

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

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



جامعة جيجل
كلية العلوم الدقيقة و علوم
الطبيعة و الحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية
و الخلوية

جامعة محمد الصادق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : A.8527

Mémoire de fin D'études Pour L'obtention Du Diplôme

Master 2 en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Intitulé

**Screening de quelques souches isolées du
sol à activité protéolytique**

Membres de Jury :

Président : Dr. Sifour M.

Examineur : Dr. Boudjerda D.

Encadreure : Dr. Laggoune S.



Présenté par :

Boughadda Hocine.

Année universitaire : 2011-2012.

Remerciements

J'exprime tout d'abord, mes profonds remerciements et louanges à ALLAH tout puissant, qui m'a guidé sur le droit chemin et m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie, de l'Université de Jijel.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect à ma promotrice, Dr. S. Laggoune pour sa patience, ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont j'ai pu bénéficier.

C'est avec un très grand plaisir que je remercie infiniment Dr. M. Sifour d'avoir bien voulu présider ce modeste travail, qu'il trouve ici ma très profonde gratitude.

Je voudrais exprimer également ma sincère reconnaissance au Dr. D. Boudjerda d'avoir examiner ce travail.

Je tiens à exprimer ma grande considération et mes sentiments de reconnaissance à Dr. T. Idoui, Dr. H. Ouled Haddar, Dr. F. Bousdira, Dr. I. Ghorab.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

BOUGHADDA Hocine

Introduction.....	01
Partie I. Synthèse bibliographique	
I.1. Les microorganismes et le sol.....	02
I.1.1. Le sol.....	02
I.1.2. La microflore du sol.....	02
I.1.2.1. Bactéries.....	02
I.1.2.2. Champignons.....	02
I.1.2.3. Protozoaires.....	03
I.1.2.4. Algues microscopiques.....	03
I.1.3. Distribution des microorganismes en fonction du sol.....	03
I.2. Les bactéries.....	03
I.2.1. Définition.....	03
I.2.2. Les bactéries sporulées.....	04
I.2.3. Les bactéries à activité protéolytique.....	04
I.2.3.1. Définition.....	04
I.2.3.2. Activité protéolytique.....	05
I.2.3.3. Isolement des bactéries protéolytiques.....	05
I.2.3.4. <i>Bacillus subtilis</i> un exemple d'une bactérie du sol production de protéases.....	05
I.3. Les enzymes protéolytiques.....	06
I.3.1. Définition.....	06
I.3.2. Sources des protéases.....	07
I.3.2.1. Protéases végétales.....	07
I.3.2.2. Protéases animales.....	07
I.3.2.3. Protéases microbiennes.....	08
I.3.3. Classification des protéases.....	09
I.3.4. Les protéases et l'industrie.....	10
I.3.4.1. Industrie alimentaire.....	10
I.3.4.2. Industrie pharmaceutique et médicale.....	11
I.3.4.3. Détergents.....	12
I.3.4.4. Tanneries.....	12
I.3.4.5. Autres applications.....	12
Partie II. Matériel et Méthodes	
II.1. Matériel.....	13
a- Appareillages.....	13
b- Réactifs et solutions.....	13
II.2. Méthode d'isolement des bactéries à activité protéolytique.....	14
II.2.1. Echantillonnage.....	14
II.2.2. Traitement de l'échantillon.....	14
II.2.2.1. Préparation de la suspension du sol.....	14
II.2.2.2. Chauffage de la suspension du sol.....	14
II.2.2.3. Préparation des dilutions de la suspension du sol.....	14
II.3. Les milieux de culture.....	14
II.4. L'isolement.....	14
II.5. Screening des souches à activité protéolytique.....	15
II.5.1. Purification des bactéries protéolytiques.....	15
II.5.2. Sélection des bactéries les plus protéolytiques.....	15
II.5.2.1. Mesure de l'activité protéolytique des souches isolées.....	15

II.5.2.2. Détermination de la concentration des protéines.....	16
II.6. Identification de genre des souches sélectionnées.....	16
II.6.1. Etude morphologique.....	16
II.6.2. Identification de l'espèce bactérienne des trois souches isolées les plus protéolytiques.....	17
II.6.2.1. Caractères biochimiques.....	17
II.6.2.2. Caractères physiologique.....	20
II.7. Conservation des souches.....	21
II.8. Optimisation de la production de protéase par la meilleure souche productrice de protéase.....	21
II.8.1. Détermination de pH et de la température optimaux de la production de protéase..	22
II.8.2. L'effet de la concentration en substrat sur la production de protéase.....	22
II.8.3. Cinétiques de la production de protéase par la meilleure souche productrice sélectionnée.....	22
II.8.3.1. Préparation de l'inoculum.....	22
II.8.3.2. Le milieu de culture pour la production de protéase	22
II.8.3.3. Conduite de la production.....	22

