

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel
Faculté des Science Exactes et des
Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Moléculaire et Cellulaire



جامعة جيجل
كلية العلوم الدقيقة
وعلوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية
والخلوية

Mémoire de Fin D'études Pour L'obtention Du Diplôme Master 2 en Biologie

Option: Microbiologie Appliquée

Thème

*Optimisation de la production d'une enzyme
protéolytique par *Lactobacillus* sp. et caractérisation
de ses propriétés physicochimiques*

Membres du Jury :

Président : M^{me} Azzouz W.

Examinatrice : Dr. Laggoune S.

Encadreur : Dr. Ouled Haddar H.

Présenté par :

Herida Fatima

Kihal Ahlam

Promotion Juillet: 2011

Remerciements

Louange à Dieu créateur des cieux et de la terre, qui a révélé la science à notre Maître et Prophète Mohammed – que Dieu le bénisse et salue- pour qu'il fasse sortir les hommes des ténèbres vers la lumière, avec sa permission.

Nous remercions ALLAH qui nous a doté du courage, de la patience et de la volonté pour être sur le bon chemin.

Nous tenons à formuler notre gratitude et nos sincères remerciements à notre compétent encadreur Dr Ouled Haddar Houria pour son encadrement précieux, sa confiance, sa grande patience, sa disponibilité et l'aide précieuse qu'elle nous a toujours apporté avec bienveillance.

Nos remerciements vont également aux membres de jury qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail.

Nous somme très reconnaissantes envers Dr Sifour Mohamed et Dr Idoui Tayeb pour ses précieux aides et conseils.

Toutes nos gratitudes vont aussi à nos chers parents pour leur soutient tout au long de nos études et durant la réalisation de ce mémoire.

Nous souhaitons adresser nos remerciements à tous les étudiants de notre option «Master Microbiologie appliquée» de la promotion 2011.

A toute personne, qui nous a aidé à la finition de notre travail, de près ou de loin, nous disons merci.

Ahlam et Fatima

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

Aux êtres les plus chers à mon cœur,

Ma mère BOUABSA MASSIKA,

Mon père Mr. KIHAL NOUREDDINE,

*Qui m'ont toujours encouragé et soutenu tout au long de ces années
d'études.*

Pour tout l'amour qu'ils m'ont donné et qu'ils me donnent encore.

A mes frères IMAD et ILYES,

A mes sœurs MARIEM, ASMA, RANIA CHOROUK,

Qui je souhaite beaucoup de réussite dans leur vie.

Avec toute mon affection et mes remerciements.

AHLAM

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

Aux êtres les plus chers à mon cœur,

Ma mère SIFOUR ZAKIA,

Mon père Mr. HERIDA AMMAR,

*Qui m'ont toujours encouragé et soutenu tout au long de ces années
d'études.*

Pour tout l'amour qu'ils m'ont donné et qu'ils me donnent encore.

A mes frères FATEH, YASSINE et MOHAMED,

A mes sœurs RACHIDA et leur petite fille CHAYMOMA , SAMIRA,

AMAL, NASSIRA,

Qui je souhaite beaucoup de réussite dans leur vie.

Avec toute mon affection et mes remerciements.

FATIMA

Sommaire

	Page
<i>Introduction</i>	1
<i>I. Analyse bibliographique</i>	
<i>Chapitre I : Les protéases</i>	
I.1. Définitions.....	2
I.2. Origine des protéases.....	2
I.2.1. Les protéases microbiennes.....	3
I.2.1.1. Bactéries.....	3
I.2.1.2. Champignons.....	3
I.2.1.3. Virus.....	4
I.2.2. Les protéases animales.....	4
I.2.3. Les protéases végétales.....	4
I.3. Classification des protéases.....	4
I.3.1. Les exopeptidases.....	5
I.3.1.1. Les aminopeptidases.....	5
I.3.1.2. Les carboxypeptidases.....	5
I.3.2. Les endopeptidases.....	6
I.3.2.1. Les protéases à cystéine.....	6
I.3.2.2. Métalloprotéases.....	6
I.3.2.3. Les protéases aspartiques.....	6
I.3.2.4. Les protéases à sérines.....	6
<i>Chapitre II: La protéolyse des bactéries lactiques</i>	
II.1. Bactéries lactiques.....	7
II.2. Classification des bactéries lactiques.....	7
II.3. Les Lactobacilles.....	8
II.4. Classification des <i>Lactobacillus</i>	8
II.5. Le système protéolytique des bactéries lactiques.....	9
II.5.1. La protéolyse du lait.....	9
II.5.2. Types d'enzymes protéolytiques rencontrées chez les bactéries lactiques et leur localisation cellulaire.....	9
II.5.2.1. Les protéases liées à la paroi ou à l'enveloppe.....	9
II.5.2.2. Les protéases intracellulaires.....	10
II.5.2.3. Les protéases extracellulaires.....	11
II.6. Fonction de la protéolyse chez les bactéries lactiques.....	11
II.7. Régulation du système protéolytique et l'ingénierie de la protéolyse.....	11

Chapitre III : Les applications industrielles des protéases

III.1. Industrie alimentaire.....	12
III.1.1. Industrie laitière.....	12
III.1.2. Boulangerie.....	12
III.1.3. Fabrication de produits à base de soja et hydrolysats des protéases.....	13
III.1.4. Attendrissement de viande et de poisson	13
III.1.5. Synthèse de l'aspartame.....	14
III.1.6. Alimentation animale.....	14
III.1.7. Vinification	14
III.2. Tannerie	14
III.3. Détergent	14
III.4. Industrie pharmaceutique et médicale.....	15
III.5. Industrie cosmétique.....	15
III.6. Traitement des eaux usées industrielles.....	15

II. Etude expérimentale

I. Matériels et Méthodes.....	16
I.1. Matériels.....	16
I.1.1. Matériels biologiques.....	16
I.1.2. Milieux de cultures.....	16
I.1.3. Réactifs et solutions.....	16
I.1.4. Appareillages.....	17
I.2. Méthodes.....	17
I.2.1. Revivification.....	17
I.2.2. Purification.....	17
I.2.3. Mise en évidence du caractère protéolytique des lactobacilles.....	17
I.2.4. Le screening des souches les plus protéolytiques.....	18
I.2.5. Effet du milieu de culture sur la production de l'activité protéolytique.....	19
I.2.5.1. Effet du pH sur la production de protéase sur milieu MRS et RSM.....	19
I.2.5.2. Effet de la température sur la production de protéase sur milieu MRS et RSM.....	19
I.2.6. Suivi de la croissance et de l'activité spécifique pendant 9 heures.....	20
I.2.7. Suivi de la croissance et de l'activité spécifique pendant 4 jours.....	20
I.2.8. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	20
I.2.9. Les caractéristiques physicochimiques de l'enzyme brute.....	20
I.2.9.1. Effet de pH sur l'activité protéolytique.....	20
I.2.9.2. Effet de la température sur l'activité protéolytique.....	20

I.2.9.3. Effet des ions métalliques sur l'activité protéolytique.....	21
I.2.9.4. Effet de l'EDTA sur l'activité protéolytique.....	21
II. Résultats et discussion	
II. 1. Mise en évidence du caractère protéolytique des lactobacilles.....	22
II. 2. Screening des souches les plus protéolytiques.....	23
II. 3. L'optimisation de la production des protéases.....	25
II. 3. 1. Sélection du milieu de culture favorable à la production de protéase.....	25
II. 3. 2. Effet du pH sur la production de protéase sur milieu MRS et RSM.....	28
II. 3. 3. Effet de la température sur la production de protéase sur milieu MRS et RSM.....	30
II. 4. Suivi de la croissance et de l'activité spécifique pendant 9 heures.....	32
II. 5. Suivi de la croissance et de l'activité spécifique pendant 96h.....	34
II. 6. Précipitation au sulfate d'ammonium à 75% de saturation.....	35
II. 7. Les caractéristiques physicochimiques de l'enzyme brute.....	36
II. 7.1. Effet du pH sur l'activité protéolytique.....	36
II. 7.2. Effet de la température sur l'activité protéolytique.....	38
II. 7.3. Effet des ions métalliques sur l'activité protéolytique.....	38
II. 7. 4. Effet de l'EDTA sur l'activité protéolytique.....	40
Conclusion.....	42
Références bibliographiques.....	43
Annexes	

LISTE DES ABREVIATIONS

BSA: Bovine Serum Albumin.

DFP: Drisopropyl-Fluoro-Phosphate.

EDTA: Ethylene-Diamine-Tetra-Acide acétique.

G+C% ou **GC%**: Pourcentage en Guanine et Cytosine.

Lb: *Lactobacillus*.

Lb. d (S1): *Lb. delbruekii ssp. bulgaricus*.

Lb. v (S3): *Lb. viridescens*.

Lc: *Lactococcus*.

MM: Milieu Minimum.

MM+F: Milieu Minimum additionné de Fructose.

MM+G: Milieu Minimum additionné de Glucose.

MM+L: Milieu Minimum additionné de Lactose.

MM+M: Milieu Minimum additionné de Maltose.

MM+P: Milieu Minimum additionné de Peptone.

MRS: Man Rogosa et Sharp.

PL: Milieu Lait en Poudre.

PMSF: Fluorure-Phényle-MéthylSulfonyle.

RSM: Reconstituted Skimmed Milk.

St: *Streptococcus*.

TCA: Acide Trichloroacétique.

UFC: Unité Formant Colonie.

V: Volume.

YMA: Yeast Manitol Agar.

LISTE DES TABLEAUX

	<i>Page</i>
Tableau 1: Les différentes origines de protéases.....	3
Tableau 2 : Les différents groupes du Genre <i>Lactobacillus</i> et leurs principales caractéristiques..	8
Tableau 3 : Protéases commerciales d'origine bactérienne, applications et fournisseurs industriels.....	12
Tableau 4: Les souches de <i>Lactobacillus</i> testés pour leur activité protéolytique.....	16
Tableau 5: Screening primaire de la production de l'activité protéolytique par les lactobacilles sur gélose MRS-Lait écrémé (2%) après 48.....	22
Tableau 6 : Screening secondaire des souches les plus protéolytiques.....	25
Tableau 7: L'effet de différents milieux de culture sur la production de protéase par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1).....	26
Tableau 8: L'effet de différents milieux de culture sur la production de protéase par <i>Lb. viridescens</i> (S3).....	26
Tableau 9: L'effet du pH sur la production des protéases par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3) dans le milieu MRS.....	28
Tableau 10: L'effet du pH sur la production des protéases par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3) dans le milieu RSM.....	28
Tableau 11 : L'effet de la température sur la production des protéases chez <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3) sur le milieu MRS.....	30
Tableau 12 : L'effet de la température sur la production des protéases chez <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3) sur le milieu RSM.....	30
Tableau 13 : Le suivi de la production de protéase durant 9h chez <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) dans le milieu MRS.....	32
Tableau 14 : Le suivi de la production de protéase durant 9h chez <i>Lb. Viridescens</i> (S3) dans le milieu MRS.....	33
Tableau15: Suivie de la production des protéases par <i>Lb. delbrueckii ssp bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3) pendant 96 h dans le milieu MRS.....	34
Tableau 16: Précipitation au sulfate d'ammonium (NH ₄) ₂ SO ₄ à 75% de saturation.....	35
Tableau17: L'effet du pH sur l'activité des protéases produites par <i>Lb. delbrueckii ssp bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3).....	37
Tableau 18: L'effet de la température sur l'activité des protéases produites par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3).....	38
Tableau 19: L'effet des ions métalliques sur l'activité des protéases produites par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3).....	39

Tableau 20: L'effet de l'EDTA sur l'activité protéasique de protéase produite par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3).....40

LISTE DES FIGURES

	<i>Page</i>
Figure 1: La contribution des différentes enzymes dans la vente mondiale totale des enzymes...	2
Figure 2 : Classification des protéases.....	5
Figure 3 : Schéma récapitulatif de la protéolyse de lait par les bactéries lactiques.....	9
Figure 4 : Représentation schématique des protéases de parois.....	10
Figure 5 : L'effet de quelques souches de <i>Lactobacillus</i> étudiées sur milieu MRS au lait écrémé (2%).....	23
Figure 6: Courbe d'étalonnage de la tyrosine pour l'essai enzymatique.....	24
Figure 7: Courbe d'étalonnage de la BSA pour la détermination de la concentration en protéine par la méthode de Bradford.....	24
Figure 8: L'effet de différents milieux de culture sur la production de protéase par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1).....	26
Figure 9: L'effet de différents milieux de culture sur la production de protéase par <i>Lb. viridescens</i> (S3).....	27
Figure 10: L'effet du pH sur la production des protéases sur milieu MRS par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i>	28
Figure 11: L'effet du pH sur la production des protéases sur milieu RSM par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i>	28
Figure 12: L'effet de la température sur la production des protéases chez <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3) sur milieu MRS.....	31
Figure 13: L'effet de la température sur la production de protéase chez <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3) sur milieu RSM.....	31
Figure 14 : Le suivi de la production de protéase durant 9h chez <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) dans le milieu MRS.....	32
Figure 15: Le suivi de la production de protéase durant 9h chez <i>Lb. viridescens</i> (S3) dans le milieu MRS.....	33
Figure 16: Suivi de la production des protéases par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3) pendant 96 h dans le milieu MRS.....	34
Figure 17: Précipitation au sulfate d'ammonium (NH ₄) ₂ SO ₄ à 75% de saturation.....	36
Figure 18: L'effet du pH sur l'activité des protéases produites par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i>	37
Figure 19: L'effet de la température sur l'activité des protéases produites par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3).....	38
Figure 20: L'effet des ions métalliques sur l'activité protéasique de protéase produite par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1).....	39

Figure 21: L'effet des ions métalliques sur l'activité protéasique de protéase produite par <i>Lb. viridescens</i> (S3).....	40
Figure 22: L'effet de l'EDTA sur l'activité protéasique de protéase produite par <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1) et <i>Lb. viridescens</i> (S3).....	41

Introduction

Le terme « protéase » désigne toute enzyme capable de catalyser la réaction d'hydrolyse de la liaison peptidique par une réaction nommée protéolyse (*Beg et al., 2002; Gupta et al., 2002a; Saxena et Singh, 2010*).

Les protéases jouent un rôle crucial dans le métabolisme des organismes, elles sont présentes dans une diversité d'organismes inférieurs (virus, bactéries, champignons, protozoaires) et supérieurs (plantes et animaux) (*Rao et al. 1998*).

En général, les micro-organismes représentent la source la plus importante de protéases, comme ils peuvent être cultivés à grande échelle dans un temps relativement court par les méthodes de fermentation, ils fournissent également une variété abondante et régulière de produits désirés. Par ailleurs, les protéines microbiennes ont une longue durée de vie et peuvent être stockées dans des conditions moins idéales pendant des semaines sans perte significative de l'activité (*Gupta et al., 2002b*).

Les microorganismes élaborent plusieurs types de protéases, qui sont soit intracellulaires et / ou extracellulaires. Les protéases intracellulaires sont importantes pour divers processus cellulaires et métaboliques, tels que la sporulation et la différenciation, le renouvellement des protéines, la maturation des enzymes et des hormones. Certaines protéases extracellulaires sont importantes pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement extracellulaire et permettent aux germes d'absorber et d'utiliser les produits d'hydrolyse (*Gupta et al., 2002b*), tandis que les autres sont des toxines ou des facteurs impliqués dans la virulence (*Wendersman, 1989*).

En plus de leur rôle dans le métabolisme protidique, les protéases ont gagné un grand intérêt dans le domaine industriel, parmi les enzymes présentes dans le marché mondial, de 40-50% des enzymes commercialisées sont des protéases provenant de différents microorganismes (*Rajendran et Thangavelu, 2008*).

Les protéases de divers types ont trouvé des applications dans différentes industries, particulièrement, celle de détergents, l'industrie alimentaire, pharmaceutique, médicale, l'industrie de cuir, et même dans les processus de biorémediation (*Rao et al., 1998; Thys et al., 2005; Sangeetha et al., 2008*).

Le choix de ce thème a été imposé par le fait que la plupart des études rapportées concernaient la production à partir des bactéries du genre *Bacillus*, de quelques Actinomycètes et de quelques champignons; les protéases des bactéries lactiques sont, en revanche, rarement documentées.

Le présent travail vise à sélectionner les souches de *Lactobacillus* qui ont la capacité de produire des protéases extracellulaires. En plus, l'optimisation des facteurs affectant la production est considérée. L'objectif sera étendu à purifier partiellement l'enzyme protéolytique et de la caractériser.

Analyse bibliographique

Chapitre I
Les protéases

I.1.Définitions

Historiquement, le terme avait une signification légèrement différente, bien que les termes « protéase » et « protéinase » sont souvent utilisés de façon interchangeable, certains scientifiques ont souligné que le dernier terme concerne les endopeptidases mais pas les exopeptidases, alors que le Comité la nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (NC-IUBMB) recommande le terme peptidase comme terme général pour toutes les enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques (*Chomsri, 2008*).

Les protéases (EC 3.4.21. et 99, peptidyl-peptide hydrolase) sont des enzymes qui hydrolysent la liaison peptidique dans une molécule protéique par un mécanisme appelé protéolyse, elles sont communément appelées protéases, peptidases et protéinases, ou enzymes protéolytiques. (*Beg et al., 2002; Gupta et al., 2003; Saxena et Singh, 2010; Gupta et al., 2002a*), des protéines simples, des peptides et des acides aminés libres sont les produits issus de cette réaction (*Ul-hak et Mukhtar, 2006*).

L'étude des enzymes protéolytiques présente un grand intérêt, non seulement en raison de leur rôle important dans le métabolisme cellulaire, mais parcequ'elles ont également gagnés une attention considérable dans la communauté industrielle (*Gupta et al., 2002a*). Elles constituent l'un des trois plus grands groupes d'enzymes industrielles, et représentent environ 60% des ventes mondiales totale (figure 1) (*Rao et al., 1998; Ul-hak et al., 2003; El enchasy et al., 2008; Chellapandi, 2009; Gaur et al., 2010*).

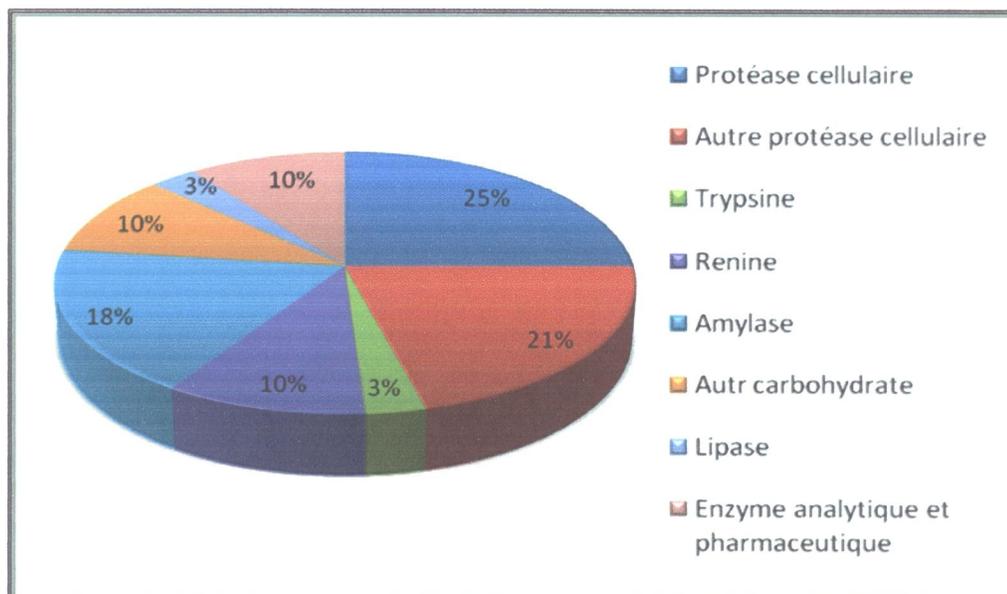


Figure 1: La contribution des différentes enzymes dans la vente mondiale totale des enzymes. (*Rao et al., 1998*)

I. 2. Origine des protéases

Les protéases sont physiologiquement nécessaires pour les organismes vivants, elles sont ubiquitaires, trouvées dans une grande diversité d'organismes vivants tels que les plantes, les animaux et les microorganismes (*Rao et al., 1998; Coral et al., 2003; Raimi et al., 2010*), les protozoaires, les insectes et les helminthes (*Joo et al., 2007*). Le tableau 1 regroupe quelques protéases d'origines différentes.

