.



La source de carbone utilisée pour la production des protéases est très variable. Plusieurs substrats solubles et insolubles ont été comparés. L'utilisation de l'acide oléique comme source de carbone en culture en batch d'*Aspergillus oryzae* a permis de doubler la production de protéase comparée à celle d'amidon, elle a été améliorée de 110U/ml à 230 U/ml respectivement [203]. Ceci est dû probablement à la répression catabolique exercée par les sucres libres et les oligosaccharides de faible masse moléculaire [204]. D'un autre côté, l'utilisation de l'hydrolysate protéique de soja a un effet significatif sur la production d'une protéase alcaline par *Beauveria felina* comparée avec celle par *Aspergillus oryzae* NCIM649 [205].

Les glucides agissent également comme inducteurs dans la production enzymatique comme l'amidon, maltose et le xylane. Le glucose est utilisé plus rapidement que n'importe quelle autre source de carbone et produit une plus grande variété d'intermédiaires métaboliques. Ces derniers peuvent alors agir comme répresseurs de la production enzymatique [1;206]. L'inhibition par l'effet glucose existe aussi pour la chitinase de *Streptomyces griseus*, la hyaluronidase de *Clostridium perfringens* et l'invertase de *Saccharomyces fragilis*. En effet, lors de fermentation employant le glucose comme seule source de carbone, la production des protéases commence au moment où le glucose est épuisé dans le milieu [179; 207]. Ensuite si le glucose est ajouté au milieu, la production cesse immédiatement. En revanche, le sucrose, le maltose et le xylose donnent des rendements très faibles ou nuls [179;208].

Les protéinases sont en général inhibées par la présence de sucres fermentescibles mais beaucoup d'exceptions existent : subtilisin, protéinase alcaline de *Bacillus natto*, collagénase de *Clostridium histolyticum*, gélatinase de *Bacillus amyloliquefaciens* et gélatinase de *Pseudomonas myxogenes* [209].

#### 4.5.1.2. Effet de la concentration de la gélatine sur la production de l'enzyme

Afin d'obtenir une production maximale des protéases, il est également important de fournir aux microorganismes une source de carbone adéquat car les sucres assimilables sont indispensables.

Etant donné, que la meilleure production est obtenue sur le milieu N additionné de gélatine, nous étions amenés à optimiser la concentration en gélatine (de 0 à 15 g/L) afin de déterminer la concentration optimale pour la production de la protéase sur milieu contenant : 2 g/L extrait de levure ; 1 g/L CaCl<sub>2</sub> ; 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

Le tableau 4.8 montre l'effet de la concentration de la gélatine sur la croissance bactérienne et sur la production de la protéase.

Tableau 4.8 : effet de la concentration de la gélatine sur la croissance bactérienne et sur la production de la protéase.

Concentration de Gélatine g/l	T sans ajout	5	6	7	8	9	10	12	15
Activité (U/ml)	90	100	110	330	<b>400</b>	360	310	100	80
Biomasse DO <sub>600 nm</sub>	3	3,2	4,3	7	<b>8,5</b>	8	7,5	4	3
pH final	9,7	9,3	9,3	8,4	<b>7,8</b>	7,7	7,3	7.3	7.3

Les résultats présentés sur ce tableau montrent que la croissance bactérienne et la production de la protéase augmentent avec l'augmentation de la

concentration en gélatine jusqu'à 10 g/L. En effet, l'augmentation de la production est significative pour des concentrations allant de 5 à 10 g/L et atteint un maximum de 400 U/ml à 8 g/L. Cette augmentation est accompagnée d'une diminution du pH du milieu de culture à partir d'un pH initial de 10,0. Au-delà de 8g/L on assiste à une légère diminution, pour la concentration 9 et 10 g/L, suivie par une chute considérable de l'activité enzymatique et la biomasse accompagnées par une stagnation du pH en valeur 7,3.

De fortes concentrations en source de carbone conduisent en une production excessive d'acides organiques et mènent à une réduction du pH et conséquemment à une baisse de la production de protéases alcalines [210]. D'après KUMAR et *al.* [207], dans les pratiques commerciales de production des protéases avec les *Bacillus*, il est reconnu que des grandes concentrations de source de carbone dans les milieux de culture inhibent la production des protéases. Donc, comme la concentration des substrats carbonés influent sur la performance des procédés cela tend à démontrer l'influence du rapport C/N sur la production des protéases [1]

En tenant compte du niveau de production de la protéase, une concentration initiale en gélatine de 8 g/L a été retenue pour la suite de notre travail.

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

Chez les microorganismes, l'azote organique ou inorganique est métabolisé pour produire essentiellement des acides aminés, des acides nucléiques, des protéines et certaines composantes des parois cellulaires [164]. La production de protéases alcalines dépend considérablement de la disponibilité de la source de carbone et d'azote dans le milieu de culture [1;20]. Ainsi, une série d'expériences a été réalisée pour mettre en évidence l'effet de différentes sources d'azote organique (extrait de levure, extrait de viande, urée) et inorganique (sulfate d'ammonium,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$  et chlorure d'ammonium,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) sur la croissance et la production de la protéase, la concentration a été fixée à 2 g/L, en comparaison à

une culture témoin sans source d'azote, les résultats sont consignés dans le tableau 4.9 et la figure 4.9.

Tableau 4.9 : Effet de différentes sources d'azote sur la production de l'enzyme protéolytique.

Source d'azote	Témoin Sans ajout	Extrait de levure	Extrait de viande	Urée	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{NH}_4\text{Cl}$
Activité (U/ml)	100	<b>425</b>	310	265	280	180
Biomasse $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$	2,9	<b>7</b>	6	6,5	5,6	5
pH final	8,7	<b>7,5</b>	8,3	8,9	9,1	9,7

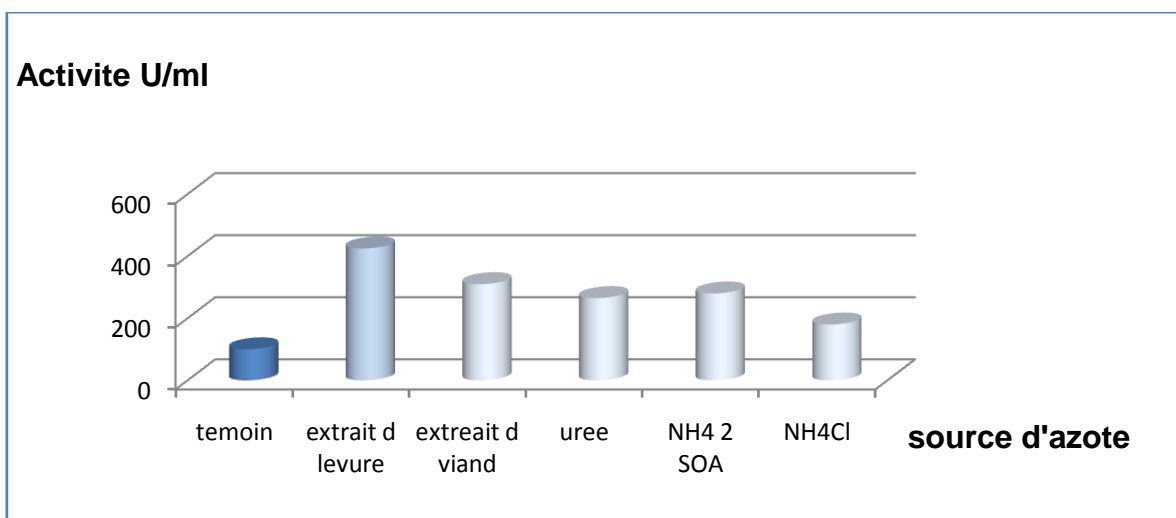


Figure 4.9: Effet de différentes sources d'azote sur la production de l'enzyme protéolytique.

L'analyse des résultats présentés sur le tableau 4.9 et la figure 4.9 montre que la meilleure production de la protéase (425 U/ml) est obtenue lorsque l'extrait de levure est utilisé comme source d'azote. Une production significative de 310 et 265 U/ml est obtenue avec l'extrait de viande et d'urée mais avec une croissance bactérienne faible. Cependant, cette production est diminuée par l'ajout du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$  et le  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Ces résultats sont néanmoins conformes avec ceux observés par MABROUKE et *al.* (2002) qui ont démontré que les ions  $\text{NH}_4^+$  inhibent la production de protéases. Des résultats similaires ont été rapportés par PATEL et *al.* (2005) concernant la répression catabolique de la production de protéases par *Bacillus sp. Ve1* par l'ammonium. Par contre, FISHER et DÉBARBOUILLÉ (2002) ont démontré que *B. licheniformis* assimile préférentiellement l'azote sous forme  $\text{NH}_4^+$ .

Les sources d'azote sont constituées habituellement dans l'industrie par l'ammoniaque et les sels ammoniacaux quoi que, en général, on obtient une croissance plus rapide en s'adressant à des sources riches en azote organique. Toutefois, certains microorganismes exigent exclusivement pour leur développement de l'azote organique dont les composés sont relativement coûteux. Les sources organiques les plus utilisées sont les farines de soja, d'arachide, et l'extrait de viande, l'extrait de malt, l'extrait de levure, le lactosérum, la caséine ainsi que des extraits enzymatiques de divers produits riches en protéines [120].

Par contre la synthèse enzymatique est parfois stimulée par des formes complexes d'azote qui peuvent ne pas stimuler la croissance par exemple la synthèse de la hyaluronidase de *Clostridium septicum* et de *Staphylococcus aureus* augmente avec la peptone et le digestat papaique du muscle de cheval, celle de la pentosanase de *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* et *Trichoderma viridae* est stimulée par la liqueur de trempage du maïs. La synthèse de protéinase de *B. subtilis* est augmentée avec le son de riz délipidé [121].

Certains auteurs mentionnent que la présence d'azote inorganique est nécessaire pour la production des protéases. Ainsi, dans un milieu à base de

caséine, l'ajout d'ion ammonium ou de nitrate en faibles concentrations stimule la production. Par contre, l'ajout de grandes quantités a un effet répresseur [179; 215]. Par contre, quelques rapports indiquent l'absence de la répression associée à l'usage de sels d'ammonium [207;216].

Plusieurs travaux ont démontré que l'utilisation de sources organiques, la production des protéases est généralement plus élevée. Par exemple, le soja est une excellente source d'azote qui permet d'obtenir une production plus élevée de protéases [207; 208 ; 216]. D'autres substrats sont également utilisés tel que caséine, peptones, l'extrait de bœuf, son de blé etc. [20;214].

A la lumière de résultats obtenus, on constate que l'extrait de levure s'avère être plus adéquat pour la production de l'enzyme protéolytique. En fait, l'extrait de levure est une source d'acides aminés et de facteurs de croissance pour la bactérie. Il contient aussi des vitamines et des cofacteurs qui sont indispensables aussi bien pour le développement de la bactérie que pour la synthèse de métabolites. Ainsi, l'extrait de levure sera utilisé comme source d'azote ci- après.

#### 4.5.1.4. Effet de la concentration d'extrait de levure sur la production de la S3F

La concentration d'extrait de levure comme source d'azote a été optimisée sur milieu N à des concentrations allant de 0 à 7 g/L (tableau 4.10).

Tableau 4.10: Effet de la concentration de l'extrait de levure sur la croissance bactérienne et sur la production de la protéase.

<i>Concentration de l'extrait de levure (G/L)</i>	0	1	2	3	4	5	6	7
Activité (U/ml)	80	100	110	230	300	<b>370</b>	310	286
Biomasse DO <sub>600 nm</sub>	3	3,4	6,3	7	8,5	<b>8,9</b>	7,5	6
pH final	9,7	9,3	9,3	8,4	8	<b>7,6</b>	7,3	7,2

L'analyse de ces résultats montre qu'il y a une faible production de la protéase en absence d'extrait de levure (80 U/ml). Cette production augmente avec la concentration en extrait de levure et atteint son maximum (370 U/ml) pour une concentration de 5 g/l. Au-delà de 5 g/L, aussi bien la croissance que la production de protéases diminue. Nous avons remarqué également une augmentation de la biomasse avec la concentration en extrait de levure jusqu'à 5 g/L. Pour le pH, nous notons également une diminution par rapport à la valeur initiale qui se stabilise en augmentant la concentration plus de 5g/L de gélatine affichant des valeurs aux alentours de 7.

Ainsi, en tenant compte de la meilleure activité enzymatique, donc la concentration, en extrait de levure de 5 g/L, a été retenue pour La suite de ce travail.

#### 4.5.1.5.Optimisation de la concentration en $\text{CaCl}_2$ , $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , $\text{KH}_2\text{PO}_4$ sur la production de la protéase

Afin de mettre en évidence l'importance du calcium, du phosphore, du potassium et d'oligoéléments, nous avons étudié l'effet des concentrations croissantes en  $\text{CaCl}_2$  (0,2 à 5 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,5 à 5 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5 à 5 g/L) sur la production de protéase par la souche étudiée (cf. Figure 4.10).

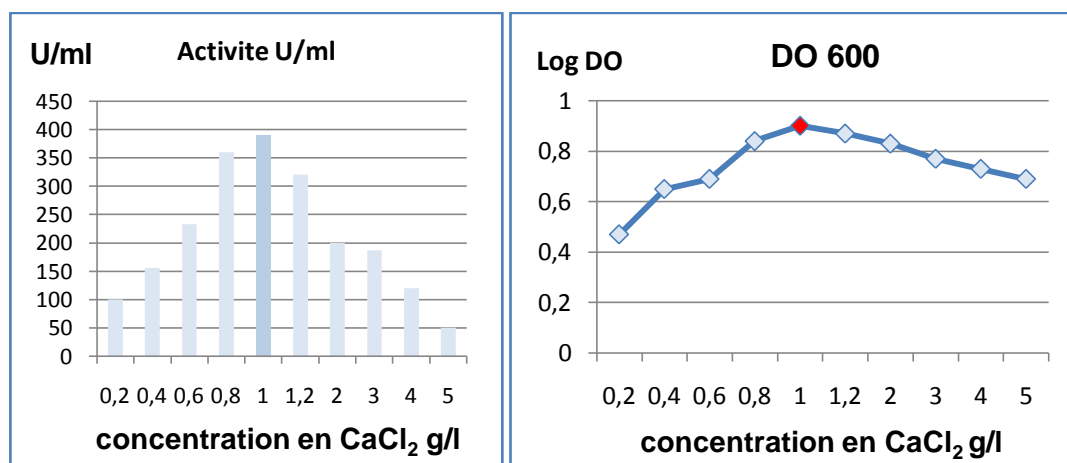


Figure 4.10: Optimisation de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  sur la production de la protéase.

L'analyse des résultats illustrés dans la figure 4.10, montre que la production de la protéase ainsi que la croissance bactérienne sont optimales pour une concentration de 1g/L en  $\text{CaCl}_2$ . Au-delà de cette concentration, le niveau de la production et la biomasse diminuent considérablement. Les ions tels que le calcium, le cobalt, le cuivre et le magnésium peuvent avoir un effet bénéfique à la fois, pour la production des protéases et la croissance des bactéries. Il a été rapporté que certains ions comme le calcium contribuent à la stabilité des enzymes [207].

La figure 4. 11 représente l'optimisation de la concentration de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sur la production de protéase par notre souche de *Bacillus anthracis* déjà identifiée.