Partie III. Résultats et discussion

III.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	23
III.2. Screening des souches les plus protéolytiques.....	24
III.3. Identification du genre des bactéries isolées.....	26
III.4. L'identification de l'espèce des trois souches les plus hautes activités spécifique....	28
III.5. L'optimisation de la production de protéase.....	29
III.5.1. Le pH et la température optimaux de la production de protéase par la souche S3....	29
III.5.2. L'effet de la concentration en substrat sur la production de protéase par la souche S3.....	30
III.5.3. Comparaison entre les cinétiques de croissance et de la production de protéase par la souche S3 au cours de 6h.....	31
III.5.4. Suivi de la croissance bactérienne et la production de protéase par la souche S3 pendant 96h.....	32
III.5.5. Evolution des protéines au cours de la production.....	33
Conclusion.....	35
Références bibliographiques.....	36

Abréviations et Symboles

Abréviations

ADN:	Acide d ésoxyribonucléique.
BSA:	Bovine Serum Albumin.
E.C:	Enzyme Commission.
EDTA:	Ethylene Diamine Tetra Acetate.
GRAS:	Generally Regarded As Safe.
NaCl :	Chlorure de sodium.
S.D.S :	Dodécylsulfate de sodium.
TCA:	TriChloroacetic Acid.
TDA :	Réactif perchlorure de fer.
TSI :	Triple Sugar Iron.
LDC :	Lysine D écarboxylase.
ODC :	Ornithine D écarboxylase.
ADH :	Arginine D ihydrolase.
VP :	Voges-Proskauer

Symboles

°C:	Degré Celsius.
D.O :	Densité Optique.
g:	gramme.
h:	Heure.
KDa:	Kilo Dalton.
L :	Litre.
ml :	Millilitre.
M :	Mole.
Mb :	Méga-base.
min :	Minute.
pH:	potentiel d' H ydrogène.
tr/min :	tours/ m inute.
UV :	Ultraviolet.
µg :	Microgramme.
v/v :	volume /volume.

Tableau I.1. Distribution des microorganismes en fonction du sol.....	03
Tableau I.2. Spécificité des protéases.....	07
Tableau I.3. Exemples des protéases microbiennes.....	08
Tableau I.4. Classification des protéases.....	10
Tableau III.1. Mise en évidence de la production de l'activité protéolytique par les 10 souches isolées sur la gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia après 18h de l'incubation à 37°C.....	24
Tableau III.2. Screening secondaire des souches les plus protéolytiques.....	26
Tableau III.3. Caractères macroscopiques et microscopiques des 10 souches isolées....	27
Tableau III.4. Résultats des caractères physiologiques des trois souches isolées S3, S4 et S7.....	28
Tableau III.5. Résultats d'étude des caractères biochimiques des trois souches S3, S4 et S7.....	28
Tableau III.6. Suivi de la croissance bactérienne et la production de protéase par la souche S3 pendant 96h.....	33
Tableau III.7. Evolution des protéines au cours de la production de protéase par la souche S3.....	34

Liste des figures

	Pages
Figure I.1. Quelques formes des bactéries.....	04
Figure III.1. L'effet de quelques souches isolées sur la gélose nutritive à 10% de lait écrémé Candia.....	23
Figure III.2. Courbe d'étalonnage de la tyrosine.....	25
Figure III.3. Courbe d'étalonnage des protéines.....	25
Figure III.4. L'aspect des colonies des souches S6 et S9 sur la gélose nutritive après 18h d'incubation à 37°C, les colonies sont grande et à couleur blanc.....	26
Figure III.5. Le pH optimal de la production de protéase par la souche S3.....	29
Figure III.6. La température optimale de la croissance et la production de protéase par la souche S3.....	30
Figure III.7. L'effet de la concentration en substrat sur la production de protéase par S3..	31
Figure III.8. Cinétique de la croissance et de la production de protéase par la souche S3 pendant 6h.....	32
Figure III.9. Suivi de la croissance bactérienne et la production de protéase et l'évolution le taux des protéines par la souche S3 pendant 96h.....	33

Introduction

Durant les trois dernières décennies, les microorganismes ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels et en particulier agroalimentaires. Diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites (**Ibukun et Akindumila, 1998 ; Abu et al., 2005**), cependant, les enzymes ont été produites en importante à l'échelle industrielle pour plusieurs décennies (**Falch, 1991**). La production d'enzymes microbiennes à l'échelle industrielle a été initiée par Takamine en 1890, se sont installés aux Etats-Unis et à commencé la production de préparation enzymatique Takadiastase qui était principalement une α -amylase de préparation, mais il contenait une importante montant de la protéase (**Aunstrup, 1980**).