Tableau 1: Les différentes origines de protéases.

Source		Protéase	Référence
Microbienne	Champignons	<i>Aspergillus niger</i>	Protéase acide <i>Siala et al., 2009</i>
		<i>Conidibolus coranatus</i>	Protéase alcalaine <i>Raimi et al., 2010</i>
	Levure	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aminopeptidase Carboxypeptidase <i>Chomsri, 2008</i>
	Bactéries	<i>Lactobacillus homohiochii</i>	Metalloprotease <i>Pereira et al., 2001</i>
<i>Bacillus subtilis</i>		Protease à serine <i>Gupta et al., 2002a</i>	
Virus	HIV-1		<i>Yahi et al., 1999</i>
Végétale		<i>Carica papaya</i>	Papaïne <i>Rao et al., 1998</i>
		<i>Ficus glabrata</i>	Ficine <i>Meunier, 1999</i>
		<i>Ananas comorus</i>	Bromelaine <i>Meunier, 1999</i>
Animale	Pancréas		Chymotrypsine <i>Rao et al., 1998</i>
		Estomac	

I.2.1. Les protéases microbiennes

Les microbes représentent une excellente source de protéases en raison de leurs croissance rapide (*Rao et al., 1998; Gaur et al., 2010*), de leur large diversité biochimique, et de leur susceptibilité à la manipulation génétique, les enzymes d'origine microbienne possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour des applications biotechnologiques (*Gupta et al., 2002a; Coral et al., 2003*), ce qui les rend préférées aux enzymes d'origine végétale et animale (*Krishna et al., 2009*). Les protéases microbiennes représentent environ 40% du totale des ventes mondiales d'enzymes (*Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002a*). Elles peuvent être produites par les bactéries, les champignons, les levures (*El enchasy et al., 2008*), et les virus (*Joo et al., 2007*), ces protéases sont de plus en plus étudiées à cause de leurs importance et de leurs applications ultérieurs dans l'industrie et la biotechnologie (*Krishna et al., 2009*).

I.2.1.1. Bactéries

Les protéases bactériennes sont les plus importantes par rapport aux protéases animales et fongiques. Parmi les bactéries, les espèces de *Bacillus* sont les producteurs spécifiques de protéases extracellulaires (*Das et Parasad, 2010*). Les protéases bactériennes neutres sont actives dans une gamme de pH étroit (pH 5 à 8), et ont une faible thermotolérance, tandis que les protéases bactériennes alcalines sont caractérisées par leur haute activité à pH alcalin, leur température optimale se situe autours de 60C° (*Rao et al., 1998*). Un grand nombre de protéases bactériennes a été découvert, purifié et caractérisé, mais très peu d'entre elles sont utilisées dans des procédés industriels à grande échelle en raison de leur coût élevé, la difficulté lors de la purification et surtout la nature fragile de ces enzymes (*Kumar et al., 2008*).

I.2.1.2. Champignons

Les champignons élaborent une plus grande variété d'enzymes que les bactéries (*Rao et al., 1998*). Un nombre considérable d'espèces d'*Aspergillus* sont connus pour leur production des protéases extracellulaires tels que *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. awamori* et *A. fumigatus*. Ces enzymes sont généralement extracellulaires isolées du milieu de culture sous forme active et

certaines d'entre elles sont disponibles à l'échelle commerciale (*Siala et al., 2009*) telles que l'*Aspergillopetidase A*[®] (*Meunier, 1999*). Les protéases fongiques sont actives sur une large gamme de pH 4 à 11 et présentent une large spécificité de substrats (*Rao et al., 1998*).

I.2.1.3. Virus

Les protéases virales ont une grande importance en raison de leur implication fonctionnelle dans les traitements contre les virus qui causent certaines maladies mortelles comme le Sida et le Cancer. Les protéases à sérines, aspartiques, cystéines, et les peptidases sont trouvées dans différents virus (*Rao et al., 1998*).

I.2.2. Les protéases animales

Les protéases les plus familières d'origines animales sont les trypsines, les chymotrypsines, les pepsines et les rénines. La trypsine est la principale enzyme digestive intestinale responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires. La chymotrypsine se trouve dans l'extrait pancréatique chez l'animal. La pepsine est une protéase acide qui se trouve dans l'estomac de tous les vertébrés. La rénine est une protéase qui est produite comme un précurseur inactif, la prorénine, dans l'estomac des mammifères, elle est convertie en rénine active par l'action de la pepsine (*Rao et al., 1998; Gençkal, 2004*).

I.2.3. Les protéases végétales

L'utilisation des plantes comme source de protéase est régie par plusieurs facteurs tels que la disponibilité des terres pour la culture et les conditions climatiques adéquates pour la croissance. En outre, la production de protéases à partir des plantes est un processus fastidieux (*Rao et al., 1998; Gençkal, 2004*). Les protéases d'origine végétale ont des applications dans l'industrie alimentaire et l'industrie des détergents (*Gaur et al., 2010*). La papaïne extraite d'une plante équatoriale et tropicale (*Carica papaya*), la bromélaïne isolée de l'ananas (*Ananas comorus*), la ficine issue de la figue (*Ficus carica*) (*Meunier, 1999*) et la kératinases produite par certaines groupes botaniques pour dégrader la kératine. Ces enzymes représentent quelques une des protéases végétales bien connues (*Rao et al., 1998*).

I.3. Classification des protéases

Selon le Comité de la Nomenclature de l'Union Internationale de la Biochimie et la Biologie Moléculaire; les protéases sont classées dans le sous groupe 4 du groupe 3 (Hydrolases) (*Rao et al., 1998; Chomsri, 2008; Krishna et al., 2009*).

Les protéases peuvent être classées selon trois critères majeurs:

- (i) La réaction catalysée;
- (ii) La nature chimique du site catalytique et
- (iii) La relation évolutive par référence à la structure (*Rao et al., 1998*).

Les protéases sont généralement divisées en deux groupes principaux : les exopeptidases (peptidases) et les endopeptidases (protéinases), selon leur site d'action sur les substrats protéiques (*Rao et al., 1998*). En outre, elles sont considérées comme protéases à serine (EC 3,4,21), protéases à cystéines (EC 3,4,22), protéases aspartiques (EC 3,4,23) et métallo-protéases (EC 3,4,24) sur la base du groupe fonctionnel présent dans le site actif (*Chomsri, 2008*). Elles sont également classées en différentes familles en fonction de leurs séquences en acides aminés, selon le pH optimal de leurs activités elles sont appelées protéases acides, neutres ou alcalines (*Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002a; Coral et al., 2003*). La figure 2 résume les différentes classes des protéases.

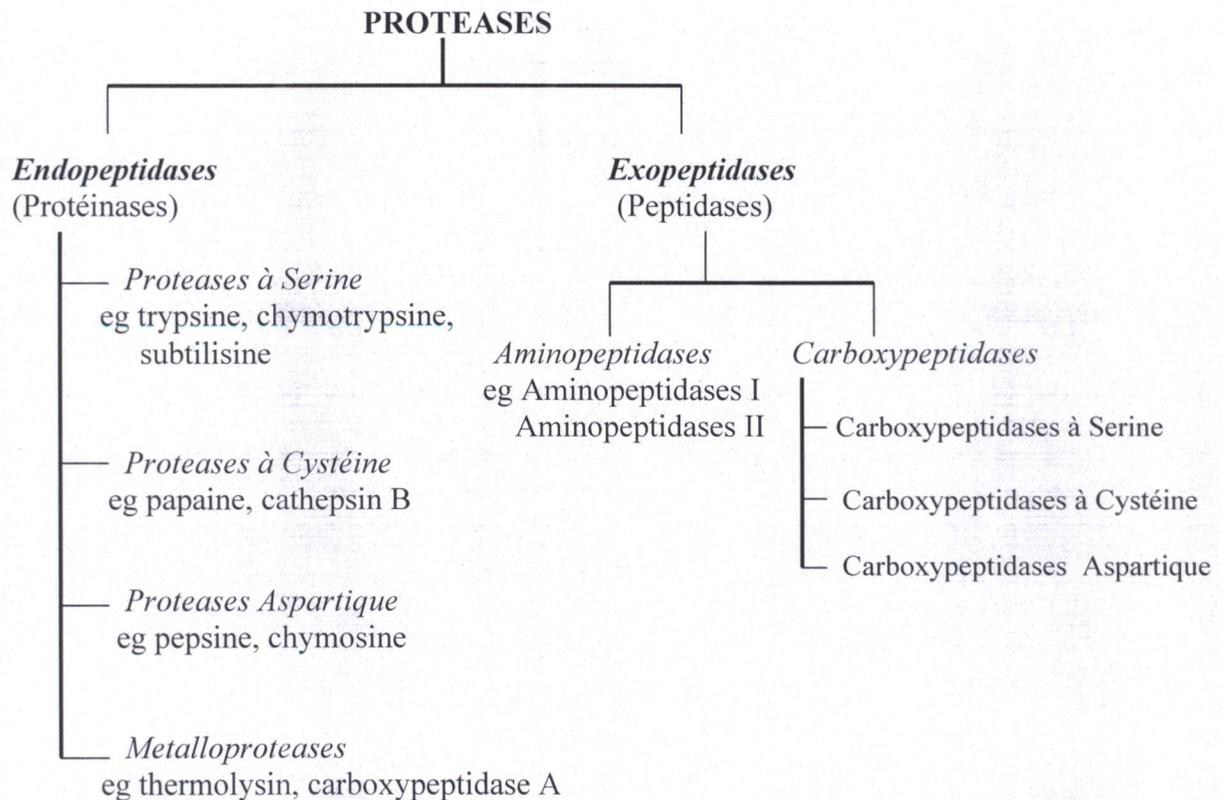


Figure 2: Classification des protéases (*Rao et al., 1998*).

I.3.1. Les exopeptidases

Les exopeptidases sont des protéases qui hydrolysent les liaisons peptidiques proche des extrémités N ou C- terminales des protéines (*Hase et Finkelstein, 1993; Chomsri, 2008*). Il existe deux classes d'exopeptidases : les aminopeptidases et les carboxypeptidases (*Rao et al., 1998; Chomsri, 2008*).

I.3.1.1. Les aminopeptidases

Les aminopeptidases agissent près de l'extrémité N- terminale des protéines. Elles libèrent ainsi un seul acide aminé, un dipeptide, ou tripeptide, d'où les sous classes (*Chomsri, 2008*). Beaucoup d'aminopeptidases sont spécifiques pour la libération du résidu méthionine, en position N- terminale et qui est retrouvé dans les protéines recombinantes mais pas dans les protéines matures d'origine naturelle. Les aminopeptidases sont produites par de nombreuses espèces microbiennes y compris les bactéries et les champignons. En général, se sont des enzymes intracellulaires (*Rao et al., 1998; Gençkal, 2004*).

I.3.1.2. Les carboxypeptidases

Les carboxypeptidases sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité C-terminale des protéines, libérant ainsi un seul acide aminé ou un dipeptide. Elles sont divisées en trois sous classes, soit (i) les serines carboxypeptidases, (ii) les metallo-carboxypeptidases et (iii) les cystéines carboxypeptidases, selon la nature des acides aminés présents au site actif de l'enzyme et selon leur mécanisme catalytique (*Gençkal, 2004*).

I.3.2. Les endopeptidases

Les endopeptidases sont caractérisées par leur action préférentielle au niveau de la liaison peptidique dans les sites internes de la chaîne polypeptidique loin des extrémités N et C-terminale. La présence d'un groupement amino ou carboxyl libre peut avoir un effet répressur sur l'activité de ces protéases. Les endopeptidases sont divisées en 4 classes selon leur mécanisme catalytique, (i) les protéases à cystéines, (ii) les métalloprotéases, (iii) les protéases aspartiques et (iv) les protéases à sérines (*Rao et al., 1998*).

I.3.2.1. Les protéases à cystéine

Les protéases à cystéine, ou thiols sont présentées autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. La plupart de ces protéases ont un pH optimum neutre et sont activées seulement en présence d'agents réducteurs comme la cystéine ou l'acide cyanhydrique (HCN). Leur activité est inhibée en présence d'agents sulfhydryles telque le p-chloromercuribenzoate (PCMB). Ces enzymes protéolytiques peuvent être classé en vingt familles différentes comme la famille de la papaine, la clapaïne, la clostripaïne et la streptopaïne (*Rao et al., 1998; Gençkal, 2004; Joo et al., 2007*).

I.3.2.2. Métalloprotéases :

Les métalloprotéases forment un groupe de protéases très varié, elles sont caractérisées par l'exigence d'un ion métallique divalent, le plus souvent le Zn^{2+} , nécessaire pour leur activité. Sur la base de la spécificité de leur action, les métalloprotéases peuvent être divisées en quatre groupes : (i) neutres, (ii) alcalines, (iii) Myxobacter I et (iv) Myxobacter II. Ces protéases sont inhibées par des agents chélateurs forts tel que l'Ethylenediaminetetra-acide acétique (EDTA), mais pas par des agents sulfhydryle ou le drisopropylfluorophosphate DFP (*Rao et al., 1998*).

I.3.2.3. Les protéases aspartiques

Les protéases aspartiques, également connues sous le nom de protéases acides, sont des protéases dont l'activité catalytique dépend d'un résidu acide aspartique présent au site actif de l'enzyme. Elles sont regroupées en trois familles, à savoir, (i) la pepsine (ii) retropepsine, (iii) les enzymes des pararétrovirus. La plupart des protéases aspartiques ont une activité maximale à faibles pH, généralement entre 3 et 4, leur masse moléculaire est de l'ordre de 30 à 45 KD. Elles sont inhibées par la pepstatine (*Rao et al., 1998; Gençkal, 2004*).

I.3.2.4. Les protéases à sérines

Les protéases à sérines sont caractérisées par la présence d'un résidu sérine dans leur site actif. Elles sont présentes chez les virus, les bactéries et les eucaryotes ce qui suggère qu'elles sont essentielles pour les organismes. Elles sont divisées en trois groupes selon leur site d'attaque sur les protéines : (i) les protéases à sérine de type trypsine, qui hydrolysent les protéines après un résidu chargé positivement, (ii) les protéases à sérine de type chymotrypsine, qui hydrolysent les protéines après un résidu hydrophobe de haut poids moléculaire, et (iii) les protéases à sérine de type élastase, hydrolysent les protéines après un résidu hydrophobe de faible poids moléculaire. Ces protéases sont inhibées par le (DFP) et le fluorure phényle- méthylsulfonyle (PMSF) et d'autres, elles sont généralement actives à pH neutre ou alcalin, avec un optimum entre pH 7 et 11; en outre, ces enzymes ont une large spécificité de substrats, y compris l'activité estérolytiques et amidases, leur masse moléculaire est comprise entre 18 et 35 KD (*Rao et al., 1998; Gençkal et al., 2004*).

Chapitre II

*La protéolyse des bactéries
lactiques*

II.1. Bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques a été défini pour la première fois par ORLA-JENSEN en 1919, il est appelé: les bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique, elles peuvent avoir des formes de coques ou de bâtonnets (*Leveau et Bouix, 1993*).

Les bactéries lactiques sont généralement Gram positives, immobiles, jamais sporulées, anaérobies mais aérotoles, et ne possédant pas de catalase (certaines souches possèdent une pseudocatalase), de nitrate réductase et de cytochrome oxydase. Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui, en utilisant les glucides, elles peuvent produire soit de :

- l'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes),
- l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives),
- l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et de CO₂ (bactéries hétérolactiques) (*Leveau et Bouix, 1993; Pot, 2008*).

Ce groupe bactérien est un vaste ensemble de microorganismes procaryotes qui se rattachent à deux phylums :

- le phylum des *Clostridium* ; dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de G+C inférieur à 50%
- le phylum des *Actinomycetes* ; dont l'ADN des chromosomes contient un pourcentage de G+C supérieur à 50% (*Leveau et Bouix, 1993; Pot, 2008*). La plupart des bactéries lactiques participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires fermentés, pour lesquels elles jouent plusieurs rôles relatifs aux caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et sanitaires de l'aliment (*Pilet et al., 1998*).

Très largement répandues, les bactéries lactiques se développent dans tous les habitats où elles disposeront de glucides en abondance, de produits de dégradation des protéines ; d'acides nucléiques et de vitamines (*Leclerc et al., 1994*). Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore humaine et animale (*Dortu et Thonart, 2009*).

II.2. Classification des bactéries lactiques

La production d'acide lactique dans la fermentation anaérobie des sucres est un caractère biochimique important dans la classification des bactéries lactiques ainsi que leur morphologie (*Leveau et al., 1993*).

D'après Orla-Jensen, sept Genres principaux constituent les groupes des bactéries lactiques (*Pilet et al., 1998*) à savoir :

<i>Lactobacillus</i>	<i>Carnobacterium</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Pediococcus</i>	

Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme un Genre de bactéries lactiques (*Pilet et al., 1998*).

Actuellement, *Dortu et Thonart (2009)* regroupent les bactéries lactiques en treize Genres bactériens différents :

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Vogococcus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Carnobacterium</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>
<i>Weissella</i>			

II.3. Les Lactobacilles

Le Genre *Lactobacillus*, a été proposé par Beijerinck en 1901. Il est le Genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries, elles sont parfois rencontrées comme contaminants (Pot, 2008). Les *Lactobacillus* ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, vitamines et acides gras, nucléotides, peptides et glucides (Khalid et Marth, 1990; Leclerc et al., 1994). Ils sont acidophiles, généralement peu protéolytiques et lipolytiques (Guiraud, 1998; Guiraud et Rosec, 2004). Leur G+C% est compris entre 32 et 53 selon les espèces (Leclerc et al., 1994). Ils sont caractérisés par des cellules en formes de bâtonnets souvent regroupés en chaînes (Leveau et Bouix, 1993). Gram positif, asporulés, indoles et H₂S négatifs, ils ne réduisent généralement pas les nitrates, ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent ni catalase ni cytochrome (Larpen, 2000; Joffin et Leyral, 2001).

Les Lactobacilles sont habituellement immobiles ou quelquefois mobiles pas cils péritriches, microaérophiles, mésophiles ou thermophiles modérés mais certaines espèces comme *Lb. viridescence* et *Lb. plantarum* peuvent se multiplier lentement à température de réfrigération, ils se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C (Leclerc et al., 1994). Ces bactéries croissent à des pH plus bas que les Streptocoques; elles ne se développent pas pendant les premiers stades de la fermentation; mais seulement quand le pH atteint 5,5 à 6, à leur tour elles continuent à produire de l'acide lactique et abaisser le pH au dessous de 5 (Perry et al., 2004). Les *Lactobacillus* se trouvent dans la nature, à la surface des plantes, dans les produits laitiers, les viandes, l'eau, la bière. Dans les fruits et les légumes, en plus, plusieurs espèces sont présentes naturellement chez l'Homme et constituant la flore intestinale normale (Silva et al., 1986).

II.4. Classification des Lactobacillus

Le Genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel : (Guiraud et Rosec, 2004; Guiraud, 1998), le tableau 02 récapitule les différents groupes du Genre *Lactobacillus* et leurs principales caractéristiques.

Tableau 02 : Les différents groupes du Genre *Lactobacillus* et leurs principales caractéristiques (Leveau et Bouix, 1993; Guiraud, 1998; Guiraud et Rosec, 2004; Federighi et al., 2005).