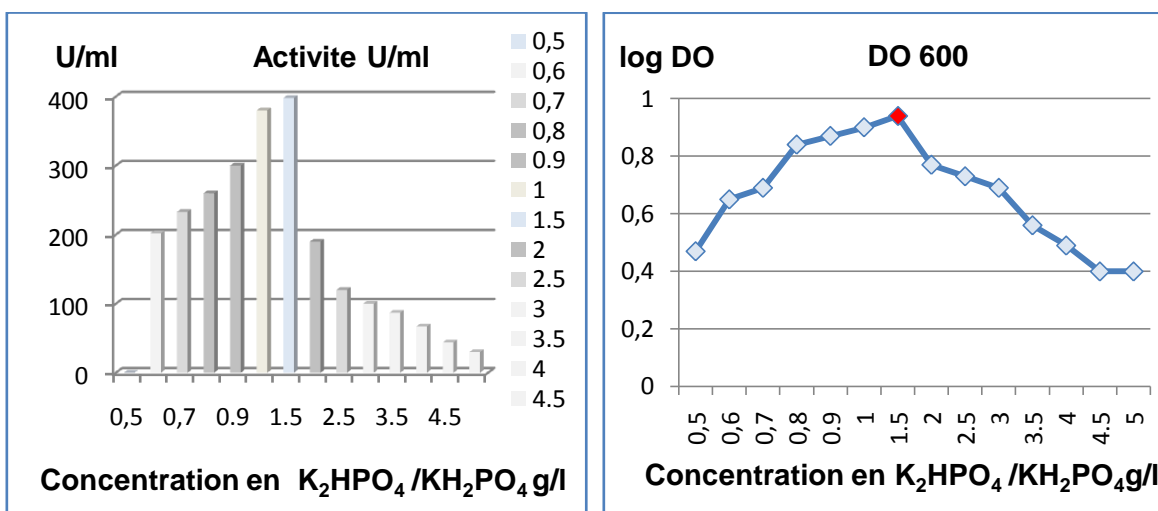


Figure 4. 11: Optimisation de la concentration de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sur la production de protéase.

Les résultats présentés dans la figure 4.11 montrent que la concentration optimale pour la croissance bactérienne et également la production de la protéase est fixée pour 1,5 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et 1,5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pour telle valeur le maximum d'activité est atteint (398 U/ml), Au-delà de cette teneur en phosphore l'activité protéolytique chute et notamment la biomasse. Ainsi, de faibles teneurs, inférieures à 0,7 g/L et des valeurs supérieures à 2,5 affectent régressivement voire inhibent la production enzymatique et de même la croissance bactérienne.



Le phosphate joue un rôle de régulation très important pour la synthèse de métabolites primaires et secondaires par les microorganismes et affecte la croissance et la production [1]. Par ailleurs, le phosphate de potassium est utilisé comme source de phosphore dans la majorité des études et peut avoir un effet tampon sur le milieu de culture comme plusieurs auteurs ont rapporté que de faibles concentrations (2 g/L) seraient optimales pour la production des protéases. En revanche, de plus grandes concentrations ont un effet inhibiteur sur la croissance et la production de protéases [207;166].

Nos résultats ont montré, que la production par la souche S3F est optimale pour les concentrations de 1 g/L en  $\text{CaCl}_2$ , de 1,5 g/L en  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et 1,5 g/L en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Au-delà de ces concentrations, le niveau de production et de biomasse diminuent.

#### 4.5.1.6. Effet de l'agitation

L'agitation assure un environnement nutritionnel et physique homogène pour toutes les cellules un tel environnement est indispensable pour une production maximale de protéases [217]. C'est dans cette optique que nous nous sommes proposé d'étudier l'effet de l'agitation sur la production de protéases et la croissance bactérienne à travers le suivi de la production dans des conditions statiques et agitées en variant le paramètre d'agitation. Les résultats sont consignés dans le tableau 4.11 et illustrés dans la figure 4.12.

Tableau 4.11: Effet de l'agitation sur la production de l'enzyme protéolytique.

Agitation (rpm)	0	200	250
Activité (U/ml)	15	<b>395</b>	276
Croissance Do 600	3,6	<b>8</b>	7
pH	9,79	<b>7,3</b>	9.48

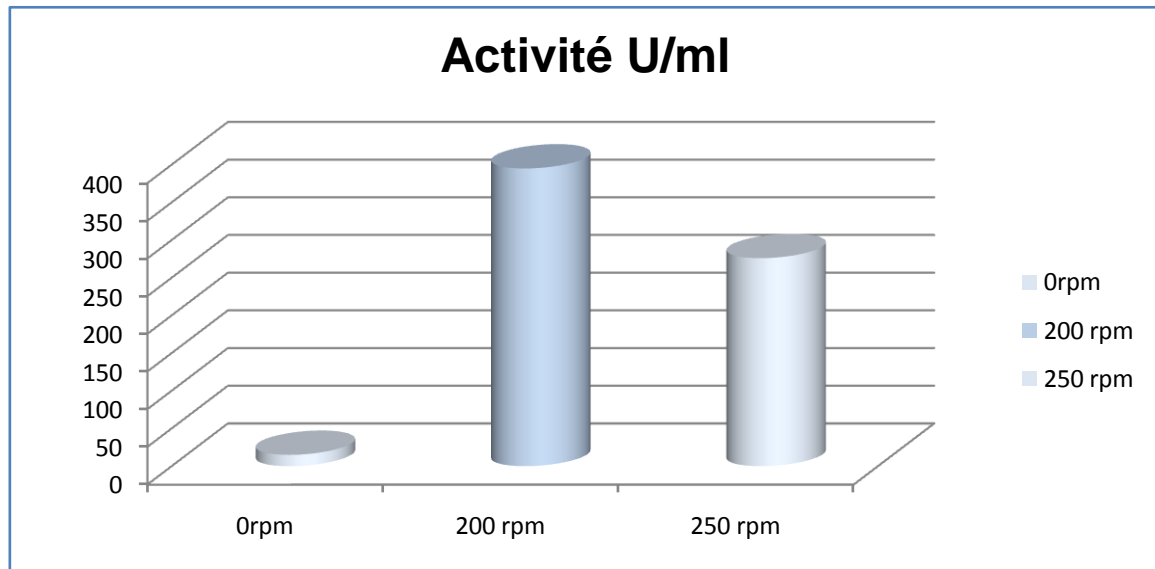


Figure 4.12: Effet de l'agitation sur la production de l'enzyme protéolytique.

Les résultats du tableau et la figure ci-dessus montrent clairement l'effet de l'agitation sur l'activité protéolytique et la croissance. En effet, dans les conditions statiques l'activité enregistrée est de l'ordre de 15 U/ml avec une densité biologique de 3,6, l'agitation a permis d'augmenter l'activité jusqu'à 395 U/ml avec une biomasse de 8 pour une lecture de densité optique à 600nm avec une diminution du pH qui est de 7,3. Cette agitation a pour but d'homogénéiser la composition et la température du milieu de culture, de répartir uniformément les bactéries et surtout d'assurer une oxygénation optimale du milieu de culture [97;165;166]. Selon CALIK et al (2004) des taux d'aération et d'agitation contrôlés et optimaux sont nécessaires afin d'assurer un transfert d'oxygène adéquat lors des fermentations.

En effet, plusieurs études ont montré que le transfert d'oxygène dans le milieu de culture est un des facteurs influençant de façon majeure la production protéasique [217;218;219;220].

L'optimisation des paramètres d'aération et d'agitation a permis d'obtenir des productions de protéases supérieures chez *B. subtilis* [219;162] et chez *B. licheniformis* [217 ; 20].

Egalement, l'agitation et l'aération peuvent avoir un effet néfaste si elles sont maintenues à un niveau élevé par rapport au besoin de la souche. En effet, il a été noté lors de plusieurs études que le maintien d'une agitation et une aération trop élevée augmente les forces de cisaillement dans le milieu de culture, ce qui peut mener à la dénaturation des protéases extracellulaires [217;220]. Selon notre cas, cet effet est enregistré lorsque le paramètre de l'agitation a été maintenu à 250 rpm, l'activité protéolytique était d'un degré moindre à celle de 200rpm.

En fin, l'étude effectuée portant sur l'optimisation des conditions et les différents constituants de milieu de production de protéases à savoir la source de carbone, la source d'azote, la concentration de  $\text{CaCl}_2$  et les tampons et l'agitation, nous a permis de déterminer le milieu optimisé dit « **M** » contenant (g/L) : 8 de gélatine, 5 d'extrait de levure, 1 de  $\text{CaCl}_2$ , 1,5 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et 1,5 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pour une agitation optimale de 200 rpm.

#### 4.5.2 Cinétique de production de la protéase de la souche S3F

La production de la protéase a été réalisée dans un erlenmeyer de 500 ml avec un volume fonctionnel de 50 ml sur milieu **M** optimisé (température de 37 °C et sous une agitation de 200 rpm). Des prélèvements réguliers ont été effectués et la croissance bactérienne (DO à 600 nm) ainsi que l'activité protéolytique (U/ml) ont été déterminées (figure 4.13)

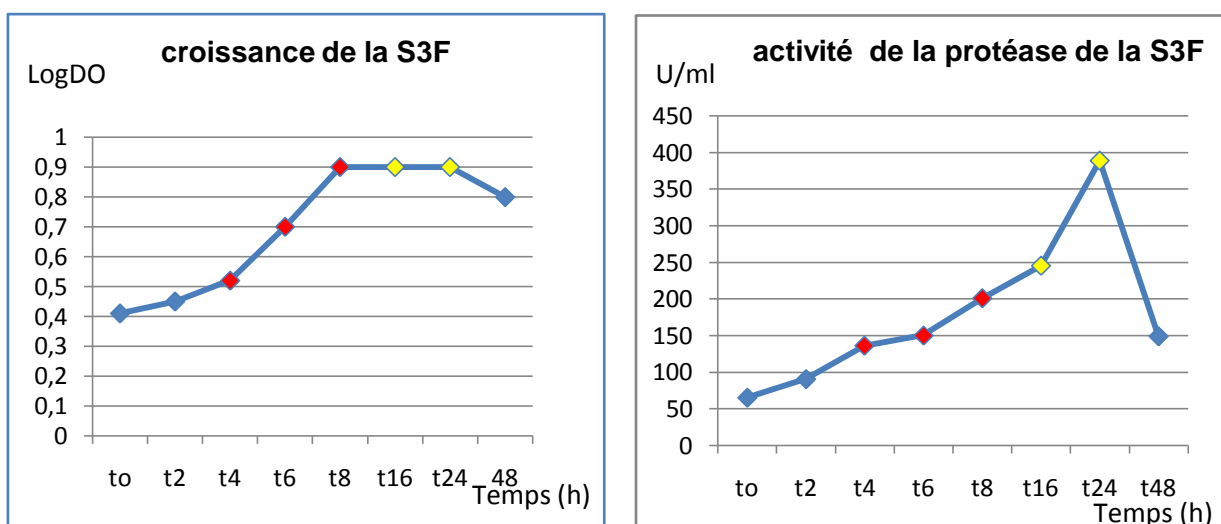


Figure 4.13: Cinétique de la croissance et suivie de l'activité protéasique de la S3F

Le suivi de la production de protéase et la croissance bactérienne en fonction du temps montre que la sécrétion de la protéase commence après une phase de latence de 4h dans laquelle la bactérie subit une adaptation. En effet, lors de l'inoculation du milieu neuf, les cellules ne se multiplient pas immédiatement, ces cellules sont actives et procèdent à la synthèse de nouveaux cellulaires de façon à s'adapter au nouveau milieu sans toutefois se multiplier, la durée de la phase de latence varie en fonction de plusieurs paramètres :

- composition du milieu : absence d'un élément nécessaire à la croissance ; présence d'inhibiteurs ;
- L'âge des bactéries : la phase de latence est beaucoup plus courte pour des bactéries jeunes que pour des bactéries âgées
- Le volume d'inoculum: lorsque celui-ci est important, il y a coopération entre les cellules et le temps de latence est réduit. [164].

La croissance évolue rapidement par la suite et atteint son maximum après 8h de culture ce qui correspond à la fin de la phase exponentielle pour laquelle la multiplication s'effectue à vitesse constante est maximale [164]. Le taux de croissance de la S3F est de l'ordre de 0.31 division/h et le temps de génération est de 3h15 min, les facteurs agissant sur cette phase sont : la température, le pH., la disponibilité en eau et le substrat, plus l'affinité de la bactérie pour le substrat est grande plus la vitesse de croissance est élevée [165]. Au-delà de cette période, nous avons assisté à une stagnation de la croissance bactérienne, c'est la phase stationnaire qui commence au moment où les nutriments essentielles du milieu s'épuisent et s'initier la sporulation et la libération dans le milieu des métabolites secondaire comme des antibiotiques, des toxines ..., [165;164]. A ce stade, l'activité évolue rapidement et atteint son maximum d'activité (389 U/ml) après 24h de culture ce qui correspond à la phase de déclin, en suite la production enzymatique diminue considérablement jusqu'à atteindre 148,76 U/ml après 48h d'incubation. Cette diminution est probablement due soit à une instabilité de l'enzyme, soit à une auto-dégradation ou à l'action protéolytique d'autres protéases de types cathepsines libérées lors de la sporulation.

Les travaux de BEG et *al.* (2002) [221] et de PURI et *al.* (2002) [206] suggèrent que la production des protéases diminue lorsque la concentration en nutriments devient un facteur limitant. Egalement la diminution de l'activité protéolytique a été expliquée par CHU et *al.* (1992) [222] par une désactivation causée par le phénomène d'autodigestion ou par la digestion des protéases extracellulaires par certaines protéases intracellulaires larguées dans le milieu suite à la lyse cellulaire à la fin du phénomène de sporulation.

La figure 4.13 montre que le nombre de microorganismes augmentent rapidement de façon exponentielle et atteint par la suite une phase stationnaire après 8h de culture. La composition du milieu ne semble donc pas influencer la reproduction des microorganismes alors qu'elle influencerait sur la synthèse de protéases.

Selon GUPTA et *al.*(2002) [1] la synthèse des enzymes est reliée aux différentes phases de développement de la culture microbienne mais elle s'exprime de façon différente selon les souches étudiées. Ainsi, certains microorganismes produisent leurs protéases extracellulaires durant la phase logarithmique de leur croissance alors que d'autres comme *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* en produisent plutôt dans la phase stationnaire [208;207; 209].

Durant la phase exponentielle, la cellule croit aux dépens de substrats les plus facilement assimilables comme les sucres. Par contre au début de la phase stationnaire les nutriments s'épuisent et les déchets métaboliques s'accumulent. La production des protéases s'enclenche donc en réponse au stress causé par une limitation des nutriments et à des conditions de croissance qui deviennent difficiles [1; 208].

Nos résultats montrent que cette souche de *Bacillus anthracis* atteint les maximums de production de protéases après 16h de culture donc vers la fin de la phase exponentielle et au cours de la phase stationnaire où l'activité a enregistré

les valeurs de 200,44 et 389 U/ml respectivement. A ce stade, les cellules entrent en phase de sporulation. Plusieurs auteurs ont rapporté que l'initiation simultanée de la production de protéase et de la phase de sporulation suggère une relation entre les deux mécanismes [221 ; 1; 207 ; 20]. En effet, l'initiation de la sporulation et la production de protéases ne seraient pas directement liées mais quelques mécanismes communs seraient impliqués dans la régulation des deux événements. Ainsi, certains étapes de la synthèse et de l'excrétion des protéases ainsi que de la sporulation seraient parallèlement inductibles. Ces mécanismes pourraient aussi être communément stimulés sous certaines conditions ou en présence de certaines molécules, tout en étant sujets à la répression catabolique par des composés facilement assimilables. [1 ; 207 ; 208].