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines. Par la diversité de leurs applications, elles représentent l'un des plus grands groupes d'enzymes industrielles. De plus, les protéases sont ubiquistes ; elles se retrouvent aussi bien chez les plantes que chez les animaux et les microorganismes. Cependant, grâce à leur diversité biochimique extensive, les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases. En effet, quarante pourcent des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes (**García-Gómez et al., 2009**).

Cependant, les protéases microbiennes sont parmi les plus importantes enzymes hydrolytiques et ont été largement étudiés depuis l'avènement de l'enzymologie. Il ya un regain d'intérêt dans l'étude des enzymes protéolytiques, principalement en raison de la reconnaissance du fait que ces enzymes non seulement jouer un rôle important dans les processus métaboliques cellulaires, mais ont également gagné une attention considérable dans la communauté industrielle. Ces enzymes sont largement utilisées dans l'industrie des détergents, depuis leur introduction en 1914 comme additifs à détergents (**Kalisz, 1988**).

Les micro-organismes représentent une source intéressante de protéases, car ils peuvent être cultivés en grande quantité dans un temps relativement court par des méthodes de fermentation établis, et ils produisent un approvisionnement abondant et régulier des produits désirés. En outre, les protéines microbiennes ont une durée de vie longue et peuvent être stockées dans des conditions moins idéales pendant des semaines sans perte significative de l'activité (**Gupta et al., 2002b**). Les micro-organismes capables d'élaborer un large éventail de protéases, qui sont intracellulaires et/ou extracellulaire. 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 et de l'entretien de la piscine protéine cellulaire. Certaines des protéases extracellulaires sont importants pour l'hydrolyse des protéines de l'environnement des cellules et permettent aux cellules bactériennes à absorber et à utiliser des produits hydrolytiques (**Gupta et al., 2002b ; Kalisz, 1988**).

Bien que, variante microorganismes ont été utilisés pour produire de la protéase, le genre *Bacillus* ont d'être si loin le groupe le plus important des enzymes produites commercialement par les bactéries (**Ferrero et al., 1996**).

L'objectif principal souligné dans cette étude est le screening de quelques souches microbiennes productrices de protéase à partir d'un sol à activité protéolytique.

Partie I
Synthèse
bibliographique

I.1. Les microorganismes et le sol

I.1.1. Le sol

Les sols constituent l'élément essentiel des biotopes continentaux. Leur ensemble, dénommé pédosphère, résulte de l'interaction de deux compartiments biosphériques, l'atmosphère et les deux couches superficielles de la lithosphère. C'est l'altération des roches mères, due à des forces chimiques et biologiques, qui donne naissance au régolite (manteau superficiel de débris), lui-même transformé en ce que l'on appelle sol. Les cinq principaux facteurs impliqués dans la formation du sol sont la roche mère, le climat, la topographie, l'activité biologique et le temps (Atlas et Bartha., 1992).

Le sol a de nombreuses fonctions, il est un milieu biologique dans et sur lequel se développent des organismes vivants. Ce développement dépend de la qualité de ce sol ou fertilité (quantité de carbone, d'azote, capacité d'échange ionique, etc.). Il est aussi un acteur déterminant du cycle de l'eau (stockage et régulation) et de la qualité de cette eau (source de pollution, capacité de rétention des polluants mais aussi biodégradation de ceux-ci). Mais le sol joue aussi un rôle prédominant dans tous les cycles biogéochimiques (Quénéa, 2004).

I.1.2. La microflore du sol

La microflore du sol est formée de bactéries (Archaeobactéries et Eubactéries), de champignons (levures et moisissures), d'algues et de protozoaires (Bousseboua, 2005).