Groupe	Caractéristiques	Espèces rencontrés	Habitat
Thermobactérium	<p>bacilles droites, homofermentaires thermophiles.</p> <p>se développent à 45°C mais pas à 15°C.</p>	<p><i>Lb. helveticus</i></p> <p><i>Lb. jugurti</i></p> <p><i>Lb. bulgaricus</i></p> <p><i>Lb. lactis</i></p> <p><i>Lb. delbrueckii</i></p> <p><i>Lb. acidophilus</i></p>	<p>lait, produits laitiers, animaux, Homme, bouche et végétaux</p>
Streptobactérium	<p>bacilles courtes, souvent arrangées en filament, homofermentaires, mésophiles se développent à 15°C</p> <p>ils peuvent être occasionnellement hétéro fermentaires en fonction du substrat.</p>	<p><i>Lb. baravicus</i></p> <p><i>Lb. plantarum</i></p> <p><i>Lb. curvatus</i></p> <p><i>Lb. casei</i></p> <p><i>Lb. sakei</i></p>	<p>bouche, fourrages, produits carnés, végétaux, produits laitiers et fromage</p>
Betabactérium	<p>bacilles hétérofermentaires</p> <p>cellules sont courtes, droites et séparées</p>	<p><i>Lb. viridescens</i></p> <p><i>Lb. bechneri</i></p> <p><i>Lb. fermentum</i></p> <p><i>Lb. brevis</i></p>	<p>produits laitiers et carnés, tube digestif de l'Homme, végétaux</p>

II.5.2.3. Les protéases extracellulaires

Il est parfois difficile de démontrer le caractère extracellulaire d'une enzyme, en effet pour les bactéries lactiques le système protéolytique est mieux étudié chez *Lc. lactis*. A l'exception de la souche ML1 de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* qui posséderait une protéase extracellulaire libérée dans le milieu, les protéases étudiées sont liées à la paroi. Ainsi chez les Lactobacilles, la souche *Lb. helveticus* CP790 excrète une protéase à sérine de faible taille dans le milieu de culture (*Leveau et Bouix, 1993; Vermeulen et al., 2005; Monnet et al., 2008*).

II.6. Fonction de la protéolyse chez les bactéries lactiques

La protéolyse bactérienne joue un rôle clé dans plusieurs processus biologiques chez les bactéries : nutrition azotée, virulence, turn-over protéique, activations, dégradation de protéines non conformes sporulation, sécrétion etc.... En effet la machinerie protéolytique est constituée d'un ensemble d'enzymes qui diffèrent par leur mécanisme catalytique, leur spécificité d'hydrolyse, leur localisation cellulaire et leur rôle (*López Kleine, 2008*).

Dans le domaine de la nutrition azotée, les bactéries lactiques présentent toutes des exigences en acides aminés, plus ou moins prononcées selon les Genres, les espèces et même selon les souches; du fait de leurs nombreuses auxotrophies pour les acides aminés et la pauvreté du lait en acides aminés, la croissance des bactéries dans ce milieu repose en grande partie sur leur système protéolytique, ce système multi-protéique conduit à la libération d'acides aminés disponibles pour la synthèse protéique, et assure la libération de l'ensemble des acides aminés à partir des peptides et donc permettre la croissance des bactéries en particulier dans le lait (*Monnet et al., 2008*).

II.7. Régulation du système protéolytique et l'ingénierie de la protéolyse

La régulation du métabolisme protéolytique a été principalement étudiée chez *Lc. lactis*, l'espèce bactérienne considérée comme le modèle d'étude des bactéries lactiques (*Renault, 2008*). La composition du milieu de croissance et les conditions de culture peuvent modifier l'activité protéolytique totale ou activer/inhiber une activité protéasique ou peptidasique donnée (*Desmazeaud, 1983*).

En particulier, la croissance sur les milieux de laboratoire riches en acides aminés et en peptides diminue fortement l'activité des protéases de la paroi, mais pas celle des peptidases. Cette inhibition résulterait d'une concentration trop faible en Ca^{2+} et de l'action répressive des acides aminés et surtout des peptides. Ce phénomène est en accord avec l'utilisation tardive des protéines du lait après la disparition des acides aminés et des peptides. Cette répression serait double: il y aurait d'abord répression de la transcription des gènes spécifiques des protéases de paroi et ensuite de la traduction des ARN messagers produits qui sont supposés être stables. Les études menées jusqu'à présent concernant l'ingénierie de la protéolyse chez les bactéries lactiques l'ont été dans le but, d'une part, de mieux comprendre la spécificité d'hydrolyse des peptides et protéases et, d'autre part, de moduler la protéolyse dans les produits laitiers. Ainsi, des enzymes protéolytiques ont été modifiées par mutagenèse afin de modifier leur spécificité d'hydrolyse. L'introduction de substitutions, de délétions ou d'insertion dans le gène *prtP* codant la protéase de paroi de *Lc. lactis* a permis d'en modifier leur spécificité de substrat. D'autre part, la protéolyse peut être modifiée dans les produits laitiers afin d'accélérer l'affinage des fromages et/ou d'en intensifier ou en modifier la saveur, mais également d'orienter la protéolyse dans des laits fermentés vers la production de peptides à activité biologique (*Monnet et al., 2008*).

Chapitre III

Les applications industrielles des protéases

III. Les applications industrielles des protéases

Les protéases exécutent une grande variété de fonctions et d'applications biotechnologiques, elles sont utilisées dans différents secteurs industriels: alimentaire, détergent, pharmaceutique, tannage, cosmétique, photographie et aussi en biorémédiation, elles occupent donc une grande part du marché des enzymes industrielles (Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002a; Ul-haq et al., 2003; Thys et al., 2006; Sangeetha et al., 2008; Pawar et al., 2009; Raimi et al., 2010; Ramakrishna et al., 2010). Le tableau 3 présente quelques protéases commerciales d'origine bactérienne et leurs applications.

Tableau 3: Protéases Commerciales d'origine bactérienne, applications et fournisseurs industriels (Meunier, 1999 ; Gupta et al., 2002a).

Fournisseur	Nom d'enzyme	Microorganisme	Application
Novo Nordisk, Denmark	Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Détergent
	Esperase	<i>B. lentus</i>	Alimentaire
	Nue	<i>Bacillus sp</i>	Tannerie
	Proctase		
Genencor intrnational, USA	Sublilisin Carlsberg	<i>Bacillus subtilis</i>	Détergent
	Purafact	Source bactérienne	Tannerie
Gist-Brocades, The Netherlands	Subtilisine	<i>B. alcalophilus</i>	Détergent
	Maxacal	<i>Bacillus sp.</i>	Detergent
	HT-proteolytic	<i>B. subtilis</i>	Boulangerie
Solvay Enzymes Germany			Photographier
			Vinification
			Technologie
			Pharmaceutique
Amano Pharmaceuticals, Japan	Collegenase	<i>Clostridium sp.</i>	Pharmaceutique
	Newlase	<i>Rhizopus sp.</i>	Medicale
	ProzymeB, BiozymeA	<i>Aspergillus niger</i>	
Nagase Biochemicals, Japan	Biopraxe	<i>B. subtilis</i>	Cosmétique
	Concentrale		Pharmaceutique
Plizer Etats-Unis	Morcurd	<i>Mucor miehei</i>	Alimentaire

III.1. Industrie alimentaire

L'utilisation des protéases en industrie alimentaire est devenue très attractive en raison de leurs diverses applications. L'hydrolyse des protéines alimentaires animales ou végétales est réalisée pour améliorer les caractéristiques nutritionnelles, retarder la détérioration, modifier les différentes propriétés fonctionnelles (la solubilité, la coagulation,...), changer les saveurs et les odeurs, et pour supprimer les facteurs toxiques, ou inhibiteurs (Felahi, 2009).

III.1.1. Industrie laitière

Les protéines du lait notamment les caséines, qui représentent environ 80% des protéines du lait, constituent une source potentielle de substrats. L'hydrolyse de ces protéines affecte de manière importante les caractéristiques physicochimiques, la taille, la forme, l'hydrophobicité et la solubilité de ces macromolécules. Cette hydrolyse s'accompagne d'une baisse du pouvoir allergène et d'un changement de goût, qui peut être contrôlée par le choix de l'enzyme protéolytique telles que la bromelaïne, papaïne, pepsine, trypsine. Les hydrolysats de lait entrent dans la composition des boissons fortifiantes destinées aux sportifs ou aux enfants mais aussi dans celles des produits diététiques (Sine, 2010). La principale application des protéases dans l'industrie laitière est la fabrication des fromages. Les protéases employées sont surtout des protéases acides : la chymosine et la pepsine qui clivent spécifiquement à 80-85% des chaînes externes de la k-caséine entre les résidus Phe¹⁰⁵ et Met¹⁰⁶. Ces enzymes sont utilisées pour la coagulation, ce dernier est l'étape principale de la fabrication des fromages. Les caséines forment le coagulum (lait caillé) retenant les lipides mais expulsant l'eau et les protéines solubles qui

vont composer le lactosérum (petit lait). Aussi, des protéases sont ajoutées lors de la maturation du lait pour stimuler le développement de certaines souches de bactéries lactiques. Les enzymes microbiennes les plus utilisées sont produites par *Mucor sp.* (Meunier, 1999; Sine, 2010), comme alternative à la présure de veau qui est extraite exclusivement du quatrième estomac des veaux (Fauconneau, 1989).

III.1.2. Boulangerie

La farine de blé est grandement utilisée en boulangerie, elle forme un réseau viscoélastique de gluten, une protéine insoluble lorsqu'elle est mélangée à de l'eau. Selon la nature et la concentration des protéines qui le composent, ce réseau, est capable de retenir le gaz à l'intérieur de la pâte, il est à l'origine des propriétés du produit obtenue après cuisson. Le traitement enzymatique modifie le gluten en lui donnant plus de souplesse et en augmentant le volume final de produit. Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten, de même, des protéases d'origine bactériennes sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité de la pâte (Sicard; 1982; Rao et al., 1998; Meunier, 1999; Sine, 2010).

III.1.3. Fabrication de produits à base de soja et hydrolysats des protéases

Le soja constitue une source abondante de nourriture en raison de sa haute teneur en protéines de bonne qualité. La plus importante application des protéases microbiennes pour la production d'hydrolysats de protéines, est la fabrication de la sauce au soja et d'autres produits à base de soja. Les modifications des protéines du soja par les protéases aident à augmenter leurs propriétés fonctionnelles (solubilité élevée, bon rendement en protéines, faible amertume). Le traitement de ces protéines par la protéase alcaline "alcalase" à pH 8 a permis la mise au point d'hydrolysats de protéines solubles avec des protéines nutritives très intéressantes. Ces hydrolysats sont utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et les boissons fruitées et dans les formulations d'aliments diététiques. Le goût d'amer de l'hydrolysats de protéines est un obstacle majeur à leur utilisation dans les produits alimentaires, l'intensité de l'amertume est proportionnelle au nombre d'acide aminés hydrophobes dans l'hydrolysats et la présence d'un résidu proline dans le centre de peptide, dans ce cas les peptidases sont appropriées pour la désamérisation (Rao et al., 1998; Meunier, 1999).

III.1.4. Attendrissement de viande et de poisson

Le traitement des viandes avec des protéases pour améliorer ses qualités est une ancienne pratique dans les pays tropicaux où des ananas frais étaient servis avec les viandes ou bien celles-ci étaient conservées dans des feuilles de papayer afin que les enzymes protéolytiques de ces deux plantes puissent les attendrir. La tendresse de viande est influencée par les réactions biochimiques après la mort de l'animal, les peptidases sont capables de modifier les protéines des muscles en clivant notamment les fibres de collagène ou d'élastine. Les enzymes les plus employées sont la papaïne, la bromélaïne et la ficine qui peuvent être étalées sur la viande en poudre ou en spray. Une autre méthode consiste à injecter de la papaïne inactive (oxydée) dans la veine jugulaire de l'animal vivant, quelque minute avant d'être abattue, cette enzyme devient active par réduction dans le corps de l'animal. Le dépeçage de poisson comme le thon est une opération mécanique ou manuelle difficile qui peut être rendue plus aisée grâce aux peptidases. Le poisson est placé, pendant 60 à 90mn, dans un bain tiède contenant un mélange de peptidases. Après traitement, la force exercée par des jets d'eau permet de retirer la peau presque intégralement. Les peptidases sont aussi employées dans la préparation de saucissons pour accélérer leur maturation et/ou pour donner un arôme particulier (Larreta-Garde, 1997; Meunier, 1999; Rosenberg, 2007; Sine, 2010).

III.1.5. Synthèse de l'aspartame

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

III.1.6. Alimentation animale

Des enzymes appartenant à la famille des peptidases sont utilisées dans l'alimentation animale pour accroître la valeur nutritionnelle. Elles agissent sur les liens peptidiques avec une spécificité qui dépend de leur nature. L'enzyme la plus utilisée est la subtilisine. Cette endopeptidase à serine possède une large spécificité car elle est capable d'hydrolyser les amides. L'activité kérolytique des protéases alcalines a été également exploitée dans la production de fourrages protéiques à partir de plumes de déchets ou de matériaux contenant de la kératine (*Gupta et al., 2002; Sine, 2010*).

III.1.7. Vinification

L'utilisation de protéases pour traiter le jus de raisin a été mentionnée; elle permettrait de diminuer l'importance de la formation des troubles protéiques et tannoprotéique, tout en libérant des aminoacides qui pourraient favoriser le processus de fermentation (*Sicard, 1982*).

III.2. Tannerie

Dans la tannerie, le délainage enzymatique est utilisé depuis le début du siècle dernier et plusieurs souches microbiennes et diverse méthode ont été suggérées. Les protéases sont utilisées pour leur capacité à libérer les poils et la laine des peaux. Cette opération se fait à des pH élevés, et nécessite des protéases alcalines, comme celles produites par *Bacillus licheniformis*. Après l'enlèvement des poils, les peaux subissent le reverdissage, étape essentielle afin de rendre la peau douce et élastique, les préparations enzymatiques servant pour le reverdissage peuvent contenir des protéases de *A. oryzae*, *B. amyloliquefasciens* ou *B. licheniformis*. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients, dont des impacts majeurs sur la sécurité des travailleurs et sur l'environnement (*Rao et al., 1998; Kumar et Takagi, 1999; Meunier, 1999; Gupta et al., 2002a*).

III.3. Détergent

À l'heure actuelle, l'industrie des détergents est la plus grande utilisatrice de protéases. Le marché des détergents est aujourd'hui un marché très large qui englobe les détergents pour usage domestique (détergents à lessive, détergents à vaisselle), les produits de nettoyage pour usage industriel et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Les protéases jouent un rôle important dans l'efficacité des détergents, elles sont utilisées dans les lessives principalement pour éliminer les protéines des taches de sang, de mucus, d'œuf ou de sauce. Ces protéines sont particulièrement insolubles et adhérentes aux tissus et d'autres surfaces. Sous l'action de protéases, les protéines sont hydrolysées en peptides, ces derniers sont facilement dissous et dispersés dans le milieu liquide. Les protéases sont essentiellement des endoprotéases à serine qui clivent les protéines au niveau des résidus hydrophobes du côté carboxylique. L'enzyme la plus fréquemment utilisée est la subtilisine qui est capable de cliver de nombreux liens peptidiques avec une préférence pour les résidus hydrophobes. Cette enzyme est active,

selon les programmes de lavage, dans une gamme de pH entre 8 à 10,5 (*Rao et al., 1998; Rosenberg, 2007; Sine, 2010*).

III.4. Industrie pharmaceutique et médicale

La grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lyriques au niveau du système digestif. Aussi des collagénases provenant de *Clostridium sp* sont employées pour traiter les ulcères de la peau, des subtilisines en combinaison avec des antibiotiques et des vibriolysines provenant de *Vibrio proteolyticus* sont utilisées dans le traitement de brûlures et de plaies. L'élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes. Une asparaginase provenant d'*Escherichia coli* ou *Erwinia carotovora* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie. La bromelaïne, une enzyme non toxique peut être utilisée directement comme médicament pour les fonctions suivantes : anti-inflammatoire (réduction des œdèmes) en augmentant la perméabilité des tissus, amélioration de la circulation cardiovasculaire, débridement des brûlures, soulagement de douleur, activités fibrinolytique et mucolytique (diminution des sécrétions nasales de la toux), activité anti-tumorale (Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002a; Rosenberg, 2007; Sine, 2010).

Les protéases permettent aussi de détoxifier des quantités modérées de gluten et d'empêcher l'apparition des symptômes chez les personnes sensibles au gluten et celles qui sont atteintes de la maladie cœliaque (Rizzello et al., 2007), cette maladie est une entéropathie associée à l'alimentation, elle se caractérise par une intolérance au gluten et se produit chez des individus génétiquement prédisposés. Elles sont responsables d'une atrophie totale ou subtotale des villosités intestinales conduisant à une malabsorption de nombreux éléments nutritifs qui se traduit par un retard de croissance chez les enfants et un risque d'ostéoporose chez les adultes (Benkadri, 2010).

III.5. Industrie cosmétique

Des protéases d'origine végétale, comme la papaïne et la bromelaïne sont utilisées dans les produits de soins du visage. Ces enzymes sont capables de peler la peau de manière douce, aident à dissiper les taches et les boutons, nettoyer le visage et favoriser la circulation sanguine qui rend la peau plus saine et tendre (Felahi, 2009; Sine, 2010).

III.6. Traitement des eaux usées industrielles

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. Les protéases peuvent traiter des rejets riches en protéines qui sont produites par différentes industries alimentaires. De plus, une préparation à base d'enzymes de *B. subtilis*, *B. amyloliquefasciens* et *Streptomyces sp* est commercialement disponible pour le nettoyage des drains domestiques (Kumar et Takagi, 1999; Gupta et al., 2002a).

Autres applications

À travers les âges, les protéases d'origine microbienne ont été employées pour une variété d'applications d'importance économique mineure, comme la récupération des sels d'argent en photographie par l'hydrolyse de la gélatine, le dégommeage de la soie et divers procédés de nettoyage spéciaux comme le nettoyage des membranes pour l'ultrafiltration, des instruments médicaux vitaux comme les équipements de dialyse. Elles sont utilisées pour dissoudre les tissus humains lors des autopsies afin d'améliorer les possibilités de détection d'intoxication ou d'empoisonnement chez les cadavres. Les protéases jouent un rôle important dans la recherche fondamentale. Leur clivage sélectif des liaisons peptidiques est utilisé dans l'élucidation des relations structure-fonction, dans la synthèse des peptides, et dans le séquençage des protéines (Rao et al., 1998; Meunier, 1999).

Etude expérimentale

Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes

L'intégralité de ce travail a été réalisée au niveau du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Jijel durant la période Mars - Juin de l'année 2011.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

Le tableau 4 regroupe les 20 souches de *Lactobacillus*, qui ont été testées pour leur activité protéolytique.

Tableau 4: Les souches de *Lactobacillus* testés pour leur activité protéolytique.

Souches	Code	Origine
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	S1	Beurre traditionnel
<i>Lb. curvatus</i>	S2	
<i>Lb. viridescense</i>	S3	Humaine
<i>Lb. gasseri</i>	S4	
<i>Lb. brevis</i>	S5	Huile d'olive
<i>Lb. plantarum</i>	S6	
<i>Lb. curvatus</i>	S7	Raib traditionnel
<i>Lb. confusus</i>	S8	
<i>Lb. plantarum</i>	S9	
<i>Lb. bif fermentus</i>	S10	
<i>Lb. helveticus</i>	S11	Beurre
<i>Lb. plantarum</i>	S12	
<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>	S13	Lait de vache
<i>Lb. fermentum</i>	S14	
<i>Lb. plantarum</i>	S15	
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	S16	Gésier du poulet de chair 2008
<i>Lb. plantarum</i>	S17	
<i>Lb. delbrueckii ssp. delbrueckii</i>	S18	
<i>Lb. buchnerie</i>	S19	
<i>Lb. fermentum</i>	S20	Gésier du poulet de chair 2009

Ces souches ont été isolées et identifiées par nos collègues durant les années passés, au niveau de Laboratoire de Microbiologie -Université de Jijel-.

II.1.2. Milieux de cultures

- Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe) bouillon et gélose (préparé au niveau du laboratoire).
- Gélose MRS additionnée de lait écrémé (2%) Candia.
- Milieu minimum (MM) additionné de sucres ou de peptone.
- Milieu RSM (Reconstituted Skimmed Milk).
- Milieu lait en poudre 9%.