#### 4.5.2. Étude de l'aptitude technologique de la préparation enzymatique

Les caractéristiques intéressantes de la préparation enzymatique étudiée, à savoir une bonne activité et stabilité nous permettent de postuler que cette enzyme est convenable pour une application en fromagerie. Afin de confirmer ceci, une étude a été menée portant sur l'aptitude de la coagulation de lait par la préparation protéasique de la souche bactérienne sélectionnée.

L'aptitude à la coagulation du lait est sa capacité à donner après action de la présure, un coagulum à caractère rhéologique précis, sans perte lors de l'égouttage. En effet, certains laits coagulent lentement, forment des gels mous qui tendent à se fragmenter, donnant des caillés humides dont l'affinage est difficile à maîtriser [142].

L'aptitude du lait à la coagulation dépend de certaines caractéristiques, telles que la composition chimique du lait et notamment sa richesse en caséines et leurs dimensions et la composition minérale du lait (rapports faibles C/N et P/N) et le paramètre le plus important est les caractéristiques du coagulum utilisé [138 ; 4 ; 177].

Différents coagulants sont disponibles sur le marché. Outre de la présure animale, se trouvent des enzymes microbiennes obtenues par la fermentation d'un microorganisme. [8]. Chaque coagulant possède ses propres caractéristiques de sensibilité au pH, à la température, aux ions calcium. Si certains peuvent techniquement être utilisés sur tous types de fromages, d'autres sont plus spécialement réservés à certains types de fabrications [8; 138].

Les études menées sur la coagulation par les protéases microbiennes ont porté sur la comparaison des fromages affinés (cheddar, emmental, camembert) produits avec les protéases microbiennes à ceux préparés par la présure ou autres enzymes coagulantes [8 ; 127; 133]. Les moyens de contrôle sont généralement les paramètres de coagulation à savoir l'activité coagulante, le temps de coagulation, le temps de floculation la vitesse de raffermissement du gel, sa fermeté maximale et enfin la vitesse et l'importance de la synérèse. et le rendement fromager [4;199].

Pour notre étude nous nous sommes proposés la caractérisation de l'activité coagulante de la préparation enzymatique extraite tout en comparant avec celle de la présure commerciale.

#### 4.5.2.1. Caractéristiques des produits

Tableau 4.12 : Caractéristiques physico-chimiques des produits.

Composition	Valeur	Méthode [223]
Humidité (lait reconstitué) %	88.38	Dessiccation à 105°C
Extrait sec total%	11,62	
Acidité (°D)	17.83	Volumétrie
pH	6.41	pH mètre
Humidité (poudre de lait) %	5.33	Dessiccation à 105°C
Extrait sec total %	94,67	

Le lait utilisé est un lait préparé à raison de 10% (p/v) dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  0.01 M à partir d'une poudre de lait écrémé. Ce lait présente un taux d'humidité de 88.38% ce qui correspond à un extrait sec totale de l'ordre de 11,62%. Pour la poudre de lait, ces deux paramètres sont de l'ordre de 5,33% et 94,67% respectivement. L'humidité désigne la quantité de l'eau présente dans le produit, au dessus de 4% max qui est une valeur exprimée par les services de normalisation à savoir AFNOR (1997), le transfert des facteurs catalytiques est facilité, le résultat de la détermination de l'humidité de la poudre de lait donne une valeur légèrement supérieure à la norme ce qui est expliquée par un stockage dans un endroit relativement humide, cela a donné un extrait sec total inférieur à ce que est préconisé par la même norme dont la valeur est fixée entre 96-98%. L'extrait sec signifie la richesse du lait en matières sèches et parmi les protéines dont la caséine qui est un paramètre important dans la coagulation.



Le pH et l'acidité du lait sont conformes à ceux donnés par la norme qui sont de 6,15-6,75 pour le pH ,15-18° Dornic pour l'acidité. Mais le pH nécessite un ajustement à 6,5 pour déterminer l'activité coagulante [172].

#### 4.5.2.2. Détermination de l'activité coagulante

La coagulation est la transformation du lait liquide en un gel appelé aussi coagulum ou caillé qui après un certain nombre de transformation deviendra fromage. Le processus de la coagulation est provoqué par l'action d'un coagulant, ajouté à un taux bien défini au lait de fabrication, lui-même à une température et pH précis [8]. Au point de vue technologique ,les enzymes coagulantes doivent répondre a certains nombres de conditions dont la plus importante est d'avoir une activité coagulante dans les conditions habituel de la fromagerie ainsi qu'un rendement fromager identique a celui de la présure [8 ;143 ;199]. Les résultats de mesures de l'activité coagulantes de l'extrait enzymatique de la S3F sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4.13 : Activité coagulante (UP) et force coagulante (F) des 2 préparations enzymatiques

Préparation enzymatique	Unité présure (UP)	Force coagulante (F)
La présure commerciale	0.149	33,11
La préparation de la S3F	0.156	34,44

L'unité d'activité coagulante représente la quantité d'enzyme contenue dans 1ml de la solution enzymatique, qui peut coaguler 10ml de lait en 100sec à 30°C, L'activité coagulante exprimée par le nombre d'unités de présure (UP)et la force coagulante (F) correspondante, sont très proches entre les deux préparations, notons que la présure bovine possède une force coagulante faible

par rapport à celle de la souche S3F cela est peut être dû à l'origine de la protéase (animale et microbienne) et l'âge de l'animale dont elle est extraite la présure.

Selon ALAIS et CHAMBA [198], les protéases microbiennes marquent des forces coagulantes identiques voire supérieures à celles des présures animales.

Par ailleurs, la présure bovine extraite à partir de la caillette de veaux renferme 80% de chymosine (E.C.3.4.23.3). La sécrétion de la chymosine diminue au cours de la croissance de l'animal (toutes espèces confondues) au profit de la pepsine (E.C.3.4.23.1) et s'arrête presque totalement après sevrage ce qui nécessite l'emploi de la chymosine avec la pepsine pour la renforcer [226].

En fromagerie, on cherche toujours à ce que les enzymes coagulantes aient une activité protéolytique faible comparativement à l'activité coagulante [226;4]. Par conséquent la protéase de la S3F semble mieux indiquée. Puisque à pH 4,5 le rapport d'activité protéolytique/activité coagulante de la S3F (2,32) est faible par rapport à celui de la présure (5,43).

#### 4.5.2.3. Détermination de temps de floculation

Tableau 4.14 : Temps de floculation (tf) des 2 préparations enzymatiques.

	Extrait de S3F solution mère	Extrait de S3F Dilution	Extrait de la présure Solution mère	Extrait de la présure Dilution
Temps de floculation (sec)	41,25	849	30,33	865

Nous pouvons remarquer que l'extrait de la souche S3F, donne un temps de floculation à 30°C d'environ 41 sec. La dilution dans de l'eau distillée à raison de 1.65 % (v/v), donne un temps de floculation d'environ 14 min.

Nous avons choisi ce taux de dilution après plusieurs essais, pour obtenir un temps de floculation compris entre 12 et 15min comme indiqué par ALAIS et CHAMBA, [198] ;CHAMBA et *al.* [133].

La solution mère de la poudre de présure donne un temps de floculation d'environ 30sec, la dilution nécessaire pour obtenir le même temps de floculation que La S3F (12 à 15min), est de 2% (v/v) à partir de la solution mère. Donc comparativement avec la préparation enzymatique de la souche S3F, le temps de floculation de la présure commerciale est plus court avec 21 secondes d'écart. Toute fois ce paramètre étudié de la S3F reste voisin de celui de la présure. Dans la pratique, le temps de floculation est une partie du temps de coagulation total .Ce dernier désigne le temps qui s'écoule depuis l'addition d'enzyme coagulant jusqu'au tranchage du coagulum formé. La durée du temps de floculation influence celle de la coagulation, à son tour, la durée totale du processus de transformation du lait [194;226;225]. Pour la coagulation présure, le temps de prise représente généralement environ le double du temps de floculation ; ainsi pour un temps de coagulation compris entre 12 et 15 min, le temps de prise est compris entre 25 et 30 minutes. [194;226].

En fin, les résultats de deux paramètres technologiques étudiés de la préparation protéolytique de la souche *Bacillus anthracis* montrent qu'ils sont voisins de ceux de la présure.

#### 4.5.2.4. Fabrication des fromages

La possibilité d'utiliser l'extrait coagulant de la souche S3F dans le but de coaguler le lait de vache est confirmée à travers cette expérience, puisque nous avons pu obtenir un coagulum qui a permis l'obtention, après égouttage, d'un caille d'une consistance un peu mou nécessitant un ajustement des techniques de production mais cette consistance reste acceptable puisque l'extrait sec total est

proche de celui obtenu par la présure .Le lactosérum recueilli présente une coloration jaunâtre ,ce qui est probablement dû à sa charge plus élevée en constituants biochimiques non retenus dans le caillé .

En effet, pour la fabrication de fromage à l'aide de la présure, à partir d'un litre de lait dont la masse volumique est de  $1.011\text{g.l}^{-1}$  et sa matière sèche de  $151\text{g.l}^{-1}$  403 g de fromage frais sont obtenus, avec un extrait sec total de 257,5 g.kg-1. Les rendements fromagers bruts (RBR) et en extrait sec total (RMS) sont de 39,9% et 68,7%.

Avec l'extrait enzymatique de *Bacillus anthracis*, seulement 377 g de fromage sont fabriqués avec un extrait sec total de 237,5 g.kg-1. Les rendements RBR et RMS sont respectivement de 37,3% et 59,3%.

L'humidité du fromage est conforme à ceux données par les différents auteurs [194;225;173] dont les valeurs sont situées entre 70-80 % .Egalement, l'extrait sec totale du fromage (25,75 ; 23,75%,) est conforme au données bibliographiques qui sont comprises entre 22 et 30 %. Selon MAHAUT (2003), l'extrait sec total minimum du fromage est à 30%.

En comparant les rendements fromagers ,nous constatons que la fabrication de fromage par présure donne des rendements plus élevés que ceux de la fabrique par l'extrait protéasique de la souche S3F .avec des écarts de 2,6% et 9.4% de rendements fromagers brut et en extraits sec total respectivement.

Toute fois, la préparation enzymatique de la souche de *Bacillus anthracis* isolée présente des propriétés technologiques proches de ceux de la présure .Afin de les rendre identiques de ces derniers, des ajustements techniques sont obligatoires tel que l'ajout de calcium, optimisation du couple température et pH de

coagulation, la dose de l'extrait enzymatique . Cela nécessite d'abord une purification de l'enzyme en question, sa caractérisation biochimique et moléculaire et l'élaboration d'une application plus approfondie jusqu'à la fin de l'affinage.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Actuellement, 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 de coagulation et celles impliquées dans l'affinage des fromages issues des microorganismes forment le groupe d'enzyme le plus recherché grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la rentabilité et la facilité de l'obtention. La sélection de nouvelles protéases pourrait soit conduire à de nouvelles applications biotechnologiques, soit à une amélioration des performances des enzymes existantes.

La première partie de ce travail a porté sur l'isolement et le criblage de souches bactériennes protéolytiques produisant des enzymes actives et stables à des pH alcalins. En effet, nous avons obtenu 135 souches nouvellement isolées à partir de différents biotopes Algérien et criblé 12 souches protéolytiques dont la souche «S3F» a été retenue puisqu'elle produit une ou plusieurs protéases actives sur une large gamme de pH allant de 5 à 9. Cette souche a été phénotypiquement identifiée et rattachée au genre *Bacillus anthracis*.

La deuxième partie de ce travail a été focalisée sur l'étude des potentialités d'une application industrielle de la protéase produite par la souche retenue en essayant d'améliorer le niveau de production de l'activité protéasique en premier lieu, et en second lieu, nous avons testé l'aptitude de la coagulation du lait par la préparation enzymatique de la souche de *Bacillus* étudiée d'où nous avons déterminé un milieu de production de protéases optimisé M, et d'après les résultats obtenus, la souche S3F s'avère être très intéressante pour une éventuelle application industrielle. Puisqu'elle a présenté une forte activité coagulante (Force coagulante est de 34,44) voisine de celle enregistrée avec la présure (Force coagulante est de 33,66), et un temps de floculation (14 min) qui

s'inscrire dans la gamme du temps de prise de la présure avec des rendements fromagers très acceptables : le rendement fromager bruts (RBR) et en extrait sec total (RMS) sont de 37,3% et 59,3% respectivement comparés à ceux obtenus par la présure qui sont 39,9% et 68,7%.

En guise de perspective, nous envisageons de poursuivre l'étude par :

- L'identification biologique et moléculaire de la souche performante S3F.
- L'extraction, la purification et la caractérisation biochimique de la protéase (masse moléculaire, le séquençage en acides aminés N-terminaux, la stabilité thermique et dans une large gamme de pH, la stabilité en présence de solvants organiques et l'effet des paramètres physico-chimiques sur l'activité optimale de l'extrait protéique purifié).
- Cloner le gène codant pour cette protéase en vue de le faire exprimer dans un système homologue ou hétérologue et améliorer ainsi le niveau de production de l'enzyme.
- Réaliser une étude très approfondie de l'aptitude d'application industrielle de la protéase S3F en l'employant comme agent de coagulation et d'affinage des fromages.

## APPENDICE A

### Liste des symboles

CBS	: centre de biotechnologie de Sfax
Conc	: concentration
Da	: dalton
DFP	: diisopropylfluoro phosphate
DO	: densité Optique
DO <sub>280</sub>	: absorbance à 280 nm correspond à l'activité protéolytique
DO <sub>600</sub>	: absorbance à 600 nm correspond à la croissance bactérienne
EC	: enzyme commission
EDTA	: ethyldiamine tétra acétique
EGTA	: N-tétra-acétique
F	: force coagulante
GC	: guanine-cytosine.
GNL	: gélose nutritive au lait
KDa	: kilo dalton
LAS	: alkylbenzène Sulfonate Linéaire
LB	: milieu Luria Bertani
LBT	: laiterie de Beni tamou
LEMP	: laboratoire d'enzymologie et métabolites des procaryotes
M	: métal
MM	: masse moléculaire
NC-IUBMB	: Comité de Nomenclature -Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire.
NEM	: N-éthylmaleimide
RBR	: rendement fromager brut
RMS	: rendement fromager en matière sèche
PMSF	: phénylméthyl sulphonyl fluoride
TCA	: acide trichloroacétique
U	: unknown
UI	: unité internationale



UP	: unité présure
X	: dans les formules signifie la multiplication
pCMB	: p-chloromercuribenzoate
rpm	: résolution par minute.
t	: tonne
tf	: temps de floculation
tpm	: tour par minute
v/v	: volume/volume
w/v	: poids/volume

## APPENDICE B

### Études moléculaires de la AB1

#### 1. Identification en utilisant la galerie API ZYM

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

#### 2. Identification par séquençage de l'ARNr 16S

L'étude moléculaire a été achevée suite à l'amplification par PCR du gène d'ARNr 16S en utilisant l'ADNg de la souche X (AB1) et des amorces nucléotidiques ; Oligo D-73 et Oligo R-74 dont les séquences appartiennent aux régions conservées flanquant ce gène, respectivement de 8 à 27 et de 1541 à 1525 de l'opéron d'ARNr chez *E. coli* (**tableau 1**). En plus des deux amorces nucléotidiques internes ; Oligo D-156 et Oligo R-157 (**tableau 1**). Les fragments PCR de tailles attendues sont purifiés puis clonés et leurs séquences nucléotidiques sont déterminées.