I.1.2.1. Bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. En fonction des propriétés du sol, tous les types physiologiques bactériens sont représentés: autotrophes et hétérotrophes, mésophiles, thermophiles et psychrophiles, aérobies et anaérobies. On estime d'ailleurs que tous les groupes de bactéries connus pourraient être isolés d'un échantillon du sol, si les techniques et les milieux adéquats sont utilisés. Ce qui ne signifie pas que le sol soit le milieu naturel de toutes les bactéries. Par sa nature de milieu ouvert et sensible aux facteurs de l'environnement, le sol est le réceptacle d'apport continu de microorganismes exogènes qui disparaissent ou survivent en situation de dormance, en raison des conditions défavorables d'un milieu qui n'est pas le leur. Mais certains d'entre eux peuvent ponctuellement s'implanter. Les bactéries du sol sont à dominante GRAM positif, avec comme groupes principaux : les Corynébactéries, les Actinomycètes, les Mycobactéries et les Nocardiformes. Les genres les plus communément isolés sont : *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Bacillus*, dans les couches aérobies alors que les bactéries du genre *Clostridium* sont dominantes dans les conditions anaérobies. Les variations du potentiel nutritionnel du sol favorisent l'apparition de bactéries autotrophes du cycle de l'azote : *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* et du soufre : *Thiobacillus* (Bousseboua, 2005).

I.1.2.2. Champignons

En général, les champignons du sol forment une biomasse aussi importante que celle des bactéries. Leurs activités métaboliques sont multiples et fondamentales à l'équilibre écologiques des sols, par: leurs interactions avec les systèmes racinaires des plantes, leur aptitude de colonisation et de dégradation des débris organiques de grande taille et des composés de structures complexes. De nombreux travaux indiquent la prédominance de: *Mucor*, *Trichoderma* et *Aspergillus*, alors que *Rhizopus*, *Fusarium*, *Zygorhynchus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium* et *Verticillium* sont couramment isolés (Bousseboua, 2005).

I.1.2.3. Protozoaires

A l'exception des bactéries, ce sont les organismes les plus abondants dans le sol. Extrapolées le plus souvent à partir du nombre d'individus par gramme de sol sec, les estimations sont à prendre avec prudence : elles se situent pour l'ensemble des protozoaires entre 10^7 et 10^9 individus/m². Par gramme de sol sec, on a compté jusqu'à 823000 Zooflagellés, 823000 Amibes nues, 73000 Thécamibes et 133000 Ciliés. Très importants dans les équilibres biologiques au niveau des microorganismes. Ce sont les principaux prédateurs des bactéries. Parmi eux, les amibes nues sont les bactériovores les plus actives. Les protozoaires ont également un important rôle symbiotique, dégradant les tissus celluloseux ou stimulant l'activité bactérienne dans le tube digestif de leur hôte (ex. des ciliés chez les vers de terre et des flagellés chez les termites inférieurs) (Jean *et al.*, 2003).

I.1.2.4. Algues microscopiques

Les algues microscopiques, unicellulaires ou en colonies filamenteuses, sont souvent abondantes dans le sol, mais restent localisées à sa surface ou dans de larges fissures. Trois groupes taxonomiques eucaryotes sont représentés : les algues vertes (Chlorophycées : *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Pleurococcus*), les algues jaunes-vertes (Xanthophycées : *Heterococcus*, *Vaucheria*), ces deux groupes dominant dans les sols acides et les diatomées (Bacillariophycées : *Achnanthes*, *Navicula*, *Pinnularia*), majoritaires dans les sols neutres ou alcalins. Quant aux «algues» bleues, les cyanophycées, elles sont en réalité des bactéries. Grâce à leur activité photosynthétique, les algues colonisent rapidement les surfaces minérales brutes, dont elles accélèrent l'altération par des substances dissolvantes. Elles produisent aussi des polysaccharides extracellulaires qui agrègent les particules solides et en renforcent la cohésion (Jean *et al.*, 2003).

I.1.3. Distribution des microorganismes en fonction du sol

Le tableau I.1 résume la distribution des microorganismes en fonction du sol.

Tableau I.1. Distribution des microorganismes en fonction du sol (Alexander, 1994).

Profondeur (cm)	Organismes/g de sol $\times 10^3$				
	Bactéries aérobies	Bactéries anaérobies	Actinomycètes	Champignons	Algues
3-8	7800	1950	2080	119	25
20-25	1800	379	245	50	5
35-40	472	98	49	14	0,5
65-75	10	1	5	6	0.1
135-145	1	0.4	-	3	-

I.2. Les bactéries

I.2.1. Définition

Une bactérie, ou *bacteria*, domaine qui contient les cellules procaryotes avec des diesters de diacyl-glycerol dans leurs membranes et de l'ARN_r bactérien. Bactérie est aussi le nom général d'organismes procaryotes qui ne sont pas multicellulaires (Lansing *et al.*, 2003). La plupart des bactéries possèdent une paroi cellulaire glucidique, le peptidoglycane. Les bactéries les plus grosses mesurent plus de 2µm et, jusqu'au début du XXI^e siècle, les spécialistes considéraient

que les plus petites mesuraient $0,2\mu\text{m}$, mais il existe des « ultramicrobactéries », y compris en eau douce (Hahn *et al.*, 2003).