II.1.3. Réactifs et solutions

- Réactif de Bradford.
- HCl 2N.
- NaOH 2N.
- Sucres : Glucose, Lactose, Fructose et Maltose.
- Eau physiologique stérile.

- Eau distillée.
- Solution de TCA 5%.
- Solution de caséine 2,5 % dans du citrate de sodium 0.01%.
- Solution de Tyrosine 0.01%.
- Solution de BSA 0.01%.
- Solution EDTA 1.5 mM.
- Solution Cu SO₄ 5 H₂O 2 mM.
- Solution Ca Cl₂ 2 mM.
- Solution Na Cl 2 mM.
- Solution Fe SO₄ 2 mM.
- Solution Mg SO₄ 4H₂O 2 mM.
- Solution Zn SO₄ 2 mM.
- Tampon Acétate de Sodium 100 mM pH (5,6).
- Tampon Carbonate de Sodium 100 Mm pH (9,10).
- Tampon phosphate de 100 mM pH (7, 7.5, 8, 8.5).
- Tampon phosphate de 1M pH (7).

II.1.4. Appareillages

- pH mètre (HANNA).
- Bain Marie (Memmert).
- Etuve (Memmert).
- Four pasteur (Controls).
- Spectrophotomètre (UV Shimandzu, JASCO- UV630).
- Centrifugeuse (Hettich).
- Compteur de colonie (Funk Gerber)
- Vortex (MS2 IKA).
- Agitateur magnétique (Bensen).
- Balance (Denver).
- Réfrigérateur (Condor).
- Micropette (Microlit).

II.2. Méthodes

II.2.1. Revivification

Les 20 souches ont été revifiées par leur ensemencement sur bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 24 heures.

II.2.2. Purification

Pour la purification on a utilisé la méthode de repiquages successifs sur bouillon et gélose MRS jusqu'à l'obtention de colonies de même tailles, même formes et bien distinctes ;ce qui renseigne sur la pureté des souches.

II.2.3. Mise en évidence du caractère protéolytique des lactobacilles

Pour révéler la production des enzymes protéolytiques chez les bactéries purifiées, la technique des cures-dents (*Wigler, 1977*) a été utilisée.

Par des cures-dents stériles, une partie de chaque colonie bactérienne est déposée en touche sur la gélose MRS au lait écrémé Candia (2%). Ensuite, les boites ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48h. Le diamètre de chaque colonie bactérienne et la zone d'hydrolyse du lait a été mesuré (en mm), et le rapport entre les deux est calculé.

II.2.4. Le screening des souches les plus protéolytiques

La comparaison entre les souches est basée sur les activités spécifiques, qui ont été calculées après détermination de l'activité protéolytique et le taux de protéines.

- **Mesure de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique des diverses souches est déterminée selon la méthode de *Sutar et al (1986)* en se basant sur l'effet de l'enzyme sur la caséine. Ainsi lorsque la caséine est hydrolysée par la protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés. La quantité de tyrosine libérée peut être mesurée directement (absorbance à 280 nm), elle devient alors une mesure de l'activité de l'enzyme.

La solution protéique est préparée en ajoutant 2.5 g de caséine à une solution de citrate de sodium 0.01 M (0.58 g de citrate de sodium dans 100 ml d'eau distillée).

- * **Préparation des surnageants**

Une série de tubes contenant 5 ml de bouillon MRS ont étéensemencés à partir des cultures sur boîtes, ensuite les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 24 h. 1 ml de chaque tube a été centrifugé à 6000 tr /10 min. Le surnageant ainsi obtenu représente l'enzyme brute.

- * **Réaction enzymatique**

La réaction enzymatique s'effectue en ajoutant 0.1 ml du surnageant à tester à un mélange qui contient 1.5 ml du tampon phosphate pH 7 et 0.4 ml de la solution de caséine. Les tubes sont maintenus à 37 °C pendant 30 min, après cette période la réaction est arrêtée par l'ajout de 2.6 ml d'une solution d'acide trichloroacétique (TCA 5 %), les tubes sont ensuite placés dans la glace pendant 1 heure. Un blanc est préparé de la même façon, sauf le surnageant, qui sera remplacé par 0.1 ml d'eau distillée (*Sutar et al., 1986*).

Le contenu des tubes a été centrifugé à 6000 tr/ 10 min et la détermination de l'activité enzymatique consiste en une mesure directe de l'absorbances lue à 280 nm, sur un spectrophotomètre (Jasco UV 630) avec une cuve en quartz, par référence à la courbe d'étalonnage de la tyrosine (0,01%).

« Une unité enzymatique correspond à la concentration en mg de tyrosine libérée après 30 minutes à pH 7 et à température 37 °C ».

- **Détermination de la concentration des protéines**

Les protéines solubles ont été déterminées par la méthode de *Bradford (1976)* avec quelques modifications. Le réactif de Bradford a été préparé en dissolvant 100 mg de bleu de Coomassie G-250 dans 50 ml d'éthanol (95 %), puis 100 ml d'acide phosphorique (85 %) ont été ajoutés, après la dissolution complète du colorant, le volume a été complétée par l'eau distillée jusqu'à 1l. Puis le mélange est filtré à travers un papier filtre.

La réaction s'effectue dans une série de tubes qui contiennent 0.5 ml de surnageant brut et 5 ml du réactif de dosage, les tubes ont été bien vortexés et laisser à température ambiante pendant 30 min, après le développement de couleur, l'absorbance est mesuré à 595 nm. Parallèlement aux échantillons, un blanc a été préparé par l'addition de 0.5 ml d'eau distillée au réactif de dosage.

Les concentrations en protéines ont été déduite à partir d'une courbe étalon en utilisant la Bovine Serum Albumin (BSA) 0,01%.

L'activité spécifique est calculée à l'aide de la formule ci-dessous :

$$\text{Activité spécifique (U/ mg)} = \frac{\text{Activité protéolytique (U/ ml)}}{\text{Protéines totales (mg / ml)}}$$

II.2.5. Effet du milieu de culture sur la production de protéase

• Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé par le transfert de colonies, à partir d'une culture de 24 h sur gélose MRS, dans un tube à essai contenant 5 ml du bouillon MRS pH (6.2), cette culture a été incubée à 37 °C pendant 24 h. À partir de cette culture on ensemence un autre tube par un rapport de (1: 9) (v: v) qui sera ensuite incubé à 37 °C pendant 16-18 h. La dernière culture a été utilisée pour inoculer les erlenmeyers.

• Estimation du nombre de cellules dans l'inoculum

Le dénombrement a été effectué sur gélose MRS avec les dilutions appropriées et l'étalement a été réalisé à l'aide d'un râteau, ensuite l'incubation à 37 °C pendant 48 h, après on utilise le compteur de colonies pour dénombrer les colonies résultants.

La sélection de milieu de culture favorable à la production de protéase consiste à comparer la production de cette enzyme protéolytique sur quatre milieux à savoir :

Le bouillon MRS pH (6.2); lait en poudre 10 % pH (6.7); le milieu RSM lait écrémé reconstitué pH (6.6) (*Sultana et al., 2000*) et le milieu minimum pH (6.2) additionné de sucres (glucose, fructose, lactose, maltose) ou de peptone.

Deux séries d'erlenmeyers de 100 ml contenant 50 ml de chaque milieu ont été préparés puis stérilisés, l'une des série à été inoculé par 1 ml (2 %) à partir de l'inoculum de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1). L'autre série a été aussi inoculée par 1 ml à partir de l'inoculum de *Lb. viredescens* (S3), l'ensemble des erlenmeyers ont été incubés à 37 °C pendant 24 h. Ensuite les activités spécifiques ont été calculées après dosage de l'activité enzymatique et de protéines. D'après les résultats obtenus dans l'étape précédente, les milieux MRS et RSM ont été choisis pour l'étude de l'effet de la température et du pH parce qu'ils ont un maximum de production (*Sultana et al., 2000*).

II.2.5.1. Effet du pH sur la production de protéase sur milieu MRS et RSM

Pour étudier l'effet de pH sur la production de protéase par les deux souches de *Lactobacillus* choisies, deux séries d'erlenmeyers de 100 ml contenant 50 ml du milieu MRS pH (5.5; 6; 6.5;7) et RSM pH (5.5; 6; 6.5; 7) ont été préparés en double. Les milieux MRS ont été inoculés par 1 ml (2 %), à partir de l'inoculum de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et de *Lb. viredescens*, respectivement. L'ensemencement sur le milieu RSM a été effectué de la même façon. L'incubation a été faite à 37 °C pendant 24 h. Les activités spécifiques ont été calculées après détermination de l'activité enzymatique et le taux de protéines (*Ul-Haq et Mukhtar, 2006*).

II.2.5.2. Effet de la température sur la production de protéase sur milieu MRS et RSM

Deux séries d'erlenmeyers de 100 ml contenant 50 ml de chaque milieu ont été préparés puis stérilisés, les bouillons MRS (pH 7) ont été inoculés par 1 ml (2 %), à partir de l'inoculum de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et de *Lb. viredescens*, l'ensemencement sur le milieu RSM (pH 6,5) a été effectué de la même façon. L'incubation a été faite à différentes températures (25; 30; 37; 40 °C) pendant 24 h. Les activités spécifiques ont été calculées comme cité précédemment (*Ul-Haq et Mukhtar, 2006*).

II.2.6. Suivi de la croissance et de l'activité spécifique pendant 9 heures

Pour ce test, deux erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de bouillon MRS (pH 7) ont étéensemencés par 2 % de l'inoculum pour les deux souches, ensuite les erlenmeyers ont été incubés à 37 °C. Des prélèvements ont été réalisés chaque heure dans des conditions de stérilité, la croissance a été suivie par mesure de l'absorbance à 660 nm, le pH a été mesuré à l'aide de pH mètre et l'activité spécifique des protéases extracellulaires a été testée sur les surnageants après centrifugation à 6000 tr/ 10min (*Felahi, 2000*).

II.2.7. Suivi de la croissance et de l'activité spécifique pendant 4 jours

Pour ce test deux erlenmeyers de 250 ml contenant 100ml de bouillon MRS (pH 7) ont étéensemencés par 2 % de l'inoculum pour les deux souches, ensuite les erlenmeyers ont été incubés à 37 °C. Des prélèvements ont été réalisés chaque jour dans des conditions de stérilité, la croissance a été suivie par mesure de l'absorbance à 660 nm, le pH a été mesuré à l'aide de pH mètre et l'activité spécifique de protéase extracellulaire a été testé sur les surnageants après centrifugation à 6000 tr/ 10min (*Gençkal, 2004*).

II.2.9. Précipitation au sulfate d'ammonium

Pour réaliser cette, opération une culture de chaque souche à été préparée dans deux erlenmeyers de 250 ml contiennent 100 ml du bouillon MRS (pH 7)et qui ont été inoculés à (2%) à partir d'une préculture après culture à 37 °C pendant 24 h.

Les cultures ont été clarifiées par centrifugation, les surnageants ont été récupérés dans deux béchers séparément. Le procédé de précipitation se déroule comme suit: le surnageant à fractionner a été placé sur un agitateur magnétique dans un bain de glace. La quantité de sulfate d'ammonium (47.6 g) a été ajoutée petit à petit, sous agitation magnétique douce, en laissant le temps à chaque quantité de se disperser totalement avant l'addition d'une nouvelle jusqu'à l'adition de toute la quantité de sulfate d'ammonium. Le processus se déroule en présence de la glace. Après, le mélange de précipitation a été placé à 4°C pendant 24 h. Ensuite le culot et le surnageant ont été récupérés par centrifugation (6000 tr/10 min) et le culot a été dilué dans 3 ml de tampon phosphate (pH7) selon la méthode décrite par *Krishna et al., (2009)*. L'activité protéolytique a été mesurée pour le culot ainsi que pour le surnageant.

II.2.10. Les caractéristiques physicochimiques de l'enzyme brute

• Préparation de l'enzyme brute

A fin de déterminer les propriétés physicochimiques de la protéase extracellulaire des deux souches de *Lactobacillus* étudiées, deux cultures sur erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de bouillon MRS (pH 7) ont été inoculés à (2%) et incubés à 37 °C pendant 24 h. Ensuite les cultures ont été centrifugées à 6000 tr/10 min, puis les surnageants ont été récupérés et les tests suivant ont été réalisés .

II.2.10.1. Effet du pH sur l'activité protéolytique

Pour étudier l'effet de pH sur l'activité protéolytique de protéase extracellulaire, deux séries de tubes contenant chacun 1.5 ml des tampons (100 mM) à différents pH; tampon phosphate pH (7; 7.5; 8 et 8.5), tampon acétate de sodium pH (5 et 6), tampon carbonate de sodium pH (9; 10 et 11) ont été préparés et incubés à 37 °C pendant 30 min. La réaction enzymatique est décrite précédemment, ainsi l'activité protéolytique a été déterminée (*Marathe et Ghosh, 2009*).

II.2.10.2. Effet de la température sur l'activité protéolytique

Deux séries de tubes l'une contenant tampon acétate de sodium (pH 6), l'autre le tampon phosphate (pH 8) ont été préparés et incubés à des températures différentes (25; 30; 37; 40; 50 et

60 °C) pendant 30 min, ensuite l'activité protéolytique a été déterminée (*Marathe et Ghosh, 2009*).

II.2.10.3. Effet des ions métalliques sur l'activité protéolytique

Pour déterminer l'effet des ions métalliques sur l'activité protéolytique, les solutions des ions métalliques suivants : Cu SO₄ 5 H₂O, Ca Cl₂, Na Cl, Fe SO₄, Mg SO₄ 4H₂O, Zn SO₄, ont été préparées. Après, 0.5 ml (2 mM) de ces solutions a été ajouté à la première série de tubes qui contient au préalable 1 ml de tampon phosphate (pH 8), les tubes ont été incubés à 40 °C pendant 30 min. De l'autre côté 0.5 ml a été additionné à l'autre série de tubes contenant le tampon acétate de sodium (pH 6), les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 30 min. L'activité protéolytique a été déterminée (*Marathe et Ghosh, 2009*). Ainsi les activités résiduelles ont été calculées selon la formule :

$$\text{L'activité résiduelle \%} = \frac{\text{L'activité protéasique (U/ml) en présence de l'ion}}{\text{L'activité protéasique (U/ml) en absence de l'ion}} \times 100$$

II.2.10.4. Effet de l'EDTA sur l'activité protéolytique

Pour étudier l'effet de l'EDTA sur l'activité protéolytique, deux tubes contenant chacun 0.5 ml d'EDTA (1.5 mM) ont été utilisés. L'un a été additionné de 1 ml du tampon phosphate (pH 8) et incubé à 40 °C pendant 30 min. L'autre a été ajouté de 1 ml de tampon acétate de sodium (pH 6) et incubés à 37 °C pendant 30 min. L'activité protéolytique a été déterminée, ainsi les activités résiduelles ont été calculés (*Pereira et al., 2001*). Ainsi les activités résiduelles ont été calculées selon la formule :

$$\text{L'activité résiduelle \%} = \frac{\text{L'activité protéasique (U/ml) en presence de l'inhibiteur}}{\text{L'activité protéasique (U/ml) en absence de l'inhibiteur}} \times 100$$

Résultats et Discussion

II. Résultats et discussion

II. 1. Mise en évidence du caractère protéolytique des lactobacilles

20 souches pures appartenant au Genre *Lactobacillus* ont été examinées, pour leur pouvoir protéolytique, sur gélose MRS au lait écrémé (2%) où la production des enzymes protéolytiques a été mise en évidence par les zones d'hydrolyse autour des colonies, le diamètre de chaque colonie (Y) et de la zone d'hydrolyse (X) ont été notés après 24 et 48 h d'incubation à 37 °C. Le rapport (X/Y) a été pris comme indication de l'activité protéasique.

Les résultats du screening primaire pour la production des enzymes protéolytiques sont portés dans le tableau 5. D'après ce test, seulement 12 souches parmi les 20 souches testées, possédaient un pouvoir protéolytique.

Tableau 5: Screening primaire de la production de l'activité protéolytique par les lactobacilles sur gélose MRS-Lait écrémé (2%) après 48h.

Code de la Souche	Origine des souches	Diamètre de la zone d'hydrolyse X (mm)	Diamètre des colonies Y (mm)	Rapport X/Y
S1	Beurre traditionnel	18	3,5	5,14
S2		11	4	2,75
S3	Humaine	11	3	3,66
S4		7	2	3,5
S5	Huile d'olive	5	2	2,5
S6		3	2	1,5
S7	Raib traditionnel	9	3	3
S8		5	2,5	2
S9		3	1,5	2
S10		0	2	0
S11	Beurre	5	4	1,25
S12		0	2	0
S13	Lai du vache	0	2	0
S14		0	1	0
S15		0	3	0
S16	Gésier du poulet de chaire 2008	3	1	3
S17		3	2	1,5
S18		0	3	0
S19		0	1	0
S20	Gésier du poulet de chaire 2009	0	1,5	0

Les résultats obtenus sur milieu MRS au lait écrémé (2%) ont montrés que nos souches présentaient des zones d'hydrolyse d'un diamètre allant de 3 à 18 mm, tandis que les plus

grandes zones ont été observées chez *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viredescens* (S3) avec un rapport (X/Y) de 5,14 et 3,66 respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par **Roudj et al., (2009)**, les deux bactéries étudiées montraient une activité protéolytique, entraînant des clarifications autour des colonies de *Lb. brevis* CHTD27 et *Lb. plantarum* BH14. **Idoui et al., (2009)** ont également montré que le caractère protéolytique des bactéries lactiques a été révélé par des zones d'hydrolyse autour des colonies bactériennes cultivées sur milieu Yeast Manitol Agar (YMA).

La figure 5 montre l'effet protéolytique de quelques souches de *Lactobacillus* étudiées sur milieu MRS au lait écrémé (2%).

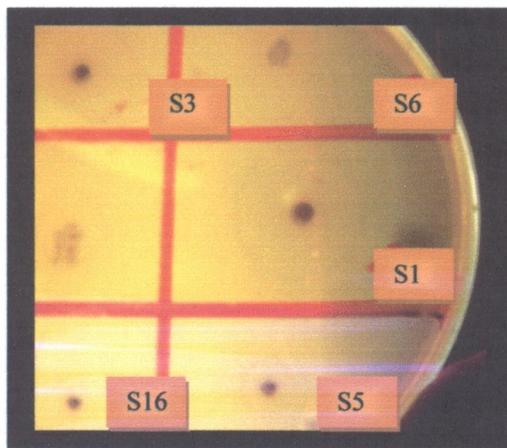


Figure 5 : L'effet de quelques souches de *Lactobacillus* étudiées sur milieu MRS au lait écrémé (2%).

II. 2. Screening des souches les plus protéolytiques

Pour plus de certitude, un second screening basé sur la détermination de l'activité protéolytique spécifique des surnagants récupérées après 24 h de culture a été réalisé.

L'activité spécifique a été calculée selon l'équation décrite dans la partie Matériels et Méthodes, les activités protéasiques ont été déterminées selon la méthode de **Sutar et al., (1986)** via une courbe d'étalonnage de tyrosine (Figure 6), ainsi les concentrations en protéines totales ont été déterminées selon la méthode de **Bradford, (1976)** à partir d'une courbe d'étalonnage de BSA (Figure 7).

Les résultats de screening secondaire (tableau 6) ont montré que les souches de *Lactobacillus* testées possédaient des activités spécifiques allant de 11.38 à 36.57 (U/mg) ce qui confirme les résultats observés sur milieu MRS au lait écrémé (2%) sauf pour le *Lb. Helveticus* (S11) qui ne présente pas d'activité significative. Deux souches de *Lactobacillus* ont été sélectionnées pour des études ultérieures car elles ont les plus hautes activités spécifiques, *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) (36,57 U/ml) et *Lb. viridescens* (S3) (35,39 U/ml). **Roudj et al., (2009)**, ont rapporté que l'activité protéolytique de *Lb. plantarum* BH1 et *Lb. brevis* CHTD27, est également retrouvée dans les surnageants de milieux de culture. Le tableau 5 montre les résultats du screening secondaire.