**Tableau 1** : Les séquences des différents oligonucléotides utilisés dans cette étude pour les amplifications du gène de l'ARNr 16S de la souche d'Actinomycète : AB1.

<u>OLIGO- NUCLEOTIDE</u>	<u>SEQUENCES D'OLIGONUCLEOTIDE</u>	<u>TAILLE (PB)</u>	<u>TM (°C)</u>
<b>Oligo D-S73</b>	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG <sup>3'</sup>	20	48
<b>Oligo R-S74</b>	5'AAGGAGGTGATCCAAGCC <sup>3'</sup>	18	51
<b>Oligo D-S156</b>	5'ATTCCACGTGTAGCGGTG <sup>3'</sup>	18	52
<b>Oligo R-S157</b>	5'ATCTCACGACACGAGCTG <sup>3'</sup>	18	52

### 3. Méthodes de base de biologie moléculaire

#### **3.1 Extraction de l'ADN chromosomique ou génomique (ADNg) à partir de la souche d'Actinomycète AB1**

Un clone isolé sur boîte est mis en culture (250 rpm, 45 °C) pendant une nuit dans 100 ml de milieu appropriée (Milieu ISP2 : extrait de levure 4 g/l, extrait de malt 10 g/l et glucose 4 g/l à pH 7.2). Le lendemain, nous centrifugeons dans un tube NALGENE pendant 10 min à 8000 × g. Le culot cellulaire est lavé avec 10 ml de tampon I (50 mM glucose anhydre ; 25 mM Tris-base et 10 mM EDTA à pH 8,0). Les cellules sont alors lysées dans 20 ml de tampon I contenant 5 mg/ml de lysozyme et sont incubées une heure à 37 °C. La solution est alors centrifugée à 8000 × g pendant 15 min à 4 °C et le culot cellulaire est resuspendu dans 30 ml de tampon II (10 mM Tris-base ; 100 mM NaCl ; 5 mM EDTA et 1% du dodécyl sulfate de sodium (SDS) à pH 8,0). Au surnageant on ajoute 30 ml de phénol/chloroforme (v/v) et après centrifugation pendant 20 min à 8000 × g on ajoute 2,5 V d'éthanol absolu et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2.

On récupère à l'aide d'une pipette Pasteur effilée les filaments d'ADN apparus puis on remet en solution les filaments dans 2 ml de TE 1× [100 mM Tris-base et 10 mM EDTA à pH 8,0]. On centrifuge ensuite la solution restante pendant 15 min à 10000 × g, le précipité est resuspendu dans 6 ml de TE 1× contenant 10 mg/ml de RNase A et incubé à 37 °C pendant 1 à 2 h. Puis on ajoute de la protéinase K à une concentration finale de 5 mg/ml et on incube la solution à 50 °C pendant 2 à 3 h. Après une extraction avec 1 volume de phénol suivie d'une autre extraction par 1 volume égal de phénol/chloroforme puis une dernière extraction avec 1 volume de chloroforme, la solution est précipitée avec 2 volumes d'éthanol 100% et 10% de chlorure de sodium 5 M ou d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et laissée au moins 2 h à -20 °C ou gardée 15 min à -80 °C. La solution est alors centrifugée à 12000 × g pendant 15 min et le précipité est lavé avec une solution d'éthanol 70% et séché à température ambiante pendant environ 15 min. Enfin, le précipité est resuspendu dans 50 µl d'eau MilliQ ou de TE 1× et conserver à -20 °C.

### 3.2 Préparation d'ADN plasmidique (ADNp)

La méthode de lyse alcaline a été choisie pour la préparation et la purification d'ADNp. Une mini-préparation d'ADN (3 ml) lors de la sélection de transformants après un clonage et une midi-préparation (20 ml) ou une maxi-préparation (100 ml) nous permet de purifier un ADN de meilleure qualité et en plus grande quantité, utilisée par exemple pour le séquençage ou pour un clonage.

Le principe des midi- ou des maxi-préparations demeure le même que celui des mini-préparations. Le protocole utilisé est une modification de la technique de lyse alcaline. En effet, pour, Un clone isolé sur boîte est mis en culture pendant une nuit dans 3 ml de milieu LB contenant l'antibiotique choisi, le plus souvent 100 µg/ml d'ampicilline (dans le cas des vecteurs pCR-Blunt et pCR2.1, nous avons utilisé 50 µg/ml de kanamycine). Le lendemain, nous centrifugeons dans un tube (« Eppendorf ») 1,5 ml de culture à 12000 × g pendant 15 min. Les cellules sont resuspendues dans 100 µl de solution I [45 ml glucose 20% ; 25 ml Tris-HCl 1 M et 20 ml EDTA 0,5 M à pH 8,0], puis bien homogénéisées. Les cellules sont alors lysées pendant 15 min avec 200 µl d'une solution de NaOH 0,2 N contenant 1% SDS (p/v) (Solution II). On ajoute immédiatement 150 µl d'acétate de potassium 3 M et d'acide acétique glacial 2 M à pH 4,8 (Solution III) et les cellules sont incubées 10 min dans un bain de glace. Le mélange est alors centrifugé à 12000 × g pendant 10 min à 4 °C et on ajoute au surnageant obtenu 0,6 volume d'isopropanol. Le précipité se forme au bout de 10 min à température ambiante. Après une centrifugation à 12000 × g pendant 10 min, le précipité est resuspendu dans 100 µl TE 1× contenant 10 mg/ml de RNase A et incubé à 37 °C pendant 1 à 2 h. La protéinase K est alors ajoutée au mélange à une concentration finale de 5 mg/ml et incubé à 50 °C pendant 2 à 3 h 30. Après une extraction au solvant organique (phénol/chloroforme), la solution est précipitée avec 2 volumes d'éthanol 100% et 10% de NaCl 5 M ou d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et laissée au moins 2 h à -20 °C ou gardée 15 min à -80 °C. La solution est alors centrifugé à 12000 × g pendant 15 min et le précipité est lavé avec une solution d'éthanol 70% et séchée à température ambiante pendant environ 15 min. Enfin, le précipité est resuspendu dans 50 µl d'eau MilliQ ou de TE 1× et conservé à -20 °C.

### 3.3 Électrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique permet de séparer les fragments d'ADN selon leurs tailles. L'électrophorèse d'ADN est réalisée sur gels d'agarose à des concentrations variables. Nous avons le plus souvent utilisé des gels à 1% d'agarose. L'agarose est fondu dans un tampon à pH 8,0 [TAE 1× (40 mM Tris-acétate et 5 mM EDTA) ou TBE 1× (90 mM Tris-borate et 20 mM EDTA)], auquel on ajoute du bromure d'éthidium (BET) à une concentration finale de 0,5 µg/ml. La migration se fait dans un champ électrique à voltage constant. Le BET est un agent intercalant de l'ADN qui fluoresce quand il est excité par des rayons U.V. à 254 ou 365 à nm. Il permet donc de détecter au moyen d'un transilluminateur la présence d'ADN. Afin de déterminer la taille de l'ADN, il est nécessaire de faire migrer en même temps que les échantillons un marqueur de taille.

### 3.4 Dosage de l'ADN

Selon la pureté de l'échantillon, la quantité d'ADN peut être déterminée soit par spectrophotométrie, soit par estimation de la concentration après électrophorèse sur gel d'agarose.

#### 3.4.1 Méthode spectrophotométrique

La lecture des densités optiques est effectuée à 280 nm et à 260 nm. Une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 microg/ml d'ADN double brin. La pureté de l'ADN est estimée par le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$ . Ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2. Quand la valeur est < 1,8, les solutions sont considérées comme étant contaminées par des protéines.

#### 3.4.2 Méthode utilisant la fluorescence émise par le BET (méthode empirique)

L'intensité de la fluorescence émise par les molécules de BET intercalées au sein de l'ADN est proportionnelle à la masse totale de ce dernier. Ainsi, la quantité d'ADN présente dans l'échantillon est estimée par comparaison de la fluorescence de l'échantillon et celle d'une gamme de concentration connue après électrophorèse sur gel d'agarose.

### 3.5 Restrictions enzymatiques

La digestion de l'ADN par une ou plusieurs endonucléases de restriction est menée en microtubes et se fait selon les instructions du fournisseur. Le mélange réactionnel contenant la solution d'ADN, le tampon adéquat et l'enzyme de restriction (généralement à raison de 2 à 5 U/micro g d'ADN), est incubé à 30 ou 37 °C selon l'enzyme utilisée. La durée des réactions est variable et dépend par exemple de la quantité et de la qualité de l'ADN à digérer et de la quantité d'endonucléases de restriction en solution. Nous suivons l'avancement de la réaction de digestion par migration d'un faible volume de la réaction sur gel d'agarose après différents temps de réaction.

### 3.6 Purification de fragments d'ADN par des kits

La purification de fragment d'ADN a été réalisée en utilisant les kits : (« QIAquick PCR purification kit ») ou (« GFX PCR DNA ») et le (« QIAquick gel extraction kit ») ou (« Gel Band Purification Kit ») (Qiagen, Bâle, Suisse et Amersham Biosciences, France), le premier purifiant un fragment (ou produit) de PCR directement et le deuxième purifiant un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose. Le principe est le même sauf que dans le cas de l'extraction de l'ADN séparé sur gel, il faut dissoudre l'agarose pour pouvoir purifier l'ADN. La solution d'ADN à purifier est donc chargée dans une colonne de silice en présence de grandes quantités de sels. L'ADN est retenu et les contaminants sont élués directement. La colonne est ensuite lavée afin d'éliminer toutes impuretés et l'ADN pur est élué avec une solution de Tris-HCl 10 mM à pH 8,5 ou de l'eau MilliQ. Le volume élué est de 30 à 50 µl.

### 3.7 Clonage

Le clonage se déroule en deux étapes. La première étape est la ligation entre le gène d'intérêt et un vecteur digérés auparavant qui aboutit à la formation d'une molécule recombinée et la deuxième est la propagation, la multiplication de cette molécule à travers la transformation d'un hôte, le plus souvent *E. coli*.

### 3.7.1 Ligation

Nous avons réalisé deux types de ligatures, la première utilisant des extrémités franches (c'est le cas du clonage de produit PCR) et la seconde utilisant des extrémités cohésives libérées par restriction enzymatique. Dans les deux cas, le vecteur préalablement digéré avec l'endonucléase de restriction choisie est soumis à une déphosphorylation avec une phosphatase alcaline thermosensible, d'intestin de veau nommée CIAP, (Gibco BRL, Rockville, Etats-Unis) pour éviter que le vecteur vide ne se recircularise pas lors de l'étape de ligation. Pour le clonage de produit PCR, nous avons utilisé le vecteur pCR2.1. En parallèle, le fragment d'ADN à cloner est préparé pour la ligation. Dans les autres cas, des plasmides sont digérés avec l'endonucléase de restriction de choix pour libérer le fragment d'ADN à cloner, qui sera purifié après électrophorèse en réalisant l'extraction de la bande d'intérêt du gel d'agarose. Afin de réaliser la réaction de ligation, les concentrations du fragment d'ADN et du vecteur sont déterminées le plus souvent par estimation sur gel après migration. Nous utilisons alors un rapport molaire de 5:1 entre l'insert et le plasmide linéarisé. La ligation a lieu, à température variable selon la ligase utilisée, pendant une nuit dans un tampon de ligation livré par le fournisseur avec 1 U d'ADN ligase du phage T4. Cette dernière permet la formation d'une liaison covalente entre une extrémité 3' hydroxylée et une extrémité 5' phosphate de deux molécules d'ADN.

### 3.7.2 Transformation de *Escherichia coli*

Nous avons utilisé deux techniques de transformation de *Escherichia coli*, la transformation au chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) :

Une colonie isolée de la souche de *E. coli* désirée est inoculée dans 3 ml de milieu LB et incubée durant la nuit à 37 °C. Le lendemain, 99 ml de milieu LB sont inoculés avec 1 ml de ce pré-inoculum et incubés environ 3 h à 37 °C sous une agitation de 250 rpm jusqu'à atteindre une absorbance comprise entre 0,4 et 0,6. Les cellules en pleine phase exponentielle sont alors centrifugées à 5000 rpm durant 5 min à 4 °C et resuspendues dans 10 ml d'une solution tampon  $\text{CaCl}_2$ -MOPS-glucose (100 mM  $\text{CaCl}_2$  ; 10 mM MOPS et 0,5% glucose) stérile et préalablement refroidie. Toutes les étapes suivantes se déroulent dans un bain de glace. Après 30 min dans la glace, les cellules sont centrifugées dans les mêmes

conditions que précédemment et le culôt résultant est repris dans 2 ml de la même solution tampon. Les cellules sont alors prêtes à être transformées. Pour cela, 200  $\mu\text{l}$  de cellules sont utilisés pour une réaction de transformation. L'ADN est ajouté aux cellules dans un microtube et le tout est incubé 2 h dans un bain de glace. Un choc thermique est alors réalisé à 42 °C durant 2 min et on ajoute immédiatement 800  $\mu\text{l}$  de milieu LB préalablement préchauffé à 37 °C. Les cellules sont alors incubées une heure à 37 °C pour l'expression du phénotype puis étalées sur milieu sélectif pour la sélection des transformants. L'efficacité de la transformation est généralement de  $10^6$  à  $10^7$  transformants par micro g d'ADN pour un ADNp et de  $10^4$  à  $10^5$  pour une ligation.

#### 4. Amplification génique de l'ADN ou technique PCR

La PCR (« Polymerase Chain Reaction ») est une technique qui permet l'amplification spécifique d'une séquence d'ADN grâce à deux amorces nucléotidiques synthétiques en s'hybridant avec des séquences complémentaires bordant la séquence à amplifier. Le volume du milieu réactionnel de la PCR est généralement de 50  $\mu\text{l}$  contenant 0,5 à 2 unités de l'ADN polymérase, 100 à 500 ng de l'ADN matrice, 10 picomol de chacun des deux amorces, 5 à 10 mM de chacune des bases dNTP sans mettre les sels adéquats à l'enzyme selon les instructions du fabricant.

les conditions ci-dessous ont été adoptées en utilisant l'appareil PCR: Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler.

1 $\mu\text{l}$	ADNg (300 mg)
5 $\mu\text{l}$	Tampon d'ADN polymérase
2 $\mu\text{l}$	dNTP (10 mM)
5 $\mu\text{l}$	Amorce directe (10 $\mu\text{mol}$ )
5 $\mu\text{l}$	Amorce reverse (10 $\mu\text{mol}$ )
1 $\mu\text{l}$	ADN polymérase <i>Taq</i> ou <i>Pfu</i> (2 U)
1 $\mu\text{l}$	MgCl <sub>2</sub> 25 mM (facultatif)
5 $\mu\text{l}$	DMSO 50% (facultatif)
q.s.p. 50 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O ultrapure



Dans nos conditions, une étape de dénaturation de la matrice pendant 5 min à 94 °C est suivie de 40 cycles de polymérisation dont chacun comprend :

- Une étape de dénaturation de la matrice (30 secondes à 94 °C).
- Une étape d'hybridation des nucléotides amorces à la matrice (1 minute à la température d'hybridation convenable comprise entre 50 et 55 °C).
- Une étape de polymérisation par une ADN polymérase (1 à 2 minutes à 72 °C).