Les bactéries présentent de nombreuses formes : sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées (Figure I.1).

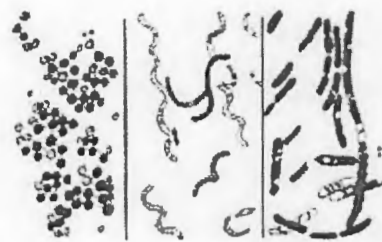


Figure I.1. Quelques formes des bactéries, Coques à gauche, Spirillum au centre, bacille à droite (Hahn *et al.*, 2003).

Les bactéries sont ubiquitaires et sont présentes dans tous les types de biotopes rencontrés sur Terre. Elles peuvent être isolées du sol, des eaux douces, marines ou saumâtres, de l'air, des profondeurs océaniques, des déchets radioactifs (Fredrickson *et al.*, 2004). De la croûte terrestre, sur la peau et dans l'intestin des animaux. Il y a environ 40 millions de cellules bactériennes dans un gramme de sol et 1 million de cellules bactériennes dans un millilitre d'eau douce. On estime qu'il y aurait (à un instant donné) quatre à six quintillions (4×10^{30} à 6×10^{30}), soit entre 4 et 6 mille milliards de milliards de milliards de bactéries dans le monde, représentant une grande partie de la biomasse du monde (Whitman *et al.*, 1998). Cependant, un grand nombre de ces bactéries ne sont pas encore caractérisées car non cultivables en laboratoire. Les bactéries ont une importance considérable dans les cycles biogéochimiques comme le cycle du carbone et la fixation de l'azote de l'atmosphère (Rappé et Giovannoni, 2003).

I.2.2. Les bactéries sporulées

Quelques bactéries, Gram positif, comme *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporohalobacter*, *Anaerobacter* et *Heliobacterium* peuvent fabriquer des endospores leur permettant de résister à certaines conditions de stress environnemental ou chimique (Nicholson *et al.*, 2000). La formation d'un endospore n'est pas un processus de reproduction. Les *Anaerobacter* peuvent faire jusqu'à sept endospores en une seule cellule (Siunov *et al.*, 1999). Les bactéries à endospores ont une zone centrale de cytoplasme contenant l'ADN et ribosomes entouré par une couche du cortex et protégé par un manteau imperméable et rigide. Les bactéries à endospores peuvent survivre dans des conditions physiques et chimiques extrêmes, tels que des niveaux élevés de rayonnement UV, les rayons gamma, les détergents, les désinfectants, une forte chaleur ou pression et à la dessiccation (Nicholson *et al.*, 2002). Ces microorganismes pourraient rester viables durant des millions d'années (Vreeland *et al.*, 2000 ; Cano et Borucki, 1995). Les endospores peuvent même permettre aux bactéries de survivre à l'exposition au vide et au rayonnement dans l'espace (Nicholson *et al.*, 2005).

I.2.3. Les bactéries à activité protéolytique

I.2.3.1. Définition

Les bactéries protéolytiques sont des bactéries qui peuvent utiliser les protéines comme source de carbone et d'énergie. Ils sécrètent des protéases qui hydrolysent les protéines et les polypeptides en acides aminés. Ceux-ci sont ensuite transportés dans la cellule et métabolisés (Lansing *et al.*, 2003).

I.2.3.2. Activité protéolytique

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques. Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique, elles scindent les protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés, offrant une multitude de structures (Frazier, 1967 ; Scriban, 1999).

Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux. L'activation du zymogène en enzyme active nécessite une modification covalente irréversible. La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysate de protéines ou d'un mélange d'acides aminés (Pelmont, 1995 ; Scriban, 1999).