Selon **Desmazeaud et Spinnler, (1997)**, les bactéries lactiques sont peu protéolytiques, par ailleurs, nos résultats montrent que les souches testées ont un pouvoir protéolytique relativement important.

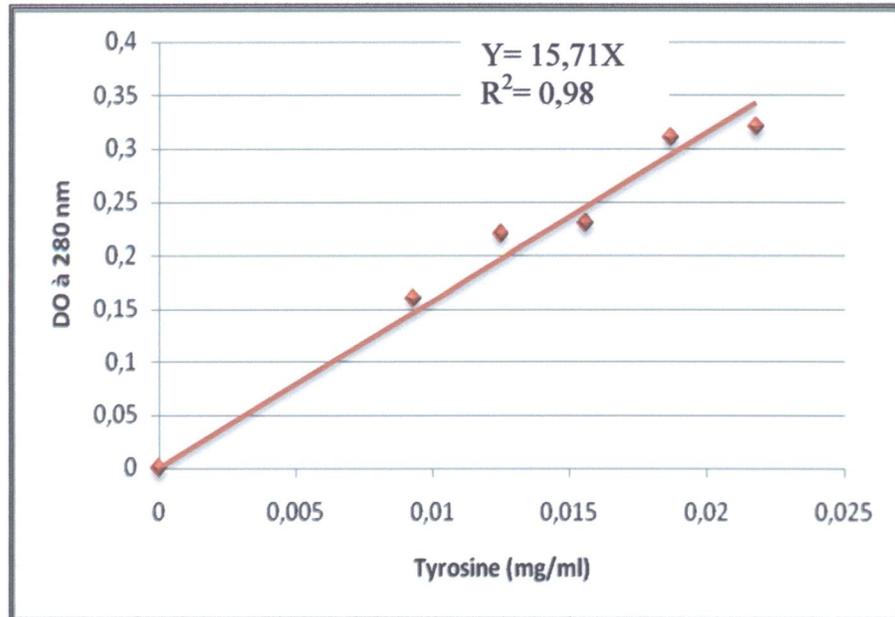


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine pour l'essai enzymatique.

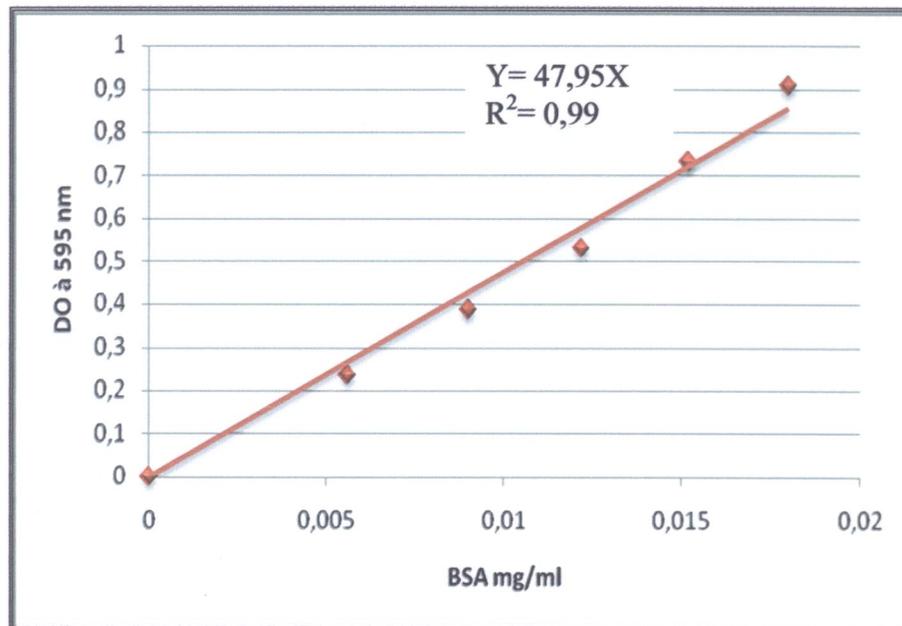


Figure 7 : Courbe d'étalonnage de la BSA pour la détermination de la concentration en protéine par la méthode de Bradford.

Tableau 6 : Screening secondaire des souches les plus protéolytiques.

Code de la souche	Protéines totales (mg /ml)	Activité protéasique (U/ml)	Activité spécifique (U/ml)
S1	0,015	0,548	36,57
S2	0,018	0,539	29,98
S3	0,015	0,530	35,39
S4	0,019	0,338	17,82
S5	0,018	0,502	27,93
S6	0,016	0,528	33,06
S7	0,017	0,475	27,97
S8	0,019	0,511	26,93
S9	0,014	0,444	31,37
S11	0,009	/	/
S16	0,014	0,279	19,95
S17	0,018	0,329	18,28

II. 3. L'optimisation de la production des protéases

Le processus d'optimisation est une étape importante surtout dans les industries de production, particulièrement en biotechnologie (Saxena et al., 2010).

La production des protéases est très influencée par la composition du milieu en source de carbone, de nitrogène, elle est également influencée par la présence de quelques sucres fermentescibles et les ions métalliques, en plus d'autres facteurs comme l'aération, la densité de l'inoculum, le pH, la température et le temps d'incubation affectent aussi la production de protéase.

Dans le but d'optimiser la production des protéases chez les souches *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3), l'effet de quelques facteurs a été étudié à savoir l'effet du milieu de culture, l'effet du pH et l'effet de la température. (Varela et al., 1996; Hameed et al., 1999).

II. 3. 1. Sélection du milieu de culture favorable à la production de protéase

Pour sélectionner un milieu de culture convenable pour la production des protéases par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3), 4 milieux différents ont été ensemencés par 1ml de préculture sur bouillon MRS contenant environ 20×10^8 UFC/ml de cellule.

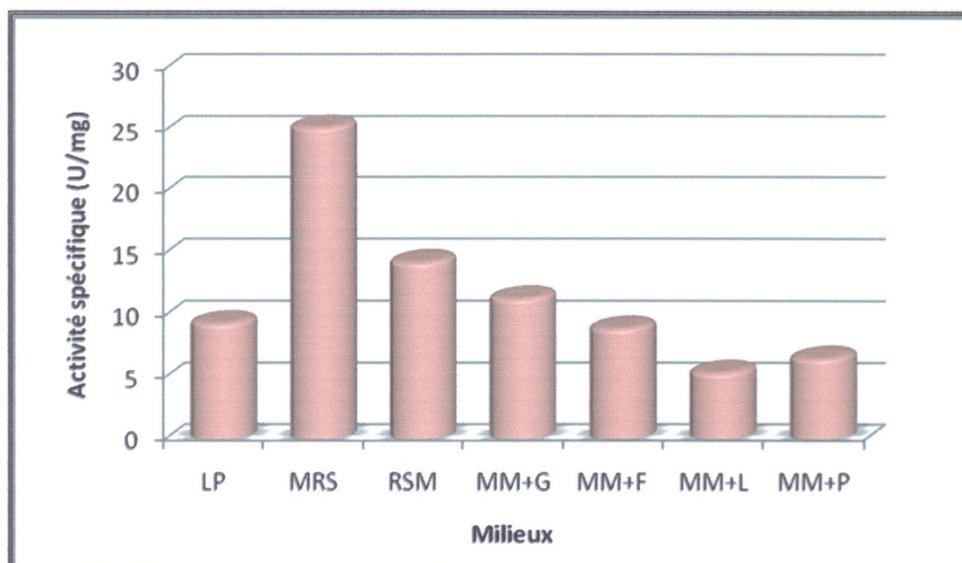
Les milieux sont : bouillon MRS (pH 6,5), lait en poudre (LP) 10 % (pH 6,7), lait écrémé reconstitué (pH 6,6) (Sultana et al., 2000) et milieu minimum (pH 6,2) (Ronald, 1998) additionné de différents sucres (glucose, fructose, lactose, maltose) ou de peptone. Les résultats de l'effet des milieux sur la production de protéase par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) sont présentés dans les tableaux 7 et 8, les figures 8 et 9.

Tableau 7: L'effet de différents milieux de culture sur la production de protéase par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1).

	<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (S1)						
	LP	MRS	RSM	MM+G	MM+F	MM+L	MM+P
Protéine totale (mg/ml)	0,058	0,034	0,038	0,004	0,006	0,009	0,008
Activité protéasique (U/ml)	0,179	0,916	0,534	0,045	0,054	0,049	0,052
Activité spécifique (U/mg)	3,094	26,94	14,07	11,45	9,01	5,44	6,60

Tableau 8: L'effet de différents milieux de culture sur la production de protéase par *Lb. viridescens* (S3).

	<i>Lb. viridescens</i> (S3)						
	LP	MRS	RSM	MM+G	MM+F	MM+L	MM+M
Protéine totale (mg/ml)	0,018	0,032	0,035	0,004	0,005	0,007	0,007
Activité protéasique (U/ml)	0,169	0,810	0,502	0,036	0,020	0,050	0,049
Activité spécifique (U/mg)	9,44	25,31	14,36	9,00	7,27	4,07	7,09

**Figure 8:** L'effet de différents milieux de culture sur la production de protéase par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1).

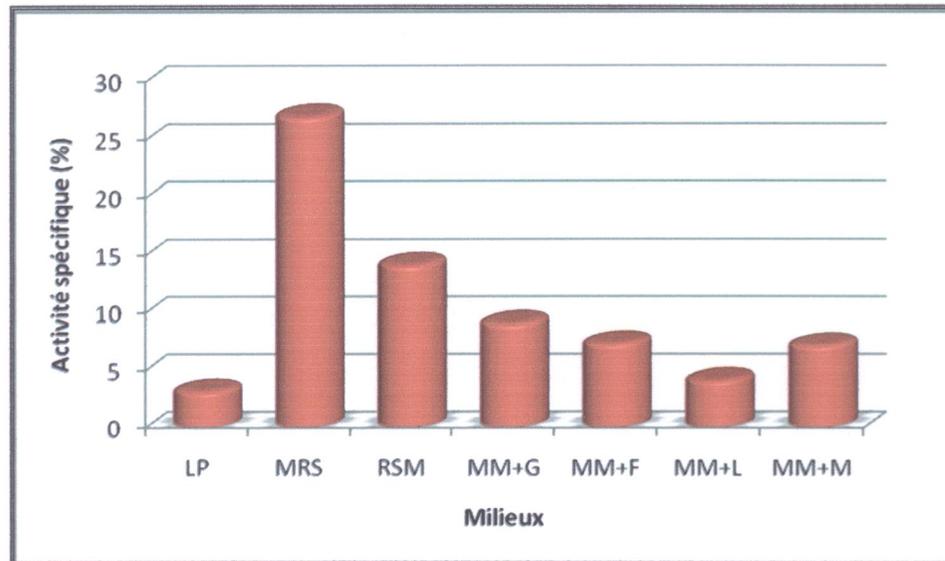


Figure 9: L'effet de différents milieux de culture sur la production de protéase par *Lb. viridescens* (S3).

D'après nos résultats, la plus haute activité est observée lorsque les deux souches ont été cultivées sur le milieu MRS : 26,94 U/mg pour *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et 25,31 U/mg pour *Lb. viridescens* (S3). De l'autre côté, les deux bactéries lactiques cultivées sur milieu RSM ont donné une activité moindre ; 14,07 U/mg pour *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et 14,36 U/mg pour *Lb. viridescens* (S3). Cependant, les autres milieux (LP et MM additionné de différentes sources de carbone) n'ont abouti qu'à des valeurs d'activité spécifique inférieures à 10 U/mg pour les deux souches.

Les bactéries lactiques possèdent un système protéolytique complexe qui assure leur croissance dans des milieux à faibles concentrations en acides aminés et oligopeptides comme le lait (Roudj, 2009), ce qui explique la capacité de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et de *Lb. viridescens* (S3) à croître sur milieu LP.

On observe une activité spécifique plus élevée sur milieu RSM par rapport à celle observée sur milieu LP, cette augmentation peut être expliquée par l'addition d'apports exogènes (extrait de levure 5%, glucose 9.5%) au lait écrémé ce qui favorise la croissance bactérienne, ainsi que la production d'enzymes protéolytiques. Selon Khalid et Marth, (1990), les *Lactobacillus* ont de multiples besoins nutritionnels et ils nécessitent un apport exogène de facteurs essentiels pour leur croissance. L'activité spécifique la plus élevée est observée sur le milieu MRS pour les deux souches, parce que le milieu est riche en peptides, ce qui favorise l'activité protéasique durant la croissance des *Lactobacillus* par rapport au milieu RSM. Ces résultats sont en accord avec ceux montrés par Pereira et al., (2001) chez les souches, *Lb. homohiochii* et *Lb. curvatus* cultivées sur MRS et RSM, respectivement.

Les résultats de l'activité protéolytique pour MM additionné de différents sucres mettent le point sur les sources de carbone de nature glucidique qui affectent le plus la production, ici il s'agit du glucose parce que lorsqu'il est ajouté à une concentration de 1% au MM. Les activités spécifiques de 11,45 et de 9,00 U/mg sont obtenues pour *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et de *Lb. viridescens* (S3), respectivement. Le fructose semble également être un bon inducteur puisqu'il fournit des activités relativement élevées 9,01 et 7,27 U/mg pour *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et de *Lb. viridescens* (S3), respectivement. Les autres activités sont négligeables.

D'après ces résultats on remarque, la diminution des activités spécifiques des souches de *Lactobacillus* sur MM par comparaison aux résultats obtenus sur milieu MRS et RSM parce que le milieu minimum contient seulement les éléments minéraux apportant les oligoéléments et les éléments de base en plus d'une seule source de carbone organique (Ronald, 1998).

A l'issu de cette expérience, le glucose et le fructose jouent un rôle important dans la croissance cellulaire, et dans le déclenchement du métabolisme protidique lorsqu'ils sont utilisés. Des résultats similaires étaient obtenus par Chelapandis, (2009), où il a démontré que les deux sources de carbones qui induisent le plus la synthèse des protéases chez *Aspergillus flavus* et *Aspergillus terreus* étaient le glucose et le fructose.

II. 3. 2. Effet du pH sur la production des protéases sur milieu MRS et RSM

L'effet du pH sur la production des protéases par les souches *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) a été testé par la croissance de ces deux souches sur milieu MRS et RSM à différents pH (5, 5.5, 6, 6.5) comme montré dans les tableaux 9 et 10 et les figure 10 et 11.

Tableau 9: L'effet du pH sur la production des protéases par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) dans le milieu MRS.

Valeurs de pH	S1				S3			
	5,5	6	6,5	7	5,5	6	6,5	7
Protéines totales (mg/ml)	0,032	0,035	0,034	0,035	0,032	0,032	0,036	0,034
Activité protéasique (U/ml)	0,654	0,771	0,869	0,963	0,640	0,757	0,771	0,849
Activité spécifique (U/mg)	20,43	22,02	25,55	27,51	20,00	23,65	21,41	24,97

Tableau 10: L'effet du pH sur la production des protéases par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) dans le milieu RSM.

Valeurs de pH	S1				S3			
	5,5	6	6,5	7	5,5	6	6,5	7
Protéines totales (mg/ml)	0,035	0,035	0,035	0,034	0,032	0,032	0,031	0,031
Activité protéasique (U/ml)	0,398	0,409	0,425	0,340	0,383	0,401	0,436	0,462
Activité spécifique (U/mg)	11,38	11,69	12,14	10,01	11,99	12,55	14,08	14,92

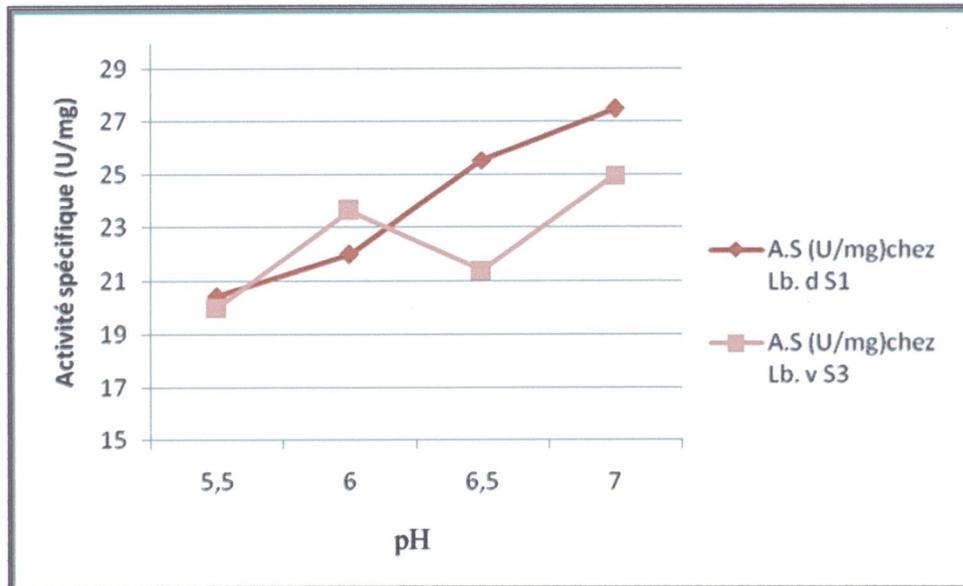


Figure 10: L'effet du pH sur la production des protéases sur milieu MRS par *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens*.

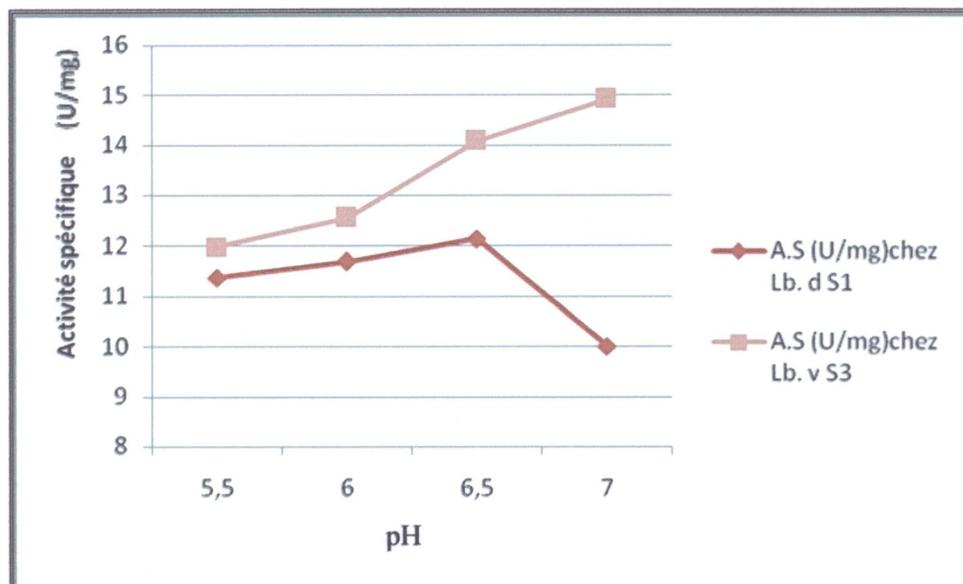


Figure 11: L'effet du pH sur la production des protéases sur milieu RSM par *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens*.

La souche *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (S1) produit des protéases extracellulaires de façon optimale à pH 7 sur milieu MRS avec une activité spécifique de 27.51 U/mg et à pH 6.5 sur milieu RSM avec une activité spécifique de 12.14 U/mg. Cependant, *Lb. viridescens* (S3) produit les protéases de façon optimale à pH 7 sur les deux milieux MRS et RSM avec des activités spécifiques 24.97 U/mg et 14.92 U/mg, respectivement.

Dans ce contexte, plusieurs études menées sur les protéases des bactéries lactiques ont réussi à révéler une activité protéolytique importante sur des milieux de culture de pH allant de 5 à 7 ce qui semble être le pH optimal de croissance de la majorité des bactéries lactiques (De Giori et al., 1984; Kim, 2007; Hebert et al., 2008).