Une étape de polymérisation supplémentaire de 10 min à 72 °C est généralement réalisée afin que la *Taq* polymérase puisse additionner un dATP à l'extrémité 3' du fragment amplifié ce qui permet le clonage dans des vecteurs adéquats (pCR2.1 et pGEM-T Easy). Lorsque l'amplification est réalisée par la *Pfu* polymérase, incapable d'ajouter des dATP à l'extrémité 3', cette étape supplémentaire est réalisée après purification de l'ADN moyennant la *Taq* polymérase en présence de dATP.

## 5. Séquençage automatique de l'ADN

Les réactions de séquences ont été réalisées en utilisant le séquenceur automatique ABI Prism<sup>®</sup> 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems). Ces séquences ont été faites dans des plaques PCR de 96 puits en utilisant le kit de séquençage (« BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit »). Le volume de réaction est de 10 µl contenant : 2 µl de produit PCR ; 1,5 µl de tampon (ABI 5x) ; 1 µl d'un mélange d'enzyme/dNTP/ddNTP marqués (Rmix 2,5x) ; 0,25 µl de différentes amorces à (200 ng/µl = 30 µM) et on complète avec de l'eau ultra pure à 10 µl. Le programme de la réaction comporte 25 cycles : 10 s de dénaturation à 96 °C, 5 s d'hybridation à 50 °C et 4 min d'élongation à 60 °C. Les produits de séquences sont alors purifiés en utilisant le kit (« Montage SEQ 96 cleanup ») de millipore. Cette étape de purification permet de faire de l'économie du kit de séquençage au moins 3 fois et d'avoir des réactions de séquence de bonne qualité.

## APPENDICE C

### Les milieux axillaires, solutions et Tampons

**\* Préparation du lait utilise comme constituant de milieu de culture.**

Pour un litre, faire dissoudre 100g de poudre de lait écrémé dans 450 ml d'eau distillée, stérilisé à 112°C. pendant 15 mn

**\*Milieu viande foie** : Milieu solide utilise pour l'identification du type respiratoire dont la composition est la suivante:

Base viande –foie	20g
Glucose	0,75g
Sodium sulfite	1,20g
Fer citrate ammoniacal	0,50g
Agar-agar	11g
Eau distillée	1000ml.

**\* Tampon acétate 100 mM:** Pour 100 ml mélanger les volumes en ml d'acide acétique 0,2 M (11,55 ml, H<sub>2</sub>O qsp 1 l) et d'acétate de sodium 0,2 M indiqués ci-dessous pour obtenir le pH adéquat.

Acide acétique 0,2 M	Acétate de sodium 0,2 M	pH final
41	9	4
25,5	24,5	4,6
14,8	35,2	5
8,8	41,2	5,4
4,8	45,2	5,6

\* **Tampon Glycine-NaOH 100 mM:** Mélanger 50 ml de Glycine 0,2 M avec les volumes de NaOH 0,2 M indiqués ci-dessous pour obtenir le pH adéquat puis ajuster à 200 ml.

NaOH 0,2 M	pH final	NaOH 0,2 M	pH final
4	8,6	22,4	9,0
6	8,8	27,2	9,8
8,8	9	32	10,0
12,0	9,2	38,6	10,4
16,8	9,4	45,5	11

\* **Tampon Tris HCl 100 mM:** Mélanger 50 ml de Tris 0,2 M avec les volumes en ml de HCl 0,2 M indiqués ci-dessous pour obtenir le pH adéquat

HCl 0,2 M	pH final	HCl 0,2 M	pH final
5	9,0	26,8	8,0
8,1	8,8	32,5	7,8
12,2	8,6	38,4	7,6
16,5	8,4	41,4	7,4
21,9	8,2	44,2	7,0

- L'anaérobiose a été assurée par l'emploi des jarres à anaérobiose dans lesquelles sont placés les boîtes et les tubes et un sachet contient du borohydrure de sodium générateur d'hydrogène et un mélange de bicarbonate de sodium d'acide citrique générateur de CO<sub>2</sub> fourni par Anaerocult (Merck).
- Le pH est ajusté par une solution d'HCl 1N ,ou d'une solution de NaOH 1N Selon le cas

## APPENDICE D

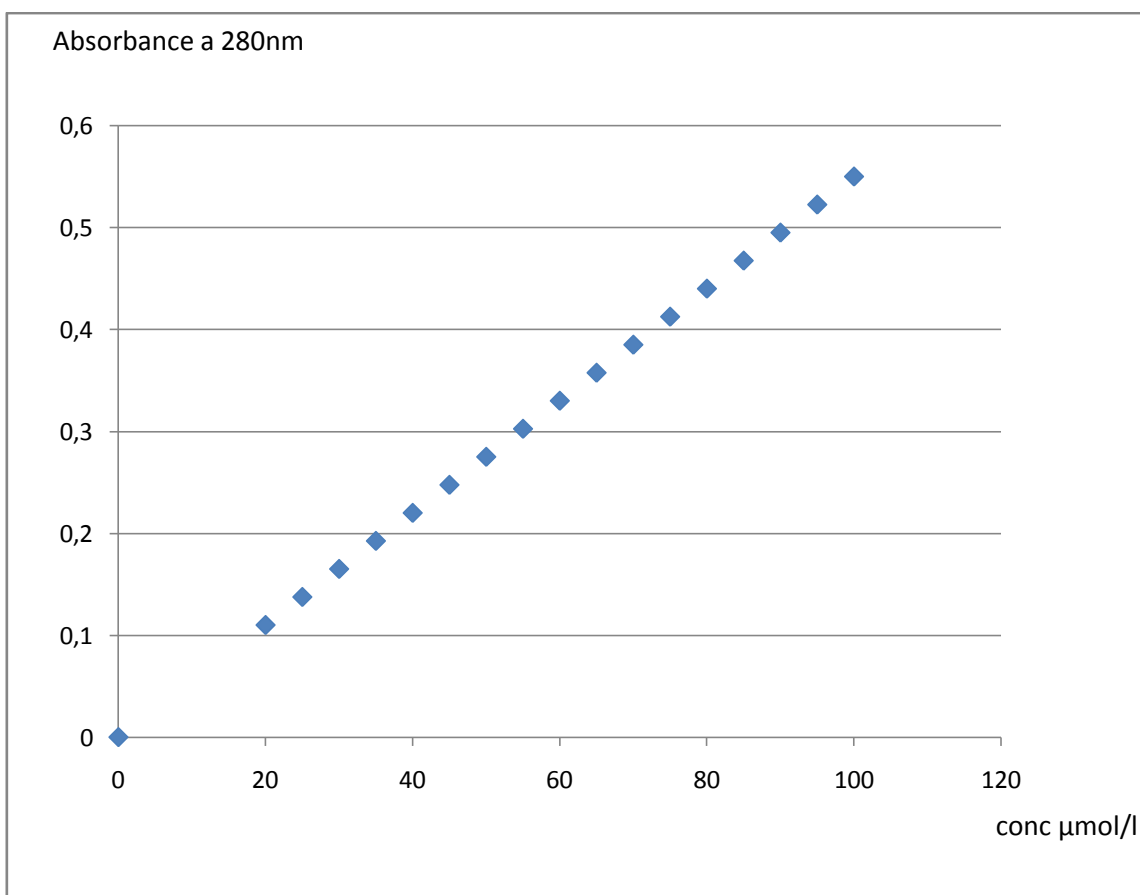
### CCOLORATION DE GRAM

Une suspension bactérienne est étalée sur une lame en verre propre, puis séchée et fixée à la flamme. La lame est recouverte pendant une minute du réactif N°1 (2% cristal violet, 20% alcool éthylique et 0,8% oxalate d'ammonium) puis lavée doucement à l'eau. La lame est ensuite recouverte par du réactif N°2 (1,3% iode, 2% iodure de potassium et 10% polyvinyl pyrrolidone) pendant une minute et de même lavée doucement à l'eau. On ajoute par la suite du réactif N°3 (50% alcool absolue et 50% acétone) pour la décoloration suivi par un rinçage doux à l'eau . En recouvre enfin la lame par le réactif N°4 (0,25% safranine et 10% alcool) pendant une minute et on réalise un lavage doux avant séchage de la lame, puis on observe au microscope (Objectif 100 × à l'huile d'immersion) [162].

## APPENDICE E

## La courbe d'étalonnage de la tyrosine

Concentration de tyrosine $\mu\text{mol/l}$	Absorbance 280 nm	Concentration de tyrosine $\mu\text{mol/l}$	Absorbance 280 nm
0	0 $\pm$ 0	50	0,275 $\pm$ 0,007
1	0,0055 $\pm$ 0,009	55	0,3025 $\pm$ 0,013
5	0,0275 $\pm$ 0,011	60	0,33 $\pm$ 0,016
10	0,055 $\pm$ 0,013	65	0,3575 $\pm$ 0,012
15	0,0825 $\pm$ 0,012	70	0,385 $\pm$ 0,015
20	0,11 $\pm$ 0,008	75	0,4125 $\pm$ 0,011
25	0,1375 $\pm$ 0,015	80	0,44 $\pm$ 0,012
30	0,165 $\pm$ 0,011	85	0,4675 $\pm$ 0,015
35	0,1925 $\pm$ 0,013	90	0,495 $\pm$ 0,016
40	0,22 $\pm$ 0,012	95	0,5225 $\pm$ 0,013
45	0,2475 $\pm$ 0,012	100	0,55 $\pm$ 0,011



## APPENDICE F

### Identification moléculaire de la souche AB1

#### 1 Identification moléculaire de la souche AB1 via la technique de l'ARNr 16S

Afin d'identifier de manière précise la souche d'actinomycètes AB1 nous avons procédé à son identification moléculaire. En effet, actuellement, l'ARN ribosomique (ARNr) est considéré comme méthode rapide et fiable pour la détermination de l'espèce et le meilleur moyen pour la réalisation des études phylogénétiques comparé aux techniques classiques de la taxonomie. De ce fait, pour amplifier tout le gène de l'ARNr 16S par PCR, nous avons choisi les deux couples d'amorces (Directe, Oligo D-S73 et Reverse, Oligo R-S74) et (Directe, Oligo D-156 et Reverse, Oligo R-157) dont les séquences appartiennent aux régions conservées flanquant ce gène. Ainsi, nous avons amplifié un fragment d'ADN de taille attendue estimée à ~1,5 kb (figure 1).

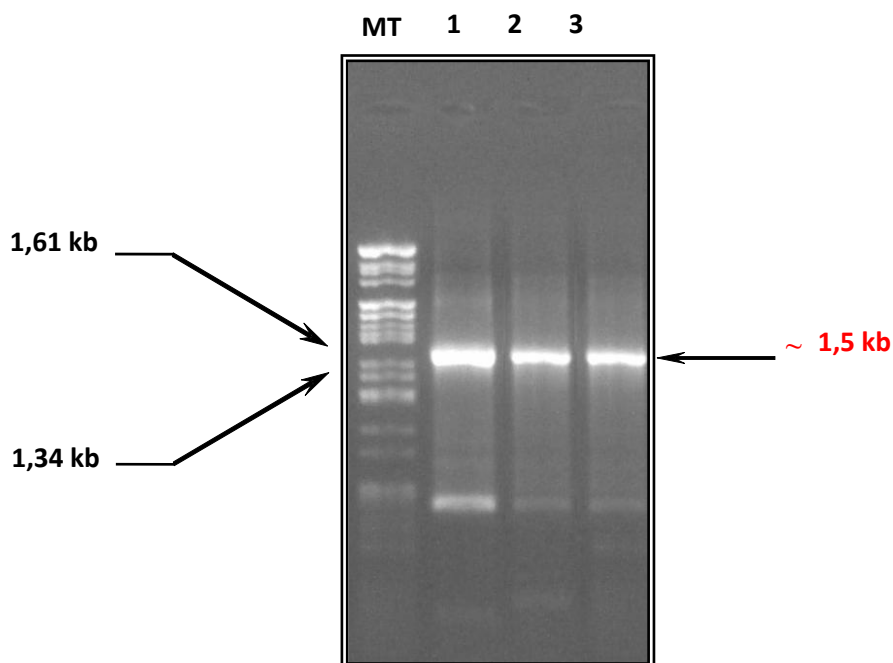


Figure 1 : Analyse du produit PCR (taille attendue) de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche AB1 (piste 1) : MT (marqueur de taille).



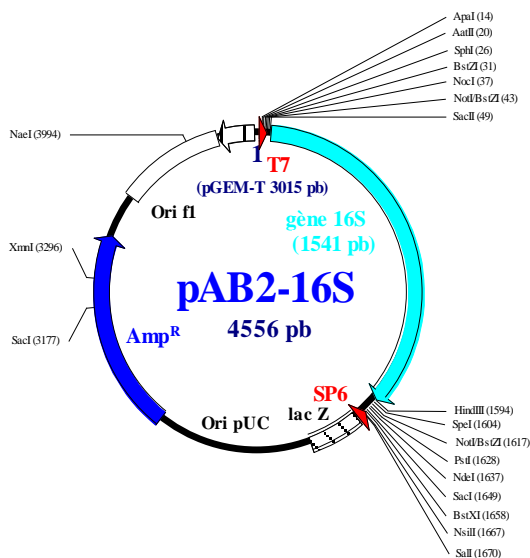


Figure 2 : Cartes de restriction des plasmides pAB1-16S

Le fragment PCR a été purifié puis cloné dans un vecteur approprié, en l'occurrence le pGEM-T, pour générer les plasmides pAB2-16S de taille 1541 pb (figure 1). Par la suite, la séquence nucléotidique totale de ce fragment [1541 pb (figure 2) a été déterminée moyennant les techniques de séquençage automatique. Les séquences du gène de l'ARNr 16S de cette souche va être déposée dans la banque de données (« GenBank database »).

```

AGAGAATGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTCCCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTC
GAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGC
AATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTG
ATCCTCGCAGGCATCTGCGAGGTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGC
GGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCG
GCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACCCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCG
CGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAA
GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCCGTAAT
ACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCT
TGTCACGTCGGTTGTGAAAGCGGGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGG
CAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA
GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTG
AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGC
ATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTATAACTCAAAGGAATTGAC

```

GGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGATC  
 CTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCCTGGAGAAAGGGTCCCCCTTGTGGTC  
 GGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAG  
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGGCCAGCAGGCCCTAGTGGTGCTGG  
 GGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTGGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAG  
 TCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAG  
 CTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGG  
 GTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTTTTTCGCAGATCAGCATTGCT  
 GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGG  
 TAACACCCGAAGCCGGTGGCGCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGG  
 ACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGC  
 GGCTCGCTGCTTTCGGATCACCTCCTTTCCTTT

Figure 3 : Séquence nucléotidique du gène d'ARNr 16S (1541 pb) de la souche AB1.