I.2.3.3. Isolement des bactéries protéolytiques

a. Choix d'échantillons naturels

Le choix de l'échantillon naturel est déterminant pour la mise en évidence du microorganisme recherché. Initialement, les souches microbiennes ont souvent été isolées du sol ou d'éléments naturels (Julien, 2002). Généralement, les microorganismes producteurs des hydrolases sont localisés là où ces substances sont abondantes. Par exemple, les microorganismes sécrétant des cellulases sont nombreux dans les sols des forêts (Scriban, 1999 ; Pepler et Perlman, 1979 ; Fuke et Matsuoka, 1993 ; Punt *et al.*, 2002).

b. Sélection des bactéries protéolytiques

La mise en évidence de l'activité protéolytique chez divers microorganismes nécessite un milieu de culture protéiné, où les protéines jouent le rôle d'une source azotée et même d'une source du carbone. Parfois, elles constituent un inducteur de la synthèse de protéases par les microorganismes (Durand et Monson, 1998). Les différentes protéases peuvent présenter une spécificité vis-à-vis de certaines protéines natives ou dénaturées telles que l'albumine, la caséine, la globuline, l'élastine, l'insuline, etc. L'observation d'une zone claire autour de la colonie microbienne prouve la production d'une ou de plusieurs protéases (Colwell et Grigorova, 1989 ; Richard, 2005).

I.2.3.4. *Bacillus subtilis* un exemple d'une bactérie du sol productrice de protéases

a. Classification microbienne

B. subtilis fait partie de l'embranchement des Firmicutes (bactéries à Gram positif et à bas pourcentage en bases GC), de la classe des *Bacilli*, de l'ordre des *Bacillales*, de la famille des *Bacillaceae* et du genre *Bacillus* (défini en 1872 par F. Cohn) (Dalmais-Lenaers, 2007).

Les bactéries qui composent ce genre sont des aérobies stricts ou facultatifs, en bâtonnets, ayant la capacité de former des endospores, *B. subtilis* est une bactérie mésophile (croissance à température modérée comprise entre 25 et 40°C) facilement cultivable en laboratoire à des températures de 30-37°C. Elle est chimio-organotrophe (utilisation de l'énergie chimique des composés organiques) et à la possibilité d'oxyder une grande variété de composés organiques. Non pathogène, elle est naturellement compétente et peut donc capter de l'ADN exogène, ce qui permet la réalisation de nombreuses études génétiques. Ces différentes propriétés ainsi que sa proximité génétique avec des bactéries dangereuses pour l'homme, telles que *Staphylococcus*

aureus, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* ou encore *Listeria* pour l'étude des bactéries Gram + en général (Dalmais-Lenaers, 2007).

b. Caractéristiques de *B. subtilis*

Habitat : c'est une bactérie du sol, facilement isolable de la rhizosphère de nombreuses plantes (Vullo *et al.*, 1991). Cet habitat naturel contient une grande variété de carbohydrates incluant de nombreux polysaccharides issus des plantes, des animaux et des microorganismes. *B. subtilis* est particulièrement active dans les couches supérieures du sol (1-3 cm) où l'oxygène est encore facilement accessible. Une des caractéristiques principales de la vie dans le sol et ayant eu un impact important sur la physiologie de *B. subtilis* est l'oscillation permanente d'une vie se déroulant entre jeûne et abondance (Dalmais-Lenaers, 2007).

Origine : En 1947, Burkholder & Giles isolaient de nombreux mutants auxotrophes (dépendant d'un élément nutritif) dérivés de la souche d'origine de *B. subtilis* dite de « Marburg » identifiée par Cohn (1872). En 1958, Spizizen montrait que l'un de ces mutants auxotrophes pour le tryptophane (la souche '168') était transformable par de l'ADN exogène (Spizizen, 1958). Cette souche fut alors adoptée par la communauté scientifique pour les expériences de génétiques (Dalmais-Lenaers, 2007).

Propriétés particulières : *B. subtilis* est capable d'autolyse car elle produit des enzymes capables de dégrader ses propres peptidoglycanes. Elle a la capacité remarquable de former des spores afin de se protéger de contraintes environnementales défavorables. La faible taille de son génome (4,2 Mb) alliée à des conditions de culture simples et des possibilités de manipulations génétiques en fait un organisme idéal à étudier en laboratoire (Dalmais-Lenaers, 2007).

c. Intérêt industriel

En dehors de son statut d'organisme modèle des bactéries Gram +, *B. subtilis* a un intérêt industriel. Les principaux domaines dans lesquels elle est exploitée sont : les enzymes hydrolytiques, les antibiotiques, les insecticides, la biochimie fine ainsi que plus récemment les biotechnologies avec le développement de souches modifiées pour la production et l'export de protéines hétérologues.

Sa faculté à produire des amylases est utilisée dans l'industrie du pain ; sa capacité de production de protéases et cellulases est exploitée dans l'industrie des détergents. L'industrie pharmaceutique s'intéresse à sa production d'antibiotiques tels que la bacitracine. Une souche de *B. subtilis* dénommée *B. natto* est également utilisée de façon ancestrale pour la fabrication du natto, plat traditionnel japonais à base de soja fermenté (Dalmais-Lenaers, 2007).