II. 3. 3. Effet de la température sur la production des protéases sur milieu MRS et RSM

La température est un autre paramètre crucial pour la production de protéase, les deux souches *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) ont été incubées à différentes températures (25, 30, 37 et 40) pendant 24 h, pour déterminer la température optimale, sur milieux MRS et RSM. Les résultats sont mentionnés dans les tableaux 11 et 12, les figures 12 et 13.

Tableau 11 : L'effet de la température sur la production des protéases chez *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) sur le milieu MRS.

Valeurs de températures °C	S1				S3			
	25	30	37	40	25	30	37	40
Protéines totales (mg /ml)	0,016	0,027	0,032	0,016	0,017	0,024	0,035	0,013
Activité protéasique (U/ml)	0,366	0,737	0,964	0,367	0,352	0,588	1,016	0,311
Activité spécifique (U/mg)	22,91	27,32	30,15	22,97	20,74	24,53	29,04	23,99

Tableau 12 : L'effet de la température sur la production des protéases chez *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) sur le milieu RSM.

Valeurs de temperature °C	S1				S3			
	25	30	37	40	25	30	37	40
Protéines totales (mg /ml)	0,040	0,041	0,042	0,043	0,042	0,040	0,043	0,044
Activité protéasique (U/ml)	0,491	0,424	0,475	0,435	0,557	0,450	0,458	0,444
Activité spécifique (U/mg)	12,28	10,35	10,88	10,12	13,27	11,26	10,65	10,11

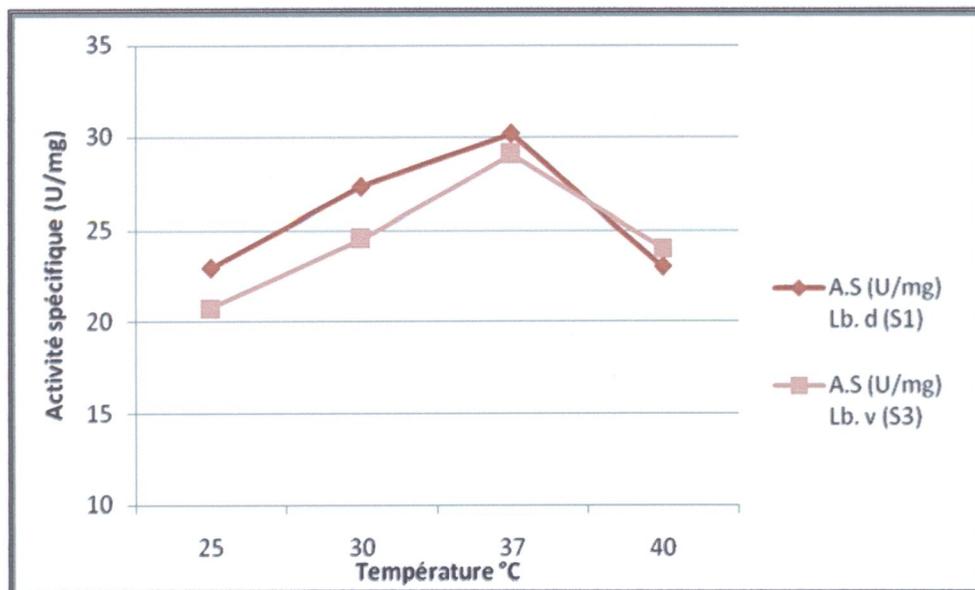


Figure 12: L'effet de la température sur la production des protéases chez *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) sur milieu MRS.

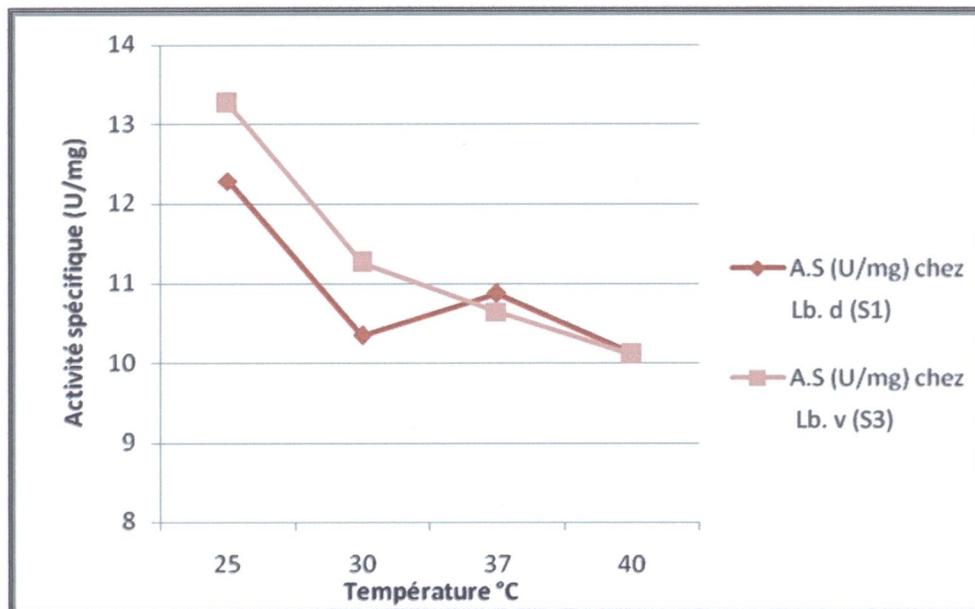


Figure 13: L'effet de la température sur la production de protéase chez *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) sur milieu RSM.

D'après ces tableaux, à température 37°C l'activité spécifique maximale est de 30.15 U/mg et 29.04 U/mg pour *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3), respectivement, sur milieu MRS. En revanche, sur milieu RSM, la température optimale est de 25°C avec une activité spécifique maximale de 12.28 U/mg et 13.27 U/mg pour *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3), respectivement.

La température de la croissance des bactéries lactiques varie entre 25 à 45°C et elle dépend de l'espèce. De ce fait, les températures optimales de la production des protéases obtenues figurent dans la gamme de températures de la croissance (De Giori et al., 1984; Rizzello et al., 2007; Hebert et al., 2008; Marathe et Ghosh, 2009).

II. 4. Suivi de la croissance et de l'activité spécifique pendant 9 heures

La production des protéases extracellulaires a été suivie au cours de la croissance des deux souches de *Lactobacillus*, *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) sur milieu MRS pendant 9 h comme décrit précédemment dans Matériels et Méthodes, et les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 13 et 14 et les figures 14 et 15.

Tableau 13 : Le suivi de la production de protéase durant 9 h chez *Lb. Delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) dans le milieu MRS.

Heures	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	6,93	6,89	6,77	6,69	6,66	6,49	6,23	6,10	5,86	5,76
DO à 660nm	0,043	0,072	0,088	0,160	0,288	0,529	0,858	1,352	1,618	1,801
protéines totales (mg/ml)	0,038	0,037	0,034	0,036	0,037	0,037	0,038	0,041	0,040	0,041
Activité proteasique (U/ml)	0,00	0,865	0,711	0,786	0,602	0,870	0,852	0,903	0,904	0,904
Activité spécifique (U/mg)	0,00	5,36	8,96	12,50	16,27	23,51	22,44	22,04	22,61	22,06

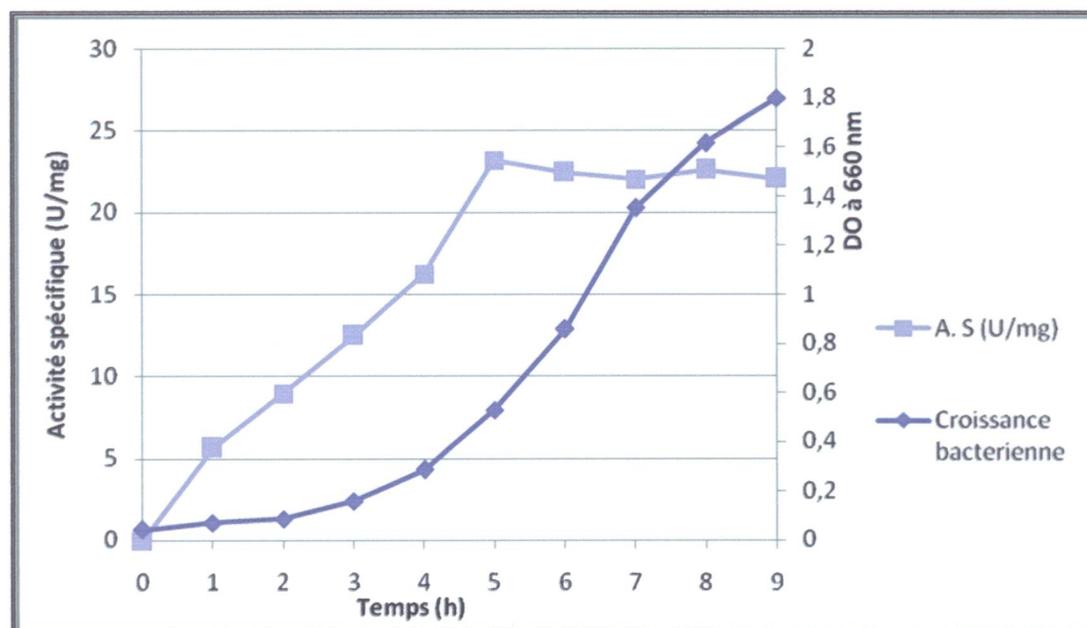


Figure 14: Le suivi de la production de protéase durant 9 h chez *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) dans le milieu MRS.

Tableau 14 : Le suivi de la production de protéase durant 9 h chez *Lb. viridescens* (S3) dans le milieu MRS.

Heures	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	6,93	6,90	6,89	6,82	6,73	6,51	6,49	6,06	5,86	5,77
DO à 660 nm	0,140	0,174	0,197	0,298	0,471	0,820	1,260	1,677	1,797	1,878
protéines totales (mg/ml)	0,039	0,039	0,038	0,038	0,038	0,038	0,035	0,040	0,042	0,042
Activité proteasique (U/ml)	0,00	0,191	0,437	0,748	0,994	0,104	1,000	0,982	0,952	0,984
Activité spécifique (U/mg)	0,00	4,92	11,5	19,69	26,18	27,40	28,58	24,57	23,82	23,43

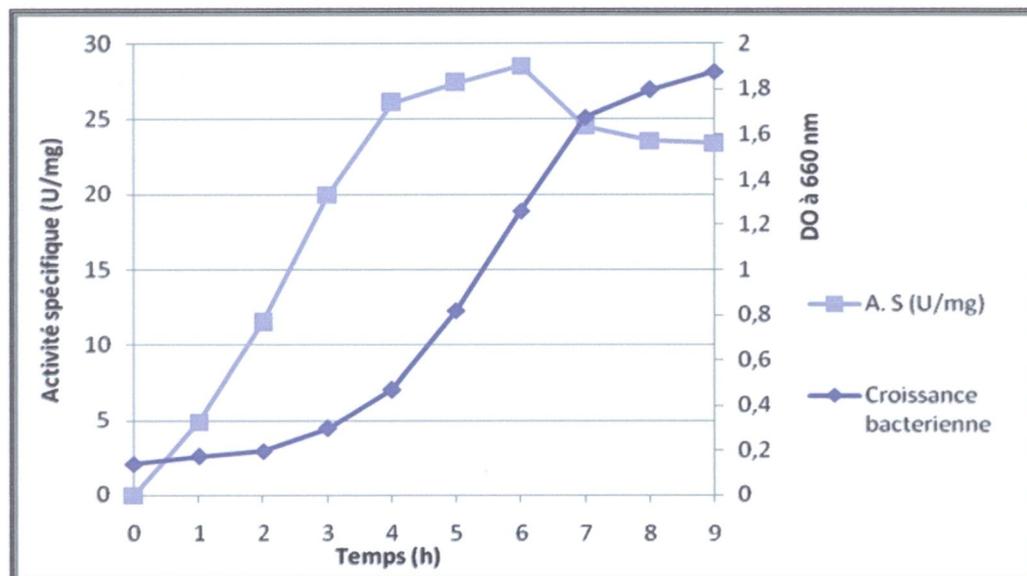


Figure 15: Le suivi de la production de protéase durant 9h chez *Lb. viridescens* (S3) dans le milieu MRS.

La croissance bactérienne de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) sur milieu MRS a été suivie en mesurant l'absorbance de la culture à 660 nm, le pH et l'activité spécifique ont également été mesurés. D'après les résultats, les deux souches *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) entrent dans la phase exponentielle après 2 h de l'incubation, durant cette croissance, on observe une diminution de pH chez les deux souches en raison de leur production de l'acide lactique. L'activité spécifique a été détectée après 1 h d'incubation, puis elle augmente durant la phase exponentielle de croissance et atteint un maximum d'activité à 5 h chez *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) (23,51 U/mg) et à 6 h chez *Lb. viridescens* (S3) (28,58 U/mg).

Dans une étude réalisée par *Hebert et al., (2008)*, la cinétique de croissance dans le milieu minimum additionnée de CaCl₂ a suivi le même profil que celui présenté dans les figure 14 et 15, l'activité a été révélée au début d'incubation en présence de caséine. Ceci pourra nous permettre d'utiliser les souches dans les processus de protéolyse nécessitant des temps relativement courts.

II. 5. Suivi de la croissance et de l'activité spécifique pendant 96 h

La production des protéases extracellulaires a été suivie au cours de la croissance des deux souches de *Lactobacillus Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) sur milieu MRS pendant 96 h comme décrit précédemment dans Matériels et Méthodes, et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 15 et les figure 16.

Tableau15: Suivie de la production des protéases par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) pendant 96 h dans le milieu MRS.

Heures	S1					S3				
	0	24	48	72	96	0	24	48	72	96
pH	6,87	4,84	4,73	4,70	4,79	6,90	4,98	4,73	4,78	4,85
DO à 660 nm	0,060	2,311	2,330	2,365	2,349	0,174	2,278	2,312	2,342	2,286
protéines totales (mg/ml)	0,040	0,032	0,033	0,037	0,044	0,042	0,033	0,033	0,034	0,047
Activité protéasique (U/ml)	0,00	0,964	1,096	0,940	0,448	0,00	0,900	1,061	0,953	0,466
Activité spécifique (U/mg)	0,00	30,12	32,15	25,40	11,20	0,00	27,27	32,17	28,02	9,92

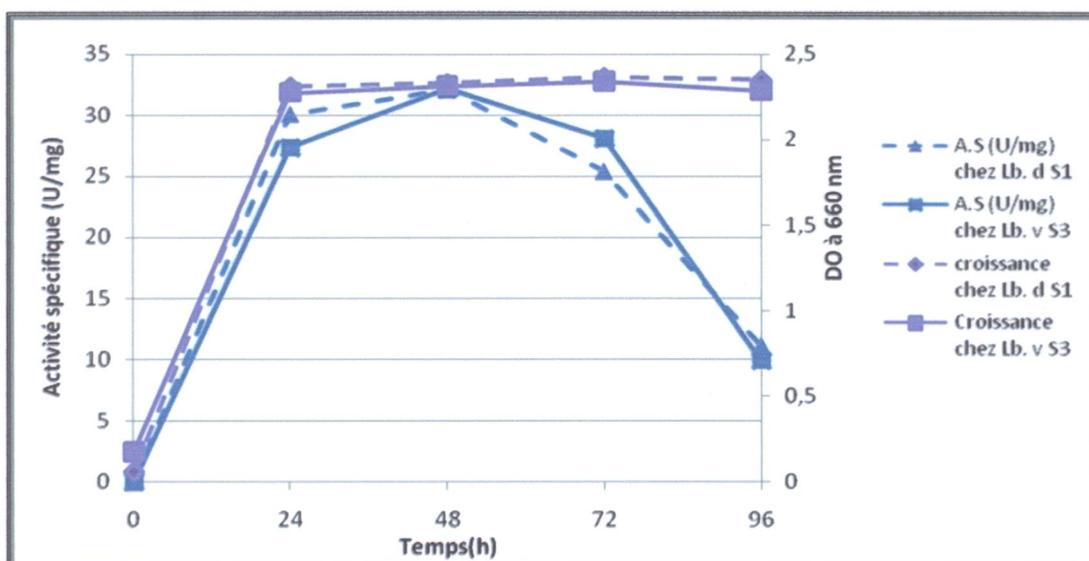


Figure 16: Suivie de la production des protéases par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) pendant 96 h dans le milieu MRS.

D'après les résultats, on a observé qu'il existe deux phases de croissance chez *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3), la phase exponentielle qui dure 24 h et la phase stationnaire qui persiste jusqu'à 96 h. En plus, une diminution rapide du pH a été observée dès le premier jour de fermentation, où le pH chute de 6,87 à 4,79, cette variation du pH est corrélée avec la production d'acide lactique qui est le principal métabolite formé. Parallèlement à la croissance, l'activité spécifique des deux souches *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) a augmenté et atteint le maximum (32,15 et 32,17 U/mg, respectivement) après 48h pendant la phase stationnaire. Puis, elle a diminué et atteint le minimum (11,20 et 9,92 U/mg, respectivement) après 96 h. Ces résultats peuvent s'expliquer par la production de protéase durant la phase exponentielle avec une continuation de la production au début de la phase stationnaire.

L'objectif de cette expérience était de prolonger la durée d'incubation des bactéries lactiques au delà de 24 h afin de provoquer une autolyse cellulaire après déplétion totale des éléments nutritifs; ce qui pourrait libérer le contenu cellulaire entre autres, les enzymes intracellulaires de la protéolyse, chose qui n'a pas été accomplie avec succès. **Roudj et al., (2009)** ont démontré que l'autolyse bactérienne chez *Lb. plantarum* BH14 et *Lb. brevis* CHTD27 a été observée après 7 jours d'incubation sur milieu MRS dans des conditions de croissance optimale.

On remarque que l'activité spécifique atteint le maximum après 48 h d'incubation, il ya une diminution de l'activité enzymatique après 48 h, ces résultats sont en accord avec ceux qui rapporté par **Ul-haq et Mukhtar, (2006)** où ils ont montré que la production maximale de protéase par *Lb. paracasei* est détectée après 48 h d'incubation.

II. 6. Précipitation au sulfate d'ammonium à 75% de saturation

Les deux souches *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) ont été cultivées sur milieu MRS pendant 24 h à 37°C, la culture a été clarifiée par centrifugation, ensuite l'enzyme brute a été précipité par le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 75% de saturation selon la méthode décrite par **Krishna et al., (2009)**. Les résultats obtenus après précipitation par le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 75% de saturation, sont illustrées dans le tableau 16 et la figure 17.

Tableau 16: Précipitation au sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 75% de saturation.

	Culot	Surnageant
Activité protéasique (U/ml) S1	1,102	0,140
Activité protéasique (U/ml) S3	1,515	0,222

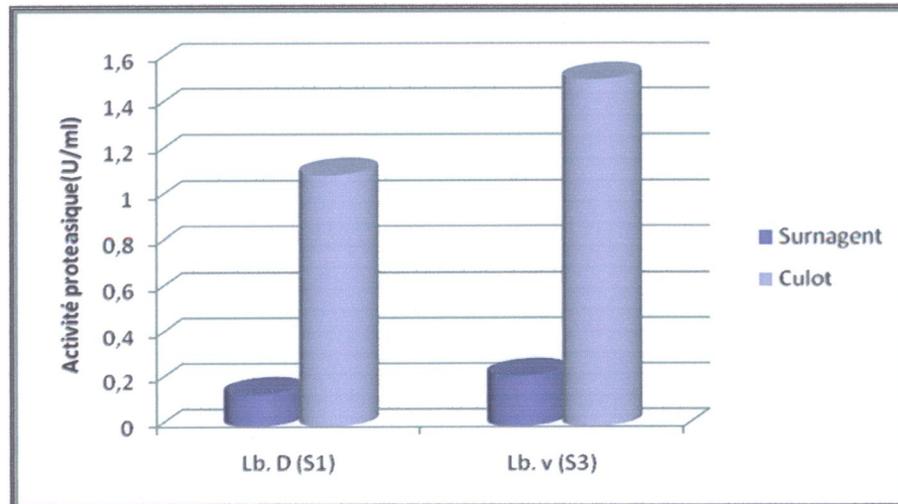


Figure 17: Précipitation au sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 75% de saturation.