**Score = 2693 bits (1458), Expect = 0.0**

**Identities = 1486/1500 (99%), Gaps = 0/1500 (0%)**

**Strand=Plus/Plus**

Accession	Description
<a href="#">GQ392058.1</a>	<i>Streptomyces rochei</i> strain A-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">AM889494.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. SHXFF-2 partial 16S rRNA gene, isolate SHXFF-2
<a href="#">GQ494994.1</a>	Uncultured <i>Streptomyces</i> sp. clone neu50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">EF114310.2</a>	<i>Streptomyces</i> sp. B5W22-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">EF626598.1</a>	<i>Streptomyces rochei</i> strain NRRL B-1559 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">DQ026641.1</a>	<i>Streptomyces enissocaesilis</i> strain NRRL B-16365 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">DQ663150.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. 3194 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Ci-dessous l'homologie avec la souche *Streptomyces rochei* strain A-1

☐ [gb|GQ392058.1](#) *Streptomyces rochei* strain A-1 16S ribosomal RNA gene,

partial sequence. Length=1518

Score = 2693 bits (1458), Expect = 0.0

Identities = 1486/1500 (99%), Gaps = 0/1500 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query 7

TGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTCCCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAA

66|||||

Sbjct 7

TGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAA 66

Query 67

CCACTTCGGTGGGGATTAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCAC

126|||||

Sbjct 67

CCACTTCGGTGGGGATTAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCAC

126

Query 127

TCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCCTCGCAGGCATCTGC

186|||||

Sbjct 127

TCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCCTCGCAGGCATCTGC

186

Query 187

GAGGTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGG

246|||||

Sbjct 187

GAGGTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGG

246

Query 247

TAACGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGG

306|||||

Sbjct 247

TAACGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGG

306

Query 307

ACTGAGACACGGCCCAGACCCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG

366 |||

Sbjct 307

ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG

366

Query 367

AAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC

426 |||

Sbjct 367

AAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC

426

Query 427

AGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA

486 |||

Sbjct 427

AGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA

486

Query 487

GCAGCCGCCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC

546 |||

Sbjct 487

GCAGCCGCCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC

546

Query 547

GTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCGGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGA

606 |||

Sbjct 547

GTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGA

606

Query 607

TACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCG

666 |||

Sbjct 607

TACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCG

666

Query 667

CAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAG

726 |||

Sbjct 667

CAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAG

726

Query 727

GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGT

786 |||

Sbjct 727

GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGT

786

Query 787

GGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCC

846 |||

Sbjct 787

GGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCC

846

Query 847

CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTATAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA

906 |||

Sbjct 847

CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA

906

Query 907

GCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGATCCTTACCAAGGCTTGACATA

966 |||

Sbjct 907

GCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATA

966

Query 967

CACCGGAAAACCCTGGAGAAAGGGTCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCT

1026 |||

Sbjct 967

CACCGGAAAACCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCT

1026

Query 1027

GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCC

1086 |||

Sbjct 1027

GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCC

1086

Query 1087

CGTGTGGCCAGCAGGCCCTAGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTG

1146 |||

Sbjct 1087

CGTGTGGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTC

1146

Query 1147

GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTG

1206 |||

Sbjct 1147

GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTG

1206

Query 1207

CTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCG

1266 |||

Sbjct 1207

CTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCG

1266

Query 1267

GTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTTTTCG

1326 |||

Sbjct

1267

GTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCG

1326

Query

1327

CAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTC

1386 |||

Sbjct

1327

CAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTC

1386

Query

1387

ACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCGCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGT CGAA

1446 |||

Sbjct

1387

ACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGT CGAA

1446

Query

1447

GGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTG

1506 |||

Sbjct

1447

GGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTG

1506

## Références bibliographiques

- 01 Gupta, R., Beg, Q. K. and Lorenz, P., "Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications". *Appl Microbiol Biotechnol.* V.59, (2002),15-32.
  
02. Bergere J.L et Lenoir J."Les accidents de fromagerie et les défauts des fromages." In :Eck A ,Gillis J.C.,eds. *Le fromage.* 3eme édition .Paris:Tech. et Doc. Lavoisier. (1997).
  
03. Schafer, T., Borchert, T. W., Nielsen, V. S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L. D., Salmon, S., Pedersen, S.,"Industrial enzymes .Production of alkaline protease." *Adv Biochem Eng Biotechnol* V. 59, (2007), 105-113.
  
- 04 LARRETA-GARDE .V." Les enzymes en agroalimentaire .Laits et produits laitiers " Eds ;Lavoisier Paris. (1997)pp 48-76.
  
05. Ward O.P."Proteolytic enzymes. In : Moo-Young M. (Eds) *Comprehensive biotechnology, the practice of biotechnology.Current commodity products*, v. 3.*Pergman Press, Oxford.*, (1985), pp : 789-818.
  
- 06 Linding,G.,"Transformation des produits alimentaires par les enzymes ".Vol Bio 1,Eds.Technique de l'ingénieur Bioprocédés, Paris.France.(2007),pp.8 19.
  
07. Gripon J.C."Les enzymes protéolytiques en industrie laitiere dans : Hydrolases et dépolymérase .Enzymes d'intérêt industriel", Mouranche A.,Costes C.,eds., Gauthier-Villards, Paris , (1985) pp 239-278.
  
08. Germonville A.,"Agents coagulants." Edition.Technique de l'ingenieur. France , (2007) pp 2-11.



09. Oxford Business Group Economic Up date "Algerie :vive la compagne" selon les Statistiques du Conseil National d'Information et Statistique Algérien , *Http:www.Oxford business group./The inside Edge.Uk.htm*,(Avril 2011).
- 10 Romain J,Croguennec T.,Schuck P.et Brule. G.,"Science des aliments Volume 2 Technologie des produits alimentaires ".Edition Technique et Documents Paris. (2007) ,449p.
11. Perlman G.E. et Lorand L. «Proteolytic enzymes». *Meth. in Enzymol.*, 19, Academic Press, New York (1970),pp 45-97.
12. Lalmanach, G. ,«Proteolytic enzymes: from structures to transport pathways.» *Biochimie Rev V.90* (2008), 191-3.
13. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V., «Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases». *Microbiol. Mol. Biol. Rev.V. 62*, (1998)., 597-635.
- 14 Bayot, A., Basse, N., Lee, I., Gareil, M., Pirotte, B., Bulteau, A. L., Friguet, B. and Reboud-Ravaux, M. , "Towards the control of intracellular protein turnover: mitochondrial protease inhibitors versus proteasome inhibitors". *Biochimie V.90*,(2008), 260-9.
15. Hori M. et Furutani Y.,A "novel *Bacillus subtilis* gene involved in negative control of sporulation and degradative-enzyme production." *J. Microbiol.*, V.172, (1990): 1783-1790.
16. Han, J., You, D., Xu, X., Han, W., Lu, Y., Lai, R. and Meng, Q., "An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. *Toxicon*" *Appl Microbiol Biotechnol.V.51*, (2008), 914-922.
17. Shpacovitch, V., Feld, M., Hollenberg, M. D., Luger, T. A. and Steinhoff, M., "Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity". *J Leukoc Biol.* (2008).

18. Dahlback, B. "Blood coagulation." *Lancet* V.35, (2000) ,1627-32.
19. Calik P ,Takar C.G.,Calik G.,et Ozdamart H. , "Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*" *Enzyme and. Microbial technology* V.26, (2000) ,45-60.
20. Dressler, D. and Potter, H. , "Discovering Enzymes" Hardcover, *W H Freeman & Co* (Février 1991), 263 pages.
21. Maurer, K.-H., "Detergent proteases". *Curr Opin Biotechnol* V.15,(2004),330-334.
22. Ogawa, J. and Shimizu, S., "Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan". *Curr Opin Biotechnol* ,V.13, (2002), 367-75.
23. NC-IUBMB. 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).p.862.
24. Rawlings, N. D. and Barrett, A. J. , "MEROPS: the peptidase database". *Nucleic Acids Res* V.28,N°5, (2000),323.
25. Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., Kong, J. and Barrett, A. J., "MEROPS: the peptidase database." *Nucleic Acids Res* V.36,N°5 (2008),D320.
26. Cavasin, M. A., Rhaleb, N. E., Yang, X. P. and Carretero, O. A., "Prolyl oligopeptidase is involved in release of the antifibrotic peptide Ac-SDKP. *Hypertension*" V.43, N°5 (2004)1140-1150.

27. Szeltner, Z. and Polgar, L. , "Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase". *Curr Protein Pept Sci* .V.9, (2008), 96-107.
28. Barrett, A. J. , "An introduction to the proteinases." Barrett, A.J. and Salvessen, G. *Proteinase Inhibitors* V.1, (1986), 3-22.
29. Walsh, P. N. and Ahmad, S. S. , "Proteases in blood clotting." *Essays Biochem* V.38, (2002),95-111.
30. Van der Hoorn, R. A. , "Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms." *Annu Rev Plant Biol* .V.59, (2008), 191-223.
31. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and O'Brien, E. A. , "The MEROPS database as a protease information system". *J Struct Biol* V.134, (2001),95-102.
32. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F. , "Handbook of proteolytic enzymes." *Academic Press, Londres*, (1998) ,p1666.
33. [Http://www.merops.sanger .ac.UK](http://www.merops.sanger.ac.uk).
34. [Http:merops.sanger.ac .UK/index /Unseqpep.htm](http://merops.sanger.ac .UK/index /Unseqpep.htm).
35. Barrett, A. J. , "Protein degradation in health and disease. Introduction: the classification of proteinases." *Ciba Found Symp*, (1979), 1-13.
36. Barrett, A. J. and Rawlings, N. D. , "Families and clans of serine peptidases." *Arch Biochem Biophys* V.318, (1995),247-50.

37. Kato, T., Yamagata, Y., Arai, T. and Ichishima, E. , "Purification of a new extracellular 90-kDa serine proteinase with isoelectric point of 3.9 from *Bacillus subtilis* (natto) and elucidation of its distinct mode of action." *Biosci Biotechnol Biochem*, V.56, (1992),1166-8.
38. Tobe, S., Shimogaki, H., Ohdera, M., Asai, Y., Oba, K., Iwama, M. and Irie, M. "Expression of *Bacillus* protease (Protease BYA) from *Bacillus* sp. Y in *Bacillus subtilis* and enhancement of its specific activity by site-directed mutagenesis-improvement in productivity of detergent enzyme". *Biol Pharm Bull* .V.29, (2006), 26-33.
39. Kalisz, H. M. , "Microbial proteinases." *Adv. Biochem. Eng Biotechnol*, V.36, (1988),1-65.
40. Rawlings, N. D., Polgar, L. and Barrett, A. J. , "A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase." *Biochem J* . ,V. 279 ,N°3, (1991) 907-8.
41. Siezen, R. J., de Vos, W. M., Leunissen, J. A. and Dijkstra, B. W. , "Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases". *Protein Eng.*, V.4, (1991),719-37.
42. Jelinek, B., Katona, G., Fodor, K., Venekei, I. and Graf, L. , "The Crystal Structure of a Trypsin-like Mutant Chymotrypsin: The Role of Position 226 in the Activity and Specificity of S189D Chymotrypsin." *Protein J* ,V.27, (2008), 79-87.
43. Lin, X., Kelemen, D. W., Miller, E. S. and Shih, J. C. , "Nucleotide sequence and expression of *kerA*, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1." *Appl Environ Microbiol* ,V.61, (1995),1469-74
44. Drenth, J., Hol, W. G., Jansonius, J. N. and Koekoek, R. , "Subtilisin Novo. The three-dimensional structure and its comparison with subtilisin BPN'." *Eur J Biochem* V.26, (1972),177-81.

45. Leigh S.D. , "New serine protease from *Streptomyces griseus* ATCC 55178." *P-Patent*. Oakland, CA, USA, V.28 Juillet (1997), 564 -600.
46. [Http://Delphi.phy.univ.tours.fr/Prolysis/Images/mecaser.gif](http://Delphi.phy.univ.tours.fr/Prolysis/Images/mecaser.gif).
47. Schechter, I. and Berger, A. , "On the size of the active site in proteases. I. Papain." *Biochem Biophys Res Commun* V.27, (1967),157-62.
48. Rawlings, N. D. and Barrett, A. J. , "Families of cysteine peptidases." *Methods Enzymol* V.244, (1994) ,461-86.
49. Abidi, F., Limam, F. and Marzouki, M. N. , "Purification and characterization of an alkaline protease Prot 1 from *Botrytis cinerea* ": biodetergent catalyst assay. *Appl Biochem Biotechnol* .V.41, (2007),361-76.
50. Rakhimov, M. R. , "Pharmacological study of papain from the papaya plant cultivated in Uzbekistan." *Eksp Klin Farmakol* ,V.63, (2000), 55-57.
51. Azarkan, M., Garcia-Pino, A., Dibiani, R., Wyns, L., Loris, R. and Baeyens-Volant, D. , "Crystallization and preliminary X-ray analysis of a protease inhibitor from the latex of *Carica papaya*. *Acta Crystallogr Sect F*" *Struct Biol Cryst Commun* ,V.62, (2006),1239-1242.
52. Ghosh, R., Chakraborty, S., Chakrabarti, C., Dattagupta, J. K. and Biswas, S. "Structural insights into the substrate specificity and activity of ervatamins, the papain-like cysteine proteases from a tropical plant, *Ervatamia coronaria*." *Febs J* V.275, (2008),421-434.
53. Janowski, R., Kozak, M., Jankowska, E., Grzonka, Z. and Jaskolski, M. "Two polymorphs of a covalent complex between papain and a diazomethylketone inhibitor." *J Pept Res* . V.64, (2004),141-150.

54. Kumar, A. G., Swarnalatha, S., Gayathri, S., Nagesh, N. and Sekaran, G. "Characterization of an alkaline protease product of *Bacillus pumilus*". *J Appl Microbiol* V.105, (2008),311-320.
55. Wang, Y., Xue, W., Sims, A. H., Zhao, C., Wang, A., Tang, G., Qin, J. and Wang, H. , "Isolation of four pepsin-like protease genes from *Aspergillus niger* and analysis of the effect of disruptions on heterologous laccase expression". *Fungal Genet Biol* ,V.45, (2008),17-27.
56. Chitpinyol, S., Goode, D. and Crabbe, M. J. , "Studies on the binding of alpha-crystallin to recombinant prochymosins and chymosin." *Mol Vis* (1998),1-4.
57. Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh, N., Haddar, A., Manni, L. and Nasri, M. , "Production and purification of a calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1." *J Ind Microbiol Biotechnol* ,V.32, (2005),186-194.
58. Manni, L., Jellouli, k., Agrebi, R., Bayouhd, A. and Nasri, M. , "Biochemical and molecular characterization of a novel calcium-dependent metalloprotease from *Bacillus cereus* SV1". *Process Biochem.* ,V.43, (2008),522-530.
59. Arendt, C. S. and Hochstrasser, M. , "Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly". *Embo J* , V.18, (1999) ,3575-3585.
60. Jager, S., Groll, M., Huber, R., Wolf, D. H. and Heinemeyer, W. , "Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function." *J Mol Biol* ,V.291, (1999), 997-1013.

61. Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Hegerl, R., Pfeifer, G. and Baumeister, W. , "The multicatalytic proteinase (prosome, proteasome): comparison of the eukaryotic and archaeobacterial enzyme." *Biomed Biochim Acta* V.50, (1991),465-469.
62. Orłowski, M. and Wilk, S. , "Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome." *Arch Biochem Biophys* V.415, (2003),1-5.
63. Filk M. et Sorowka K. , "Preparation and properties of protein concentrate from boiler chicken heads".*J. Sci. Food Agricul.*, V.37 : (1986) ,445-454.
64. Schimidl M.K., Taylor S.L. et Nordlee J.A. , "Use of hydrolysate-based products in special medical diets." *Food Technol.*, V.48 ,N°10,(1994) 77-85.
65. Chitpinyol, S., Goode, D. and Crabbe, M. J. , "Studies on the binding of alpha-crystallin to recombinant prochymosins and chymosin." *Mol Vis* V.4, (1998) ,1.
66. Charles A. et Guy.L., "Abrégé de biochimie alimentaire "Edition.Masson Paris (1997),247p.
67. Veirling E., "Aliments et boissons Filières et produits ;Laits et fromages ", Eds.Doin Paris (2002),pp12-49.
68. Godfrey T. et West S. , "Introduction to industrial enzymology. In : Godfrey T. West S (eds) *Industrial enzymology*, "2<sup>nd</sup>. Macmillan Press, London, (1996),pp 1-8.
69. Dunaevsky T.E., Gruban T.N., Beliokova G.A. et Belozersky M.A. "Enzymes secreted by filamentous fungi, regulation and purification of an extracellular protease of *Trichoderma harzianum*". *Biochem. J.(Mosc)*, V.65 ,(2000),723–727.