I.3. Les enzymes protéolytiques

I.3.1. Définition

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique (Tableau I.2) et sont produites extracellulairement comme intracellulairement (Kumar *et al.*, 2008a). Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux (Pelmont, 1995). Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulateurs plus spécifiques (Kumar *et al.*, 2008b).

Tableau I.2. Spécificité des protéases (Rao *et al.*, 1998).

Enzyme	Liaison peptidique à clivée
Trypsine.	-Lys (ou Arg) ↓-----
Chymotrypsine, subtilisine.	-Trp (ou Tyr, Phe, Leu) ↓-----
<i>Staphylococcus</i> V8 protéase.	-Asp (ou Glu) ↓-----
Papaïne.	-Phe (ou Val, Leu)-Xaa↓-----
Thermolysine.	---↓Leu (ou Phe) -----
Pepsine.	-Phe (ou Tyr, Leu) ↓ Trp (ou Phe, Tyr)

La flèche indique le site d'action des protéases, Xaa, n'importe quel acide aminé.

I.3.2. Sources des protéases

Les protéases sont extraites aussi bien des plantes que des animaux ou des microorganismes (Rao *et al.*, 1998).

I.3.2.1. Protéases végétales

Les enzymes d'origine végétale et spécialement les protéases sont par ordre décroissante en technologie. La papaïne, la bromélaïne, la kératinase et la ficine représentent quelques-unes des protéases bien connues d'origine végétale (Rao *et al.*, 1998).

- **La papaïne** (*Mr* 25 KDa) en provenance du latex de fruit *Carica papaya* qui se développe dans les régions subtropicales de l'ouest et le centre d'Afrique, ainsi en Inde. Elle est largement utilisée dans l'industrie pour la préparation des hydrolysats de protéines très solubles et aromatisés (Scriban, 1993; Pelmont, 1995; Rao *et al.*, 1998).
- **La bromélaïne** est extraite à partir de l'ananas (*Ananas comosus*). Elle est moins thermostable que la papaïne (Rao *et al.*, 1998).
- **Les kératinases** sont produites par certains groupes botaniques des plantes pour dégrader les cheveux et la laine. Cette digestion est importante pour la production d'acides aminés essentiels tels que la lysine et pour la prévention du colmatage des systèmes de traitement des eaux usées (Rao *et al.*, 1998).
- **La ficine** est issue de la figue (*Ficus glabrata*) (Scriban, 1993).

I.3.2.2. Protéases animales

La plupart des protéases d'origine animales sont pancréatiques. En effet, elles ont la propriété de dégrader les protéines alimentaires. Elles sont toutes synthétisées sous forme d'un précurseur qui peut s'activer de façon autocatalytique dans des conditions bien déterminées (Rao *et al.*, 1998).

- **La trypsine** (*Mr* 23,3 KDa) est une protéase à sérine, elle est la principale enzyme digestive intestinale responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires. L'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du goût très amer qu'elle entraîne (Rao *et al.*, 1998).
- **La chymotrypsine** (*Mr* 23,8 KDa), La chymotrypsine pure est très coûteuse et elle est utilisée uniquement pour les applications de diagnostic et d'analyse (Rao *et al.*, 1998).

- **La pepsine** (Mr 34,5 KDa) est une protéase acide présente dans l'estomac de presque tous les vertébrés (Rao *et al.*, 1998), seules les pepsines bovines et porcines présentent un intérêt industriel (Scriban, 1993).
- **La rénine** (Mr 30,7 KDa) *pepsin-like* protéase (chymosine ; EC 3.4.23.4) (Rao *et al.*, 1998), est une protéase à aspartate. C'est un constituant majeur de la présure utilisé en industrie laitière comme agent principal de caillage du lait (Pelmont, 1995). Elle a la propriété de couper la liaison Phe-Met dans la κ -caséine pour générer une *para*- κ -caséine et un glycopeptide C-terminal (Rao *et al.*, 1998).

I.3.2.3. Protéases microbiennes

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (Sandhya *et al.*, 2005). Elles sont produites par une grande variété de bactéries dont, les actinomycètes, de moisissures et de levures (Devi *et al.*, 2008). Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial (Sandhya *et al.*, 2005). Le grand succès des protéases microbiennes dans les systèmes biotechnologiques est attribué à la diversité biochimique très large, à la faisabilité de la culture de masse et la facilité des manipulations génétiques (Ferrero, 2000 ; Wu *et al.*, 2006).

Quelques exemples de microorganismes producteurs de protéases sont présentés dans le Tableau I.3.