Le sulfate d'ammonium est le sel le plus utilisé au laboratoire pour précipiter les protéines, car sa solubilité n'affecte pas la température de la solution, ne dénature pas les protéines son coût est relativement faible (Sine, 2003). Cette technique est utilisée pour la précipitation partielle des protéines (Sharmin et Rahman, 2007).

A partir des résultats obtenus, plus d'une activité est présente dans le surnageant brut des deux souches de bactéries lactiques puisque même après précipitation de la majorité des protéines (75% de saturation), une petite fraction existe toujours à l'état soluble : 0,140 U/ml et 0,222 U/ml pour *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3), respectivement. De l'autre côté la fraction des protéines précipités (culot) contient la plus grande partie des enzymes protéolytiques pour les deux souches : 1,102 U/ml et 1,515U/ml pour *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3), respectivement. Du fait de sa résolution relativement faible, la précipitation au sulfate d'ammonium ne pourra pas être suffisante pour la séparation des enzymes et donc pour leur caractérisation physicochimique, elle devra être complétée par des techniques chromatographiques.

II. 7. Les caractéristiques physicochimiques de l'enzyme brute

Pour étudier les propriétés physicochimiques des protéases extracellulaires produites par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3), l'effet du pH, l'effet de la température, l'effet de quelques ions métalliques ainsi que l'effet de l'EDTA sur l'activité protéasique ont été testés.

II. 7.1. Effet du pH sur l'activité protéolytique

L'effet du pH sur l'activité des protéases produites par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) a été déterminé par l'étude de l'activité enzymatique à différents pH (5-11). Les résultats sont présentés dans le tableau 17 et la figure 18.

Tableau17: L'effet du pH sur l'activité des protéases produites par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3).

Valeurs de pH	5	6	7	7,5	8	8,5	9	10	11
Activité protéasique de S1 (U/ml)	0,544	0,563	0,550	0,526	0,538	0,544	0,538	0,525	0,521
Activité protéasique de S3 (U/ml)	0,499	0,569	0,598	0,605	0,621	0,630	0,583	0,591	0,563

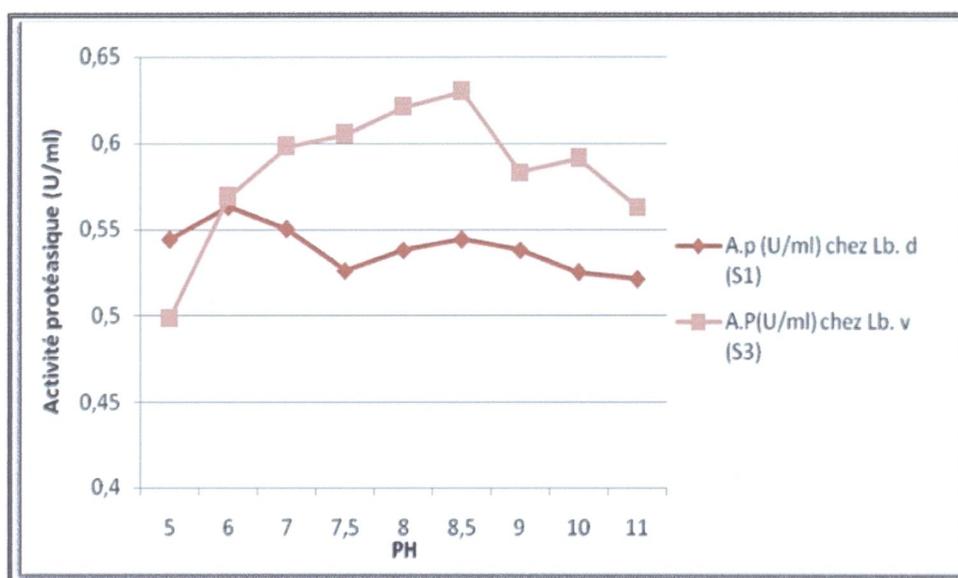


Figure 18: L'effet du pH sur l'activité des protéases produites par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens*

Les enzymes brutes des deux souches de *Lactobacillus* ont été actives dans une large gamme de pH (5-11), pour la protéase produite par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1), elle a de hautes activités protéasiques (0,544 U/ml; 0,563 U/ml; 0,544 U/ml) à pH 5, 6, 8,5, respectivement. Pour la protéase produite par *Lb. viridescens* (S3), elle présente un maximum d'activité protéasique (0,630 U/ml) à pH 8, ce qui ne laisse supposer que le surnageant de *Lb. viridescens* (S3) contient deux types d'enzymes, l'une active à pH acide et l'autre à pH alcalin. Les protéases issues de nos souches peuvent être des protéases acides ou alcalines et les valeurs de pH optimal d'activité obtenues sont dans la gamme de pH rapportées dans la littérature. La protéase de *Lb. Plantarum* NCIM 2083 était active à pH 7 (Marathe et Ghosh, 2009). De l'autre côté le pH 5,5 était l'optimal pour l'activité de la protéase issue de *Lb. plantarum* (Ducastelle et Lenoir, 1969)

Les protéases acides trouvent beaucoup d'intérêt en industrie laitière, particulièrement dans les produits de fromage (Desmazaud, 1998). D'autre part, les protéases alcalines sont gagnées beaucoup d'attention pour l'application dans différents domaines alimentaire et pharmaceutique (Gupta et al., 2002a)

II. 7. 3. Effet de la température sur l'activité protéolytique

L'effet de la température sur l'activité des protéases produites par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) a été déterminé par l'étude de l'activité enzymatique à différentes températures (25-60 °C). Les résultats sont présentés dans le tableau 18 et la figure 19.

Tableau 18: L'effet de la température sur l'activité des protéases produites par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3).

Valeurs de température °C	25	30	37	40	50	60
Activité protéasique de S1 (U/ml)	0,521	0,517	0,591	0,474	0,521	0,551
Activité proteasique de S3 (U/ml)	0,590	0,598	0,499	0,622	0,614	0,613

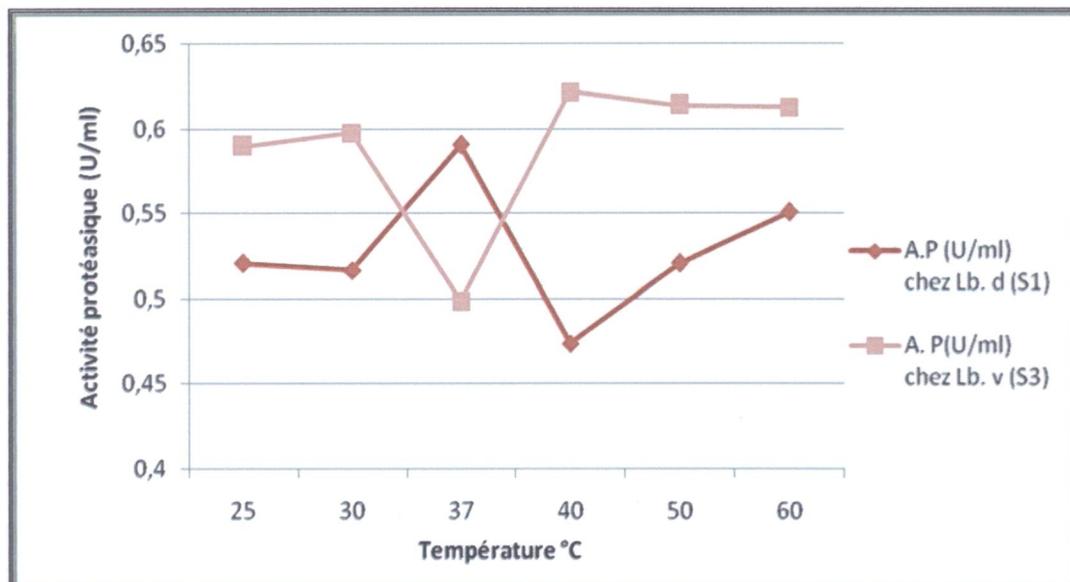


Figure 19: L'effet de la température sur l'activité des protéases produites par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3).

L'activité protéasique augmente avec l'augmentation de la température. Les deux enzymes sont activés sur toute la gamme de température, l'activité maximale (0,591 U/ml) a été marquée à 37°C pour la protéase produite par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1). Mais pour la protéase produite par *Lb. viridescens* (S3), l'activité maximale (0,622 U/m) a été observée à 40 °C

Les valeurs de la température optimale d'activité protéasique obtenues sont dans la gamme de pH rapportées dans la littérature. La protéase de *Lb. plantarum* était active à la 45°C (*Ducastelle et lenoir 1969*). De l'autre côté, était l'optimal pour l'activité de la protéase issue de *Lb. plantarum* NCIM 2083 (*Marathe et Ghosh, 2009*).

II. 7.3. Effet des ions métalliques sur l'activité protéolytique

L'effet de quelques ions métalliques sur l'activité des protéases extracellulaires, produites par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) a été étudié comme décrit précédemment dans la partie Matériel et Méthodes. Les résultats sont présentés dans le tableau 19, les figures 20 et 21.

Tableau 19: L'effet des ions métalliques sur l'activité des protéases produites par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3).

	les ions					
	CaCl ₂	Mg SO ₄ 4 H ₂ O	Zn SO ₄	NaCl	Fe SO ₄	Cu SO ₄ 5 H ₂ O
Activité protéasique de S1 (U/ml)	0,418	0,426	0,416	0,435	0,738	0,414
Activité résiduelle (%) de S1	103,72	105,70	103,22	107,940	183,12	102,72
Activité proteasique de S3 (U/ml)	0,479	0,494	0,447	0,474	0,485	0,450
Activité résiduelle (%) de S3	103,23	106,46	96,33	102,15	104,25	96,98

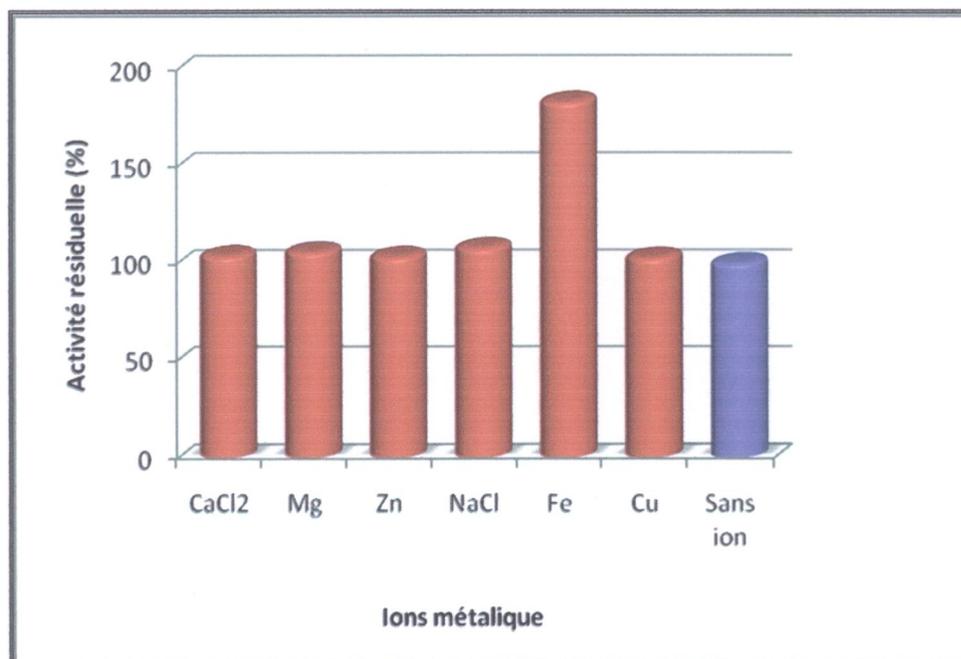


Figure 20: L'effet des ions métalliques sur l'activité protéasique de protéase produite par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1)

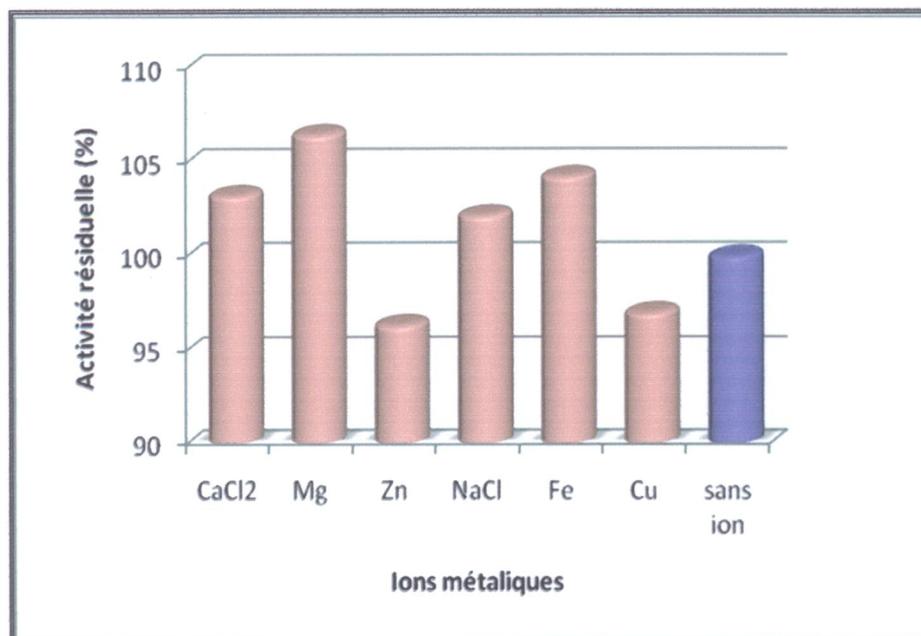


Figure 21: L'effet des ions métalliques sur l'activité protéasique de protéase produite par *Lb. viridescens* (S3).

D'après les résultats, les ions métalliques utilisés (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Na^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+}) n'ont pas exercés un effet inhibiteur remarquable sur les 2 protéases, en revanche, les ions Fe^{2+} active clairement l'enzyme produite par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1), où on note une activité résiduelle de 183,12%. parallèlement, **Gaur et al., (2010)** ont montré que les ions Cu^{2+} , Mg^{2+} et Ca^{2+} avaient un rôle positif sur l'activité protéasique de l'enzyme produite par *Pseudomonas thermaerum* GW1, par contre, une inhibition accrue est observé avec les ions Zn^{+2} et Fe^{2+} . D'autres protéases sont également activées par les ions Mg^{2+} , Ca^{2+} comme celle produites par les Actinomycetes (**El Zawahry et al., 2007**). De l'autre côté, **Marathe et Ghosh, (2009)** ont montré que les ions Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} avaient un effet négatif sur l'activité de la protéase produite par *Lb. plantarum* NCIM 2083.

Les cofacteurs peuvent être considérés comme des molécules d'assistance aidant aux transformations biochimiques, au stabilisation de la structure des protéines et la régulation de l'activité enzymatique (**Olorunnji et al., 2007**).

II. 7. 4. Effet de l'EDTA sur l'activité protéolytique

L'effet de l'inhibiteur spécifique des métalloprotéases sur l'activité des protéases extracellulaires produites par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) a été étudié comme décrit précédemment dans la partie Matériels et Méthodes. Les résultats sont résumés dans le tableau 20 et la figure 22.

Tableau 20: L'effet de l'EDTA sur l'activité protéasique de protéase produite par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3).

	EDTA	
	S1	S3
Activité protéasique (U/ml)	0,351	0,431
Activité résiduelle (%)	87,09	92,88

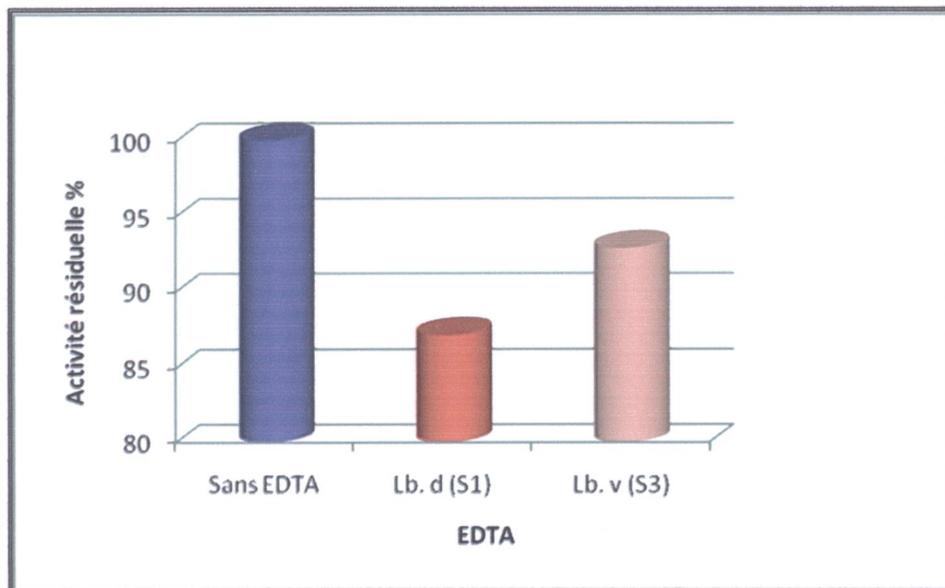


Figure 22: L'effet de l'EDTA sur l'activité protéasique de protéase produite par *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3).

Dans cette étude on a démontré que l'EDTA avait un léger effet inhibiteur sur l'activité protéasique de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viridescens* (S3) avec des activités résiduelles de 87,09 et 92,88 %, respectivement. Ce qui pourrait mettre en évidence la présence d'une enzyme nécessitant un cofacteur métallique parmi les enzymes présente dans le surnageant.

Pour la protéase de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1), le cofacteur métallique pourrait bien être l'ion Fe^{2+} , et qui a été fixé par l'EDTA, ce qui a diminué l'activité enzymatique. Ces résultats sont confirmés par celle rapporté par *Pereira et al., (2001)* qui ont trouvé que l'EDTA a inhibé l'activité protéasique de *Lb. curvatus* et *Lb. Homohiochii*.

Conclusion

Le modeste travail a été consacré à l'étude de l'activité protéolytique issue de quelques bactéries lactiques, particulièrement l'optimisation des conditions de culture dans un milieu liquide, après la sélection des souches les plus protéolytiques, enfin l'étude de certains caractères physicochimiques de l'enzyme brute.

A l'issue de ce qu'a été réalisé, les conclusions suivantes sont notées.

- Parmi 20 souches de bactéries lactiques isolées de différentes origines, 12 souches présentaient une activité sur une gélose au lait écrémé, parmi elles seulement 11 exerçaient une activité protéolytique dans le bouillon MRS.
- En comparant la productivité de l'enzyme, sur 7 milieux liquides différents (MRS, RSM, LP, MM+G, MM+F, MM+M, MM+L, MM+P), il apparaît clairement que le bouillon MRS représente le milieu de choix pour la production, sans négliger l'effet inducteur observé en présence de glucose et de fructose.
- Le pH optimal de la production des protéases sur milieu MRS était égal à 7 et la température optimale égale à 37°C pour les 2 souches de *Lactobacillus*.
- Sur le milieu RSM, un décalage a été constaté, le pH optimal de la production était égal à 6.5 et la température à 25°C pour les 2 souches de *Lactobacillus*.
- La caractérisation de l'activité enzymatique a révélé que *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1), produit 2 types d'enzymes, l'une d'elle est active à pH acide (5 et 6), l'autre présente une activité maximale à pH alcalin (8.5). Par autre *Lb. viredescens* (S3), produit une enzyme active à pH 8. La température optimale de l'activité des enzymes de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) était égale à 37°C, par contre, 40°C était optimale pour l'activité de la protéase de *Lb. viredescens* (S3).
- Les ions Fe^{2+} exercent un effet activateur sur l'enzyme de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1), ce qui démontre qu'il s'agit probablement d'une métalloprotéase. Les autres ions n'avaient pas d'effet remarquable.
- L'EDTA qui est un inhibiteur des métalloprotéases, a réussi à diminuer l'activité de la protéase de *Lb. viredescens* (S3), ce qui confirme sa nature métalloprotéasique.