70. Wang S.L., Chen Y.H., Wang C.L., Yen Y.H. et Chern M.K. "Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Bacillus subtilis* in a shrimp and crab shell powder medium" *Enz. Microb. Technol.*, V.36 : (2005),660–665.
71. Hajji M., Kanoun S., Nasri M. et Gharsallah N. , "Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1". *Process Biochem.* , V.42 : (2007),791-797.
72. Claus, D. and Berkeley, R. C. W. , "Genus *Bacillus* In : P.H.A. Sneath et al. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*", Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. Cohn V. 2., (1986) ,pp. 1105-1139.
73. Fritze, D., Flossdorf, J. and Claus, D. , "Taxonomy of alkaliphilic *Bacillus* strains". *Int J Syst Bacteriol* V.40, (1990),92-97.
74. Uetanabaro, A. P., Wahrenburg, C., Hunger, W., Pukall, R., Sproer, C., Stackebrandt, E., de Canhos, V. P., Claus, D. and Fritze, D. , "*Paenibacillus agarexedens* sp. nov., nom. rev., and *Paenibacillus agaridevorans* sp." nov. *Int J Syst Evol Microbiol* ,V.53, (2003),1051-1070.
75. Ash, C., Farrow, J. A. E., Dorsch, M., Stackebrandt, E. and Collins, M. D. , "Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA." *Int J Syst Bacteriol* V.41, (1991),343-346.
76. Borowski, E. (1953). , "Isolation of tetaine, an antibiotic from the strain of *Bacillus pumilus*." *Biul Panstw Inst Med Morsk Trop J W Gdansku* V.5, (1953) ,294-09.
77. Bhate, D. S. , "Pumilin, a new antibiotic from *Bacillus pumilus*." *Nature* V.175, (1955),816-7.



78. Aunpad, R. and Na-Bangchang, K. , "Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4." *Curr Microbiol* V55, (2007) 308-313.
79. Ouoba, L. I., Diawara, B., Jespersen, L. and Jakobsen, M. , "Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Soumbala production." *J Appl Microbiol* V.102, (2007) ,963-970.
- 80 . Bottone, E. J. and Peluso, R. W. , "Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and Aspergillus species: preliminary report." *J Med Microbiol* V.52, (2003), 69-74.
81. Munimbazi, C. and Bullerman, L. B. , "Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*." *J Appl Microbiol* V.84, (1998), 959-968.
82. Malikova, L. A., Mardanova, A. M., Sokolova, O. V., Balaban, N. P., Rudenskaia, G. N. and Sharipova, M. R. , "Conditions of the biosynthesis of an extracellular subtilisin-like proteinase by *Bacillus pumilus* KMM 62." *Mikrobiologija* V.76, (2007) ,313-320.
83. Merkel, M., Siegert, P., Wieland, S., Maurer, K. H. and Bessler, C. , "Subtilisin from *Bacillus pumilus* and washing and cleaning agents containing said novel subtilisin." In *WO 2007/131656 A1*. (2007).
84. Miyaji, T., Otta, Y., Nakagawa, T., Watanabe, T., Niimura, Y. and Tomizuka, N. , "Purification and molecular characterization of subtilisin-like alkaline protease BPP-A from *Bacillus pumilus* strain MS-1." *Lett. Appl. Microbiol.* V.42, (2006) , 242-247.
85. Kaudar, A. G., Benjentet M. "Characterization of an alkaline extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*." *J Appl Microbiol* V.12, (2008) 312-319.

86. Son, H. J., Park, H. C., Kim, H. S. and Lee, C. Y. , "Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*." *Biotechnol Lett* V.30, (2008) ,461-465.
87. Lin, J. X., Zhang, L. Y., Zhang, G. Y. and Fang, B. S. , "Molecular docking of *Bacillus pumilus* xylanase and xylan substrate using computer modeling." *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* V.23, (2007) ,715-718.
88. Ahmadian, G., Degrassi, G., Venturi, V., Zeigler, D. R., Soudi, M. and Zanguinejad, P., "*Bacillus pumilus* SG2 isolated from saline conditions produces and secretes two chitinases." *J Appl Microbiol* V.103,(2007),1081-1090.
89. Rasool, S., Johri, S., Riyaz-ul-Hassan, S., Maqbool, Q. U., Verma, V., Koul, S., Taneja, S. C. and Qazi, G. N. , "Molecular cloning of enantioselective ester hydrolase from *Bacillus pumilus* DBRL-191." *FEMS Microbiol Lett* .V.249, (2005)113-120.
90. Huang, Y., Cai, Y., Yang, J. and Yan, Y. , "Directed evolution of lipase of *Bacillus pumilus* YZ02 by error-prone PCR." *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* V.24, (2008), 445-451.
91. Kim, H. K., Choi, H. J., Kim, M. H., Sohn, C. B. and Oh, T. K. , "Expression and characterization of Ca(2+)-independent protease from *Bacillus pumilus* B26." *Biochim Biophys Acta* V.1583, (2002),205-212.
92. Larpent J.P. et Larpent-Gourgaud M., "Mémento technique de microbiologie 3eme édition." Eds. Technique et Documentation. Paris. (1997), pp 287-290.
93. Larpent J.P. , "Introduction à la nouvelle classification bactérienne – les principaux groupes bactériens." Eds. Technique et Documentation. Paris. (2000) pp 165-177.

94. Cholet M. , "Les groupes bactériens d'intérêt laitiers : Fromage." Eds lavoisier Technique et Documentation, Paris (2006) p.274.
95. Boyaval P. et Desmazeaud M.J., "Le point des connaissances sur *Brevibacterium linens*." Le Lait , V.63, (1983), 187-216.
96. Funatsu, M., Oh, H., Aizono, Y. et Shimoda, T., "Protease of *Arthrobacter luteus* : properties and function on lysis of viable yeast cells." Agric. Biol. Chem., V.42, (1975) ,175-177.
97. Hayashi K. , Cliffe A.J. et Law B.A., "Purification and characterization of five serine proteinases produced by *B. linens* ." Intern. J. Food Sci. Technol., V.25, (1990), 180-187.
98. Neklyudov A.D., Ivankin A.N. et Berdutina A.V. , "Properties and uses of protein hydrolysates ". *App. Biochem. Microbiol.*, V.36 ,(2000), 452-459.
99. Rebeca B.D., Pena-Vera M.T. et Diaz-Castaneda M., "Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value." *J. Food. Sci.*, V.56 ,(1991), 309-314.
100. Petterson D. , "Un bon départ dans la vie grâce aux enzymes. " *Biotimes : La revue industrielle de Novo Nordisk.*, V.2 ,(1997) ,10-11.
101. Dalev P. , "An enzyme-alkaline hydrolysis of feather keratin for obtaining a protein concentrate for fodder." *Biotechnol. Letters*, V.12 ,(1990) ,71-72.
102. Biotimes, "Des activités futures plus ciblées." *Revue Bio-industrielle Trimestrielle de Novo Nordisk* Septembre, (1995), 4-5.
103. Biotimes "Détergents" *Revue Bio-industrielle Trimestrielle de Novo Nordisk.* Septembre, (1992) 9-11.

104. Biotimes" Les lessives en tablettes prennent leur essor." Revue Bio-industrielle Trimestrielle de Novo Nordisk ,Mars, (2001) 8-9.
105. Morihara K.,"Using proteases in peptide synthesis." *Trends. Biotechnol.*, V.5,(1987),164-170.
106. Kise H., Hayakawa A. et Noritomi H. "Protease-catalysed synthetic reactions and immobilisation-activation of the enzymes in hydrophilic organic solvents." *J. Biotechnol.*, V.14 ,(1990), 239-254.
107. Clapés P., Pera E. et Torres J.L. ,"Peptide bond formation by the industrial protease, neutrase, in organic media." *Biotechnol. Letters.*, V.19,(1997),1023-1026.
108. Isono Y. et Nakajima M."Enzymic peptide synthesis using a microaqueous highly concentrated amino acid mixture." *Process. Biochem.*, V.36,(2000), 275-278.
109. Barros R.J., Wehtje E. et Adlercreutz P. , "Enhancement of immobilized protease catalyzed dipeptide synthesis by the presence of insoluble protonated nucleophile." *Enz. Microb. Technol.*, V.24 ,(1999), 480-488.
110. Chen, S. T., Chen, S. Y., Hsiao, S. C. and Wang, K. T. , "Application of industrial protease "Alcalase" in peptide synthesis". *Biomed Biochim Acta* V.50, (1991),181-186.
111. Kawashiro K., Sugahara H., Sugiyama S. et Hayashi H."Effect of organic solvents on enantioselectivity of protease catalysis." *Biotechnol. Bioeng.*,V.53 , (1997),26-31.
112. Castro G.R., "Enzymatic activities of proteases dissolved in organic solvents". *Enz. Microb. Technol.*, V.25 ,(1999), 689-694.

113. Nagashima T., Watanabe A. et Kise H. , "Peptide synthesis by proteases in organic solvents: medium effect on substrate specificity". *Enz. Microb. Technol.*,V. 14 ,(1992), 842-847.
114. Andersen L.P., "Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes." *US. Patent.*, V°34,N°5,(1999), 299.
115. Biotimes , "Les enzymes améliorent les peaux à quatre niveaux." *Revue Bio-industrielle Trimestrielle de Novo Nordisk Juin (1997)*, 8-9.
116. Kanehisa K., "Woven or knit fabrics manufactured using yarn dyed raw silk." *US Patent .V.80, N°6,(2000)*, 689.
117. Kudrya V.A. et Simonenko I.A., "Alkaline serine prteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, V.41 , (1994),505-509.
118. Kim W., Choi K., Kim Y., Park H., Chol J., Lee Y., Oh H., Kwon I. et Lee S. "Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus*. sp. Strain CK 11-4 screened from chungkook-jangs." *Appl. Environ. Microbiol.*, V.62,(1996),2482-2488.
119. Dalev P.G., "Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate." *Biores. Technol.*,V.48,(1994),265-267.
120. Jacobson J.W., Glick J.L. et Madello K.L."Composition for cleaning drains clogged with deposits hairs." *US Patent .V4 ,(1985)*, 506.
121. Fujiwara N., Tsumiya T., Katada T., Hosobuchi T. et Yamamoto K.  
"Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme." *Process. Biochem.*,V.24,(1989),155-156.

122. Ishikawa H., Ishimi K., Sugiura M., Sowa A. et Fujiwara N., Kinetics and mechanism of enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-ray film and releases of silver particles. *J. Ferment. Bioeng.*, V.76,(1993),300-305.
123. Fujiwara N., Yamamoto K. et Masui A., "Utilization of a thermostable alkaline protease from an alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray film." *J. Ferment. Bioeng.*, V.72,(1991),306-308.
124. Gajju H., Bhalla T.C. et Agarwal H.O. "Thermostable alkaline protease from thermophilic *Bacillus coagulans* PB-77." *Indian. J. Microbiol.*, V.36,(1996),153-155.
125. Desmazeud M., "Les enzymes utilisées en industries laitières dans :Lait et produits laitiers :Vaches-Brebis-Chèvre." ,2eme édition.:Tec et Doc – Lavoisier-Apiia Paris ,(1990).p267.
126. Mathieu J. "Initiation à la physicochimie du lait." Tech et Doc Paris, (1998),p167.
127. Dalgleish D.G. Spagnuolo P.A. Goff H.D., " A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emissionscanning electron microscopy." *International dairy journal* V.14 ,(2004),1025-1031.
128. Ernstrom C.A. "Milk clotting enzymes and their action in fundamentals of dairy chemistry." Webb B.H., AH. Johnson and J.A. Alford . The Avi Publishing company Inc. 2nd Edition. (1983),pp 663-718.
- Alais C. "Science du lait principes des techniques laitières." 3ème édition (1974) p807.
- Fox P.-F. "Exogenous enzymes in dairy technology", in *Utilisation des enzymes en technologie alimentaire*, Dupy P. Tech et Doc (1982) p135-157.

129. Brulé G. et Lenoir J. "La coagulation du lait in Le Fromage "A. Eck 2ème édition Tech. et Doc. (1987).
130. Schulze M., "Distinction of conventional and recombinant chymosin preparations." *Milchwissenschaft*, V.50 ,(1995),205-208.
131. Chamba J.F, Metais T. et Veber M.P., "Utilisation de chymosine obtenue a partir de *Kluyveromyces lactis* génétiquement transformée; en fabrication d'emmental". *Process*, V.139,(1989),47-52.
132. Green M.L. Valler M.J. Kay J. "Assesement of the suitability for cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin preparations." *Journal of dairy research* V.51,(1984), 331-340.
133. Michael Eskin N.A. "Biochemistry of food "2nd edition Academic press, Inc. (1990).
134. Gordin S. and Rosenthal I. "Efficacy of chicken pepsin as a milk clotting enzyme." *Journal of food protection* September V. 41 N° 9 (1978) 684-688.
135. Fernandez D.P., Gaya P. et Medina M., "Changes in the microflora of La Serena ewes' milk cheese during ripening ". *J.Dairy Res.*, V.55,(1990),449-455.
136. Dalgleish D.G. "The Enzymatic coagulation of milk." in *Advanced Dairy Chemistry V1 Proteins*. P.F. Fox Blackie and son Ltd. (1997),579-619.
137. Dalgleish D.G. "The Enzymatic coagulation of milk in Developpepents in *Dairy Chemistry-1 Proteins*." P.F. Fox Applied Science Publishers ,(1982),157-186.

138. Richardson G.H. "Dairy industry pp 362-391 *in* Enzymes in food Processing." G. Reed 2nd edition. Academic press (2000), 573 .
139. Cheftel J.-C., Cuq J. L. et Lorient D." Protéines alimentaires : Biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle et modifications chimiques." Tec et Doc. Lavoisier. Paris, (1985).
140. Lucey J.A. ADSA Foundation Scholar Award "Formation and physical properties of milk protein gels.", *J. Dairy Sci.* V.85,(2002), 281-294.
141. Lucey J.A., Johnson M.E. et Horne D.S. ADSA invited review : " perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese." *J. Dairy Sci.* V86 ,(2003), 2725-2743.
142. Boudjellab N., Rolet-Repecaud O. et Collin J.C., " Detection of residual chymosin in cheese by an enzyme-linked immunosorbent assay." *J. Dairy Res.*, V. 61, (1994), 187-216.
143. Desmazeaud M. et Gripon J.C., "General mechanism of protein breakdown during cheese ripening." *Milchwissenschaft* , V.32, (1997), 731-734.
144. Fox P.F. and McSweeney P.L.H." Cheese : An Overview *in* Cheese : Chemistry, physics and microbiology." Third edition- Volume 1 : General aspects Elsevier,(2004).pp.1-18 .
145. Miranda G. et Gripon J.C." Origine ,nature et incidences technologiques de la proteolyse dans le lait ." *J.Le Lait* , Rennes, V.66, (1986), 1-18.
146. Le Bars D et Gripon J.C."Hydrolysis of  $\alpha$ 1 -casein by bovine plasmin ." *J.Le Lait* , V.73 , (1993), 337-344.