Tableau I.3. Exemples des protéases microbiennes.

Sources	Espèces	Références
Moisissures	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus terreus</i> <i>Bauveria felina</i> <i>Aspergillus clavatus</i> ES1	García-Gómez <i>et al.</i> , 2009 Sathya <i>et al.</i> , 2009 Laxman <i>et al.</i> , 2005 Germano <i>et al.</i> , 2003 Wu <i>et al.</i> , 2006 Agrawal <i>et al.</i> , 2005 Hajji <i>et al.</i> , 2007
Levures	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida lipolytica</i>	Chi <i>et al.</i> , 2007 Tobe <i>et al.</i> , 1976
Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Virgibacillus</i> sp. SK33 <i>Synergistes</i> sp.	Ferrero <i>et al.</i> , 1996 George <i>et al.</i> , 1995 Soares <i>et al.</i> , 2005 Patel <i>et al.</i> , 2005 Sinsuwan <i>et al.</i> , 2008 Kumar <i>et al.</i> , 2008a
Actinomycètes	<i>Streptomyces</i> sp. <i>Nocardopsis alkaliphila</i> sp.	Mehta <i>et al.</i> , 2006 Hozzein <i>et al.</i> , 2004

❖ Protéases des bactéries

Il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et résiste bien à l'action des détergents. Par ailleurs, elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa purification (Calk *et al.*, 2000 ; Frazier, 1967). Les bactéries psychrotrophes du lait et en particulier, *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* produisent des métalloprotéases thermorésistantes utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage du fromage. Ces bactéries sont détruites par la pasteurisation mais les protéases extracellulaires qu'elles produisent ne sont que partiellement inactivées (Cousin *et al.*, 1982). Les protéases extracellulaires de *Streptococcus lactis* jouent un rôle très important dans l'affinage des fromages (Desmazeaud, 1978).

❖ Protéases des moisissures

Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondial des enzymes industrielles. Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc. Ce groupe d'enzymes dispose de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement elles sont de plus en plus utilisées en boulangerie, dans l'industrie alimentaire humaine et animale, dans les détergents pour lessives, dans l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique (Frazier, 1967 ; Ul-haq *et al.*, 2003).

❖ Protéases des levures

Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, produit trois types de protéases ; une aspartylprotéase, une sérine protéase et une métalloprotéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (Kresze, 1991 ; Boiron, 1996).

❖ Protéases virales

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.3.3. Classification des protéases

Les protéases sont classées selon la gamme du pH dans laquelle leur activité est optimale, en protéases acides, neutres et alcalines (Kumar *et al.*, 2008b). Elles se différencient également selon leur site d'action en deux groupes ; les exopeptidases et les endopeptidases (Tableau I.4). Les exopeptidases agissent seulement sur les liens peptidiques près des extrémités de la chaîne peptidique. En se basant sur la nature de l'extrémité N ou C terminale, elles sont classées en amino et carboxypeptidases, respectivement. Par contre, les endopeptidases sont caractérisées par leur action spécifique à l'intérieur de la chaîne peptidique (Rao *et al.*, 1998).

Tableau I.4. Classification des protéases (Rao *et al.*, 1998).

Type de protéase	Classes et sous-classes
Exopeptidases	Aminopeptidases <ul style="list-style-type: none"> • Peptidyle peptidases • Dipeptidyle peptidases • Tripeptidyle peptidases Carboxypeptidases <ul style="list-style-type: none"> • Sérine carboxypeptidases • Metallocoarboxypeptidases • Cystéine carboxypeptidases
Endopeptidases	Protéases sérines Protéases cystéines ou protéases thiols Protéases aspartiques ou protéases acides Métalloprotéases

La plupart des enzymes utilisées industriellement sont des endopeptidases. Celles-ci sont divisées en quatre familles en se basant sur le mécanisme catalytique ; les protéases sérines (EC 3.4.21.x), les protéases cystéines (EC 3.4.22.x), les protéases aspartiques (EC 3.4.23.x), et les métalloprotéases (EC 3.4.24.x). Ces dernières forment le groupe de protéases le plus varié (Kumar *et al.*, 2008b).

Les métalloprotéases sont caractérisées par l'exigence en un cation divalent pour leur activité, la stabilité thermique de ces protéases augmente si les ions Ca^{++} sont ajoutés au milieu. Les métalloprotéases neutres montrent une haute spécificité vers les acides aminés hydrophobes. La plupart des métalloprotéases contient le motif His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH) (Rao *et al.*, 1998). Ces protéases sont inactivées en présence d'agent chélateurs