Pour compléter les données, il sera préférable de considérer les points suivants:

- Approfondir l'investigation en étudiant les enzymes protéolytiques associées à la paroi et celles intracellulaires.
- Purifier les enzymes par des techniques chromatographiques, ce qui pourra donner plus de chance à la caractérisation physicochimique complète des enzymes, (poids moléculaire, température, pH...etc.).
- Prévoir des applications aux industries alimentaires, particulièrement dans des produits laitiers.

Références bibliographiques

Beg Q., Saxena R. K. et Gupta R. 2002. De repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavenis* under fed-batch operations. *Process. Biochem.* 37: 1103-1109.

Benkadri S. 2010. Contribution à la diversification de l'alimentation pour enfants coeliaques: fabrication de farines-biscuits sans gluten. Thèse de Magister. Université de Mentouri. Constantine.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye bindings. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Chamba F.J. 2008. Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. **Luquet F. M. et Corriau G.** Edition TEC & DOC. Lavoisier. Paris : 794.

Chellapandi P. 2010. Productio and Preliminary Characterisation of Alkaline Protease from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus Terreus*. *J. Chem.* 7: 479-482.

Chomsri N. 2008. Impact of protease activity of yeasts on wine fermentation and formation of volatile and non volatile metabolites. Thèse de Doctorat. Institute of Nutritional Science, Liebig-University. Germany.

Coral G., Arikan B., Unadi M. N. et Guvenmez H. 2003. Thermostable alkaline protease produced by *Aspergillus niger* strain. *Ann. Microbiol.* 53 (4): 491-498.

Das G. et Pasad M. P. 2010. Isolation, purification & mass production of proteases enzyme from *Bacillus subtilis* .*Int. Res. J. Microbiol.* 1(2): 26-31.

De Giori G. S. de Valdez G. F. De Ruiz Holgado A. P. et Oliver G. 1985. Effect of pH and Temperature on the Proteolytic Activity of Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 68: 2160-2164.

Desmazeaud M. 1983. L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le Lait.* 6 (3) : 267-316.

Desmazeaud M. 1998. Bactéries lactiques et qualité des fromages. INRA Jouy-en-Josas: 1-3.

Desmazeaud M. et Spinnler. 1997. Enzymes et produits carnés. In: Enzymes en agroalimentaire. **Larreta-Garde V.** Edition TEC & DOC. Paris : 86.

Dortu C. et Thonart P. 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agr. Soc. Environ.* 13 (1) : 143-154.

Ducastelle A. et Lenoir J. 1969. Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin. III.- Son activité protéolytique. *Le Lait.* 49 : 489-490.

El Enshasy H., Abuoul-Enein A., Helmy S. et El Azaly Y. 2008. Optimization of the Industrial Production of Alkaline Protease by *Bacillus licheniformis* in Different Production Scales. *Australian J. Basic. Appl. Sci.* 2 (3): 583-593.

El Zawahry Y. A., Awny. N. M.; Tohamy E. Y.; Abou Zeid A. A. M. et Reda F. M. 2007. Optimisation characterization and purification of protease production by some Actinomycetes isolated under certain stress conditions. Proceeding of the second Scientific Environmental Confer. Zagazig Uni. 153 - 175.

Fauconneau J. 1989. Aspects technologiques du lait de bovins. Conservation. Transformation. Options Méditerranées. Série Séminaires. 6: 181-189.

Federighi M., Pilet F. M. et Magras C. 2005. Bactéries lactiques. In : Bctériologie alimentaire : compendium d'hygiène des aliments. **Federighi M.** 2^{ème} édition. ECONOMICA. Paris : 219-220.

Fellahi S. 2009. Isolation, Identification, and Proteolytic Activity of Some Protease-Producing Bacteria. Thèse de Magistère. Alexandria University. Egypt.

Gaur S., Agrahari S. et Wadhwa N. 2010. Purification of Protease from *Pseudomonas thermaerum* GW1 Isolated from Poultry Waste Site. Open Microbiol. J. 4: 67-74.

Gençkal H. 2004. Studies on Alkaline Protease Production from *Bacillus sp.* Thèse de Magistère. Institut of Technology. Izmir-Turkey.

Guiraud J. P. 1998. Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris : 91-92.

Guiraud J. P. et Rosec J.P. 2004. Autres flores. In : Pratiques des normes en microbiologie alimentaire. ©AFNOR. France: 237, 241-242.

Gupta R., Beg Q. K. et Lorenz P. 2002 (a). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 15-30.

Gupta R., Beg Q. K., Khan, S. et Chauhan, B. 2002 (b). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60: 381-395.

Gupta R., Beg Q. K. et Sahai V. 2003. Statistical media optimisation and alkaline protease production from *Bacillus majavensis* in a bioreactor. Process. Biochem. 39: 203-209.

Hameed A., Keshavarz T. et Evans C. S. 1999. Effet 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. J. Chem. Technol. Biotechnol. 74: 5-8.

Hase C. et Finkelstein R. A. 1993. Bacterial Extracellular Zinc-Containing Metalloproteases. Microbiol. Rev. 57 (4): 823-837.

Hebert E. M., Mamore G., Picariello G., Raya R. R., Savoy G., Ferranti. et Addeo F. 2008. Characterization of the Pattern of α_{s1} - and β -Casein Breakdown and Release of Bioactive Peptide by a Cell Envelope Proteinase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis* CRL 581. Appl. Environ. Microbiol. 74 (12): 3683-3689.

Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E., Karam N.E. 2009. Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. Grasas y aceites. 60 (2): 177-183.

Joffin J. N. et Leyral G. 2001. Microbiologie technique. 2^{ème} édition. TEC & DOC. Scèren CRDP, AQUITAINE. France: 11-12.

Joo H. S., Kook B., Park K. I., Bae S. H., Yun J. W., Chang C. S. et Choi J. W. 2007. Cloning and Expression of the Cathepsin F-like Cysteine Protease Gene in *Escherichia coli* and its Characterization. J. Microbiol. 45 (2): 158-167.

Khalid N. M. et Marth E. H. 1990. Lactobacilli - Their Enzymes and Role. In: Ripening and Spoilage of Cheese. Rev. Dairy Sci 73:2669-2684.

Kim E.Y., Kim Y.H., Rhee M.H., Song J.C., Lee K.W., Kim K.S., Lee S.P., Lee I.S., et Park S.C. 2007. Selection of Lactobacillus sp. PSC101 that produces active dietary enzyme such as alyase, lipase, lipase, phytase, and protease in pigs. J. Gen. Appl. Microbiol. 53: 111-117.

Krishma K. V., Gupta m., Gaudani H. , Trivedi S., Patil P., Gupta G., Khairnar Y., Borasate A. et Mishra D. 2009. Optimization of growth and production of proteas by *Penicillium* species using submerged fermentation. Int. J. Microbiol. Res. 1: 14-18.

Kumar C. G. et Takagi H. 1999. Microbial alkaline proteases from bioindustrial viewpoint. Biotechnol Advances. 17: 561-594.

Kumar D., Gupta G., Sharma S. et Bhalla T. C. 2008. Immobilization of thermostable and alkaline protease of thermophilic *Bacillus sp.* APR-4. International Conference on Bioencapsulation. 1-4.

Larpent P. J. 2000. Introduction à la nouvelle classification bactérienne, les principaux groupes bactériens. TEC & DOC. Paris: 180.

Larreta-Garde V. et Ouali A. 1997. Enzymes et produits carnés. In: Enzymes en agroalimentaire. Larreta-Garde V. Edition TEC & DOC. Paris: 86.

Leclerc H., Gaillard F L. et Simonet M. 1994. Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale: la bactérie et le monde microbien. DOIN. Paris: 445.

Leveau J. Y. et Bouix M. 1993. In : Microbiologie industrielle: les microorganismes d'intérêt industriel. Collection science et technique. Agroalimentaire. Paris : 170-172.

López Kleine L. 2008. Détermination du rôle de certaines peptidases bactériennes par inférence à partir de données hétérogènes et incomplètes. Thèse de Doctorat. Ecole Doctorale ABIÉS.

Marathe M. Y. et Ghosh J. S. 2009. Study of proteinase activity of *Lactobacillus plantarum*. Int. J. Genet. Mol. Biol. 1 (1): 1-5.

Meunier N. 1999. Evaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. Thèse de Magistère. Université du Québec. Canada.

Monnet V., Atlan D., Chouayekh H. et al. 2008. Métabolisme et ingénierie métabolique. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Luquet F. M. et Corriau G. Edition TEC & DOC. Lavoisier. Paris : 349, 352, 356, 364, 374, 376, 378.

Olorunni F., Igunnu A., Adebayo J. O., Arise R. O. et Malomo S.O. 2007. Cofactor interactions in the activation of tissue non-specific alkaline phosphate: Synergistic effects of Zn^{2+} and Mg^{2+} ions. *Biochem.* 19 (2): 43-48.

Pawar, R., Vasudeo Z., Siddhivinayak B. et Govind P. 2009. Application of protease isolated from *Bacillus* sp. 158 in enzymatic cleansing of contact lenses. *Biotechnol.* 8: 276-280.

Pereira C.I., Barreto Crespo M. T. et San Romao M. V. 2001. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *Int. J. Food Microbiol.* 68: 211-216.

Perry J. J., Staley J. T. et Lory S. 2004. *Microbiologie. Cours et questions de révision.* DUNOD: 478-479.

Pilet M F., Magras C. et Federighi M. 1998. Les bactéries lactiques. In : Manuel de bactériologie alimentaire. **Sutra L., Federighi M. et Jouve L.** Polytechnica. Paris: 235-236.

Pot B. 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. **Luquet F. M. et Corriau G.** Edition TEC & DOC. Lavoisier. Paris : 1,42.

Raimi O. G., Kappo M. A., Fajana O., Oku S. S. et Adeniji M. A. 2010. Alkaline protease from maggots: a likely source of industrial enzyme. *J. Cell Tissue Res.* 10 (3): 2419-2422.

Rajendran, A. and Thangavelu, V. (2008). Evaluation of various unstructured kinetic models for the production of protease by *Bacillus sphaericus* Mtcc511. *Eng. Life Sci.* 8: 1-8.

Ramakrishna D.P.N, Gopi Reddy N and Rajagopal S.V. 2010. Purification and Properties of an Extra Cellular Alkaline Protease Produced By *Bacillus Subtilis* (MTTC N0-10110). *Int. J. Biotechnol. Biochem.* 6 (4): 493–504.

Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. et Deshpande V. V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspect of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3): 597-635.

Renault P. 2008. Génétiques des bactéries lactiques. In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. **Luquet F. M. et Corriau G.** Edition TEC & DOC. Lavoisier. Paris : 232.

Rizzello C.G., De Angelis M., Di Cagno R., Camarca A., Silano M., Losito I., De Vincenzi., De Bari., Palmisano F., Maurano F., Gianfrani C. et Gobberti Marco. 2007. Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (14): 4499–4507.

Ronald R M. HandBook of Microbiological Media. 1998. 2nd Edition. CRC Press. London.

Rosenberg N. 2007. Asthme professionnel aux enzymes. *Inrs. Documents pour le Médecin du travail.* 112 :553-564.

Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N-E. 2009. Protéolyse et Autolyse Chez Deux Lactobacilles Isolés de Lait Camelin du Sud Ouest Algérien Proteolysis and Autolysis

Properties of two Lactobacilli Isolated from Camel Milk of South-Western Algeria. Euro. J. Sci. Res. 34(2): 218-227.

Sangeetha R., Geetha A. et Arulpandi I. 2008. Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. J. Microbiol. 5 (2): 1937-8289.

Savijoki K., Ingmer H. et Varmanen P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71: 394-406.

Saxena R.K. et Singh R. 2010. Statistical optimisation of conditions for protease production from *Bacillus sp.* Acta. Biologica Szegediens. 54 (2):135-141.

Sharmin F. et Rahman M. 2007. Isolation and Characterization of Protease producing *Bacillus* strain *FS-1*. Agr. Eng. Int. 9: 1-10.

Siala R., Kamoun A. S., Hajji M., Abid I., Gharsallah N. et Nasri M. 2009. Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* II: purification and characterization. African J. Biotechnol. 8 (18): 4582-4589.

Sicard P. 1982. Application industrielles des enzymes. In : Les enzymes production et utilisation industrielles. **Durant G. Monsan P.** 1^{er} édition. Gauthier-Villard. Paris : 146.

Silva M., Jacobus N.V., Deneke C. et Gorbach S.L. 1987. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. American Soc. Microbiol. 31(8): 1231-1234.

Sine J.P. 2003. Séparation et analyse des biomolécules. Méthodes physicochimiques Cours et exercices. Édition Ellipses. Paris:12.

Sine J.P. 2010. Enzymologie et application. Édition Ellipses. Paris: 301-305, 318-320, 331, 340, 341,361, 385-387, 396.

Sultana. K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R., Kailasapathy K. et Peiris P. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Int. J. Food Microbiol. 62: 47–55.

Sutar, I. I., H. G. Vatak, M. C. Srinivasan, and H. Sivaraman. 1986. Production of alkaline protease by immobilized mycellium of *Conidiobolus*. Enz. Microbiol. Technol. 8: 632 – 634.

Thys R.C.S., Guzzon S.O., Cladera-Olivera F. et Brandelli A. 2005. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology Process. Biochem. 41: 67-73.

Ul-Haq I. et Mukhtar H. 2006. Biosynthetic of protease from *Lactobacillus paracasei*: Kinetic analysis of fermentation parameters. Indian J. Biochem. Biophys. 43: 377-381.

Ul-Haq I., Mukhtar H., Daudi S., Ali S. et Qadeer A. 2003. Production of protease by locally isolated culture under lab conditions. Biotechnol. 1 (2): 30-36.

Varela H., Ferrari M. D., Belobradjie L., Weyruch R. et Loperena M. L. 1996. Effet of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity. World. J. Microbiol. Biotechnol. 12: 643-645.

Vermeulen N., Pavlovic M., Ehrmann M A., Gänzle M G. et Vogel R F. 2005. Functional Characterization of the Proteolytic System of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T during Growth in Sourdough. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (10): 6260-6266.

Wendersman, C. 1989. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol. Microbiol.* 3: 1825-1831.

Wigler M. 1977. Transfer of purified Herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell.* 11: 223-232.

Yahi N., Tamalet C., Tourres C., Tivol N., Arias F., Volot F., Gastaut J. A., Gallais H., Moreau J. et Fantini J. 1999. Mutation Patterns of the Reverse Transcriptase and Protease Genes in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Undergoing Combination Therapy: Survey of 787 Sequences. *J. Clin. Microbiol.* 37: 4099-4106.

Annexes

Annexe 1

Composition des milieux (g /l)

Milieu Man Rogosa Sharp Agar MRS (autoclave à 120°C pendant 20minutes)

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	8 g
Extrait de levure.....	4 g
Acetate de Sodium.....	.5 g
Citrate d'amonium.....	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0, 2 g
MnSO ₄ .H ₂ O.....	0, 05g
K ₂ HPO ₄	2 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Tween 80.....	1 ml
Eau distillée QSP.....	1 L
pH.....	6,2

Milieu Minimum (autoclave à 120°C pendant 10 minutes)

Glucose.....	10 g
NH ₄ SO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	7 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0, 1 g
NaCl.....	2 g
Eau distillée QSP.....	1 L

Milieu Reconstituted Skimmed Milk RSM (autoclave à 120°C pendant 10min)

Lait écrémé.....	90, 5g
Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	20g
Eau distillée QSP.....	1 L

Gélose MRS au lait écrémé Candia (2%) autoclave à 120°C pendant 10min

Gélose MRS.....	98ml
-----------------	------

Annexe 2

Les tampons et les solutions utilisés

Tampon phosphate 1M 100ml

K_2HPO_4 (1M).....61,50 ml

KH_2PO_4 (1M).....38,50 ml

Solution de caséine

2,5 g de caséine dans 100 ml de citrate de sodium 2N

Solution de BSA

0,01 g de BSA dans 100 ml d'eau distillée

Solution de tyrosine

0,01 g de tyrosine dans 100ml d'eau distillée

Réactif de Bradford

Faire dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie G250 dans 50 ml d'éthanol (95%), mélanger la solution avec 100 ml d'acide phosphorique (85%) et compléter le volume à 1 litre d'eau distillée, puis filtrer à travers un papier filtre Wattman n°1.

Annexe 3

Préparation de la courbe d'étalonnage de la tyrosine à partir de la solution mère (0,01%).

	1	2	3	4	5	6
Tyrosine (ml)	0	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Tampon (P) (ml)	5	5	5	5	5	5
DO 280 nm	0	0,16	0,22	0,23	0,31	0,32
Concentration de Tyrosine (mg/ml)	0	0,0093	0,0125	0,0156	0,0187	0,0218

Préparation de la courbe d'étalonnage du Bovine Serum Albumin (BSA) à partir de la solution mère (0,01%).

	1	2	3	4	5	6
BSA (ml)	0	0,5	0,7	0,9	1,1	1,3
Réactif de Bradford (ml)	5	5	5	5	5	5
DO 595 nm	0	0,236	0,386	0,531	0,732	0,906
Concentration de protéine (mg/ml)	0	0,0056	0,0090	0,0122	0,0152	0,0180

Annexe 04

Le tableau donne les quantités de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C.

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

Présenté par : Herida Fatima Kihal Ahlam	Encadré par : Dr. Ouled haddar H.	Soutenu Le 04. 07. 2011 A 09 :45
--	--------------------------------------	--

Le thème : Optimisation de la production d'une enzyme protéolytique par *Lactobacillus* sp. et caractérisation de ses propriétés physicochimiques.

Résumé

Ce travail a été consacré à l'étude de l'activité protéolytique produite par quelques bactéries lactiques appartenant au Genre *Lactobacillus*, issues de différentes sources, principalement l'optimisation des conditions de culture (milieu de culture, température optimale, pH optimal) dans un milieu liquide (MRS, RSM MM additionné de différents sucres) après sélection des souches les plus protéolytiques (*Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) et *Lb. viredescens* (S3)) la culture des bactéries dans le milieu MRS pH 7 à 37°C fournit un maximum de productivité. Enfin, l'étude de certains caractères physicochimiques (température, pH, effet des ions métalliques et effet de l'EDTA) sur l'activité des enzymes brutes.

Mots clés: Bactéries lactiques, *Lactobacillus*, Activité protéolytique.

Abstract

This work has focused on the study of the proteolytic activity produced by some lactic acid bacteria belonging to the Genus *Lactobacillus* from different origins, principally, the optimization of culture conditions (growth medium, optimal temperature, optimal pH) in liquid media (MRS, RSM, MM supplemented with different sugars) after the selection of the most proteolytic strain (*Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) and *Lb. viredescens* (S3)) optimum conditions for production were MRS broth, pH 7, and 37°C. Finally, a partial physicochemical characterization (optimal temperature of activity, optimum pH, effect of metal ions and EDTA) of crude enzymes was performed.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, proteolytic activity.

ملخص
كرس هذا العمل من اجل دراسة فاعلية التحليل البروتيني الناتجة عن بعض السلالات البكتيرية من نوع *Lactobacillus* المعزولة من مصادر مختلفة ، و بالأخص تحسين ظروف الزرع (وسط الزرع درجة الحرارة المثلى ، الرقم الهيدروجيني الأمثل) في أوساط سائلة (MRS ,RSM ,MM مضاف بمختلف السكريات) وذلك بعد اختيار السلالات الأكثر إنتاجا لإنزيم البروتياز (*Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* (S1) و *Lb. viredescens* (S3)) وقد تم التوصل الى الظروف الملائمة و المتمثلة في وسط MRS ذو رقم هيدروجيني 7 على درجة حرارة 37°م بالنسبة للسلالتين، وفي الأخير تم دراسة بعض الخصائص الفيزيوكيميائية (درجة الحرارة ، الرقم الهيدروجيني ، تأثير الايونات المعدنية و ال EDTA) على فاعلية للإنزيمات الخام.

الكلمات المفتاح : بكتيريا لبنية، عصيات لبنية، النشاط البروتيازي .