147. Lodi R., "Plasmin, purification and characterization by use of specific fluorometric assays." *Arch. Biochem. Biophys.* V.75, (2003),118-123.
148. BLANC B., "Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale." *J. Le Lait* , V.62, (1982),350-395.
149. AIMUTIS w. R. and EIGEL W. N., "Identification of gamma casein as plasmin derived fragments of bovine uSI-casein." *J. Dairy Sci.*, V. 65, (1982) 175-181.
150. Lawrence R.C. ,Creamer L.K. et Gilles J., "Texture development during cheese ripening ." *J.Dairy Sci .* , V.70, (1987),1748-1760.
151. Visser F.M.W. and De Groot-Mostert A.E.A., "Contribution of enzymes from rennet ,starter bacteria and milk to proteolysis and flavor development in Gouda cheese .4.Protein breakdown : a gel electrophoretic study ." *Neth.Milk Dairy J.*, V.31, (1994),247-264.
152. Farkye N. and Fox P.F., "Contribution of plasmin to cheese ripening: effect of added plasmin ." *J.Dairy Res.* , V.59, (1992),476-511.
153. El soda M and Pandian S., "Recent developments in accelerated cheese ripening." *J.Dairy Sci.* , V.74, (1991).2317-2335.
154. Guegeun M. et Schmidt J.L., "Les Levures et *Geotrichum candidum* dans : les groupes microbiens d'intérêt laitier." Hermier J. ,Lenoir J.,Weber F.Eds ,CEPIL,Paris.(1992) ,pp 165-219.
155. Lenoir J .,Gripon J.C.,Lamberet G.et Cerning J., "Les *Penicillium* dans :les groupes microbiens d'intérêt laitier." Hermier J., Lenoir J., Weber F. Eds .CEPIL ,Paris.(1992),pp 165-219.

156. Lenoir J., "Les Flores de surface et leur rôle au cours de l'affinage des fromages." Fed .Intern. Lait. V.76 N °1. (1984),56-76.
157. Monnet V. et Gripon.J.C., "Metabolisme azoté des bacteries lactiques dans : Les bacteries lactiques." de Roissard H., Luquet F.M. eds ,LORICA ,Uriage, (1994),pp331-347.
158. Badis A.,Ferradji F.Z.,Boucherit A.,Fodil D and Boutoum H,"Craracterization and Biodegradation of soil humic acids and preliminary identification of decolorizing *actinomycetes* at Mitidja plain soil (Algeria)"Review African Journal of Microbiology Research .V13 ,N°3 (2009), 997-1007.
159. Badis A.,Ferradji F.Z.,Boucherit A.,Fodil D and Boutoum H, "Removal of natural humic acids by decolorizing *actinomycetes* isolated from different soils(Algeria) for application in water.purification"Desalination V.259 ,(2010),216-222.
- 160 Jaouadi, B.,Badis A.,Fodil D., Ferradji F.Z.,Rekik H.and Bejar, S., "Purification and characterization of novel thermostable Keratinolytic serine Alkaline proteinase from *Streptomyces* sp strain AB1 with high stability in organic solvents ."Bioresource Technology.V101,N°6 ,(2010): 8361-8369.
161. Jaouadi, B., Ellouz-Chaabouni, S., Rhimi, M. and Bejar, S., "Optimization Biochemical, and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Biochimie.*" .Letter in Applied Microbiology. V. 48, (2009), 253-260.
162. Kembhavi, A. A., Buttle, D. J., Knight, C. G. and Barrett, A. J., "The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays." *Arch. Biochem. Biophys.* V.303, (1993), 208-213.
163. Peterson, G. L. "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." *Anal biochem* V.83, (1977), 346-56.

164. Guiraud J.P., "Microbiologie alimentaire." Science et technique, série agroalimentaire edition DUNOD Paris ,(1998),652p.
165. Béraud J., "Le Technicien d'analyses biologiques-Guide théorique et pratique." Chapitre 8 :Bactériologie. Eds. Technique et Documentation, Medicales internationals. Paris. (2001),pp 845-962.
166. Karbalaeei-Heidari, H. R., Amoozegar, M. A., Hajighasemi, M., Ziaee, A. A. and Ventosa, A., "Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*." *J Ind Microbiol Biotechnol* V.36, (2009),21-27.
167. Lazim, H., Mankai, H., Slama, N., Barkallah, I. and Limam, F. "Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902." *J Ind Microbiol Biotechnol* V.36, (2009), 531-537.
168. Souissi, N., Ellouz-Triki, Y., Bougatef, A., Blibech, M. and Nasri, M. "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* V.163, (2008),473-480.
169. Ku, T. W., Tsai, R. L. and Pan, T. M. "A simple and cost-saving approach to optimize the production of subtilisin NAT by submerged cultivation of *Bacillus subtilis* natto." *J Agric Food Chem* V.57, (2009),292-296.
170. Akolkar, A., Bharambe, N., Trivedi, S. and Desai, A. "Statistical optimization of medium components for extracellular protease production by an extreme haloarchaeon, *Halobacterium* sp. SP1(1)." *Lett Appl Microbiol* V.48, (2009),77-83.

171. Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A. and Nasri, M."A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization." *Process Biochem* ,V.44, (2009), 29-35.
172. Collin J.C , Grappin R. et Legraet Y.,"Etude de la mesure ,selon Berridge, du temps de coagulation du lait additionne d'une solution enzymatique."Rev.Lait. France.,V.355, (1977),389-394.
173. Bourdier J.F. et Luquet F.M."Dictionnaire laitier ".Paris :Tech. et Doc. Lavoisier (1981) .
174. Ramet J.P."les agents de transformation du lait." In :Eck A ,Gillis J.C.,eds. Le fromage. 3eme édition .Paris:Tech. et Doc. Lavoisier. (1997) .
175. IMing, C., Lee, C. and Tsu-Shun, L."Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416." *Enzyme Microb Technol* V.14, (1992),755-761.
- 176 . Wandersman, C., Delepelaire, P., Letoffe, S. and Schwartz, M., "Characterization of *Erwinia chrysanthemi* extracellular proteases: cloning and expression of the protease genes in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* V.169,(1987),5046-5053.
177. Ramet J.P et Scher J.,"Propriétés physiques du coagulum ." In :Eck A ,Gillis J.C.,eds. Le fromage. 3eme édition .Tech. et Doc. Lavoisier.Paris, (1997).
178. Hutadilok, N.T., Anongnat, P. and Parasert, S."Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719." *J Biosci Bioeng* V.87, (1999) 581-587.
179. Ferrero M.A., Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D. et Sineriz F.,

- "Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation, production and characterization." *Appl. Microbial. Biotechnol.*, V.45,(1996),327-332.
180. Manachini P.L. et Fortina M.G., "Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*." *Biotechnol. Letters*, V.20 (1998), 565-568.
181. Horikoshi K., "Enzymes of alkalophiles." *Micro. Enzy. Biotechnol.*, V.48, (1990) ,274-294.
182. Raja N.Z.A., Che N.R., Kamaruzaman A., Mahiran B., Wan M.Z., Wan Y. et Abu Bakar S. "Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1." *Appl. Microbial. Biotechnol.*, V.40,(1994),822-827.
183. Kwon Y.T., Kim J.O., Moon S.Y., Lee H.H. et Rho H.M., "Extracellular alkaline protease from alkalophilic *Vibrio metschnikovi* strain RH530." *Biotechnol. Letters*, V.16,(1994),408-413.
184. Hayashi K. et Law B.A., "Purification and characterization of two aminopeptidases produced by *B.linens*." *J.Gen.Microbiol.* ,V.135, (1989),2027-2034.
185. Clancy K. et O'Sullivan B.A., "Partial purification and characterization of a proteinase from *B.linens*." *J.Agric.Food Res.* ,V.32, (1993),185-194.
186. Johnevesly B. et Naik G.R., "Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic sp. JB – 99 in a chemically defined medium." *Proc. Biochemistry*, V.37,(2001),139-144.
187. Rani G., Komal G., Saxena R.K. et Seema K., "Bleach –stable, alkaline protease from *Bacillus* sp." *Biotechnol. letters*, V.21,(1999),135-138.
188. Vieille C. and Zeikus J. G. "Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability." *Microbiol. Mol. Biol. Reviews*, V.65,(2001),1-43.

189. Shirley B. A., Stanssens P., Hahn U. and Pace C. N. "Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1." *Biochemistry*, V.31 (1992),725-732.
190. Akiba T.H et Horikoshi K. "Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101." *Appl. Microbial. Biotechnol.*, V.30,(1989),120-124.
191. Lee Y.H. et Chang H.N.,"Production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in an aqueous two-phase system." *J. Ferment. Bioeng.*, V.69,(1996),89-92.
192. Kobayashi T., Hakamada Y., Adachi S., Hitomi J., Yoshimatsu T., Koike K., Kawai S. et Ito S.,"Purification and properties of an alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-K16." *Appl. Microbial. Biotechnol.*,V.43,(1995),473-481.
193. Ghorbel B., Sellami Kamoun A. et Nasri M.,"Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1." *Enzyme and Microbial Technol.*,V.32,(2003),513-518.
194. St-Gelais D. et Tirard-Collet P. ,"Fromage, transformation du lait in Science et technologie du lait ".coordonnateur Vignola C.C, Fondation de technologie laitière du Québec (2002).
195. Lucey J.L. Fox P.F.,"Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture" a review. *J. Dairy Sci* ,V.76,(1993),1714-1724.
196. McKane,L . et J. Kandel."Microbiology: essentials and applications." McGraw-Hill" New-Yourk , Etats-Unis, (1996),843p.

197. Kalk.P. et LanglykkeA.F., "Cost estimation for biotechnology projects." Dans.'Manual of inùstrial microbiology and biotechnology Demain A.L. et N.A. Solomon (éds), American Society for Microbiology , Washington D C, États-Unis, Chap 26, (1986)pp.363-388.
  
198. Alais C. et Chamba J.F , "Etude biochimique de protéases coagulantes produites par *Mucor* .Activité coagulante et activité protéolytique ." Le lait V.57, (1998),300-317.
  
199. Andren A., "Rennets and coagulants ." in Encyclopedia of Dairy Science. Roginski H., Fuquay J. Fox P. Elsevier. (2002) pp281-286.
  
200. Claus, D. and Berkeley, R. C. W., "Genus *Bacillus*." In : P.H.A. Sneath et al. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. Vol. 2. Cohn , (1986) pp. 1105-1139.
  
201. Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Fakhfakh, N., Haddar, A., Manni, L. and Nasri, M., "Production and purification of a calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1." *J Ind Microbiol Biotechnol* ,V.32 ,(2005),186-194.
  
202. Nilegaonkar, S. S., Zambare, V. P., Kanekar, P. P., Dhakephalkar, P. K. and Sarnaik, S. S., "Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326." *Bioresour Technol* V.98, (2007),1238-1245.
  
203. Fukushima Y., Itoh H., Fukase T. and Motai H., "Stimulation of protease production by *Aspergillus oryzae* with oils continuous culture." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, V.34 ,(1990), 586-590.
  
204. Malathi S. and Chakraborty R., "Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under Solid-State Fermentation conditions for use as a depilation agent." *Appl. Environ. Microbiol.*,V.57,(1991),712-716.

205. Agrawal D., Patidar P., Banerjee T. and Patil S. , "Production of alkaline protease by *Aspergillus oryzae* under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis." *Process biochem.*, V.39,(2005),977-981.
206. Puris S., Beg O.K. et Gupta R., "Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* by reponse surface methodology." *Current Microbiology*, V.44 , (2002),286-290.
207. Kumar C.G. et Takagi H., "Microbiol Alkalines proteases from bio-industrial View Point ." *Biotechnology Advences*. V.17, (1999),561-594.
208. Mabrouk S.S., Hshiem A.M., El shayeb N.M.A, Ismail A.M.S et Abdel-Fattah A.F. "Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 ." *Bioresource Technology*, V.69, (2002), 155-159.
- 209 Boiing J.T.P., "Enzyme production Dans: Prescott et Dunn's indutstrial microbiology." Reed G. eds., AVI Publishing Company, Westport, Connecticut ,États-Unis, (1982),883 p.
210. Deutscher J., Galinier A. et Martin-Verstrate I , "Carbonhydrate uptake metabolism . Dans : *Bacillus* and its closest relatives: from gene to cells." , SNENSHEINA L., HOCH J.A. et LOSICK R., ASM Press, Washington .Etats unis (2002).pp 129-150.
- 211 Patel R., Dodia M. et Singh S.P., "Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. : production and optimization." *Process. Biochem.*, V.40,(2005),3569-3575.
212. Fisher S.M. et Débarbouillé M., "Nitrogen source utilization and its Regulation Dans : *Bacillus* and its closest relatives: from gene to cells." , SNENSHEINA L., HOCH J.A. et LOSICK R., ASM Press, Washington .Etats unis .(2002),pp 181-192.



213. Ellouz Y., Bayouhd S., Kammoun S. , Gharasallah N et Nasri M , "Prouduction of protease alkaline by *Bacillus substilis* grown on sardinelle head and viscera flour." *Bioressource Technology* .V.80, (2001), 49-51.
214. Kumar G et Parrack P., "Reaserch of a new low-cost substrate for alkaline protease production ." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.V.19, (2003),757-762.
215. Geisecke U.E ,Bierbaum G,Rudde H.,Spohn U. et Wandrey C., "Production of Alkaline protease whith *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process." *Applied Microbiology and Biotechnology* V.35,(1991), 720-724.
- 216 Sinha N et Satyanarayana T. , "Akaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*." *Indian Journal of Microbiology* V.31,N°4,(1991),425-430.
- 217 Calik P ,Calik G.et Ozdamart H. , "Oxygen transfer strategy and its regulation effect in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*". *Biotechnology and Bioengineering* V.69,N°3 (2000) ,301-311.
- 218 YEZZA A. ,Tyagi R.D. ,Valero J.R. Surampalli R.Y.et Smith J., "Scale up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material ", *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology* V.31.(2004),545- 552.
- 219 Hameed A,Keshavararz T. et Evans C., "Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2 for use in leather processing ". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* ,V.74 (1999).,5-8.
- 220 Calik P ,Pehlivan N.,Calik G.,Ozcelik L.S.et Ozdamart H. , "Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*" *Enzyme and. Microbial technology* V.31, (2004) ,685-697.

- 221 Beg Q.K., Saxena R.K et Gupta G., "De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under Fed-batch operations" *Process Biochemistry* V.37, (2002), 1103-1109.
- 222 Chu I.M., Lee C. et Li T.S. "Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416" *Enzyme and Microbiological Technology* V.14, (1992), 755-761.
- 223 Recueil des normes françaises, "Lait et produits laitiers. Méthodes d'analyse", AFNOR (eds.), Paris, France (1986).
- 224 Recueil des normes françaises, "Lait et produits laitiers. Standards et limites AFNOR (eds), Paris, France (1997).
- 225 Hardy J. "Les propriétés physicochimiques et organoleptiques du fromage in *Le Fromage*" Eck A. 2ème édition Tech. et Doc., France, (1987), 245p.
- 226 Lenoir J., Remeuf F. et Schneid N. "L'aptitude du lait à la coagulation par la présure" .In :Eck A. Gillis J.C., eds *Le fromage*, Troisième édition .Tech. et Doc. Lavoisier, Paris (1997).
- 227 Mahaut J., Jeantet C. et Brule M., "Initiation à la technologie fromagère" eds Tech et Docum Paris, (2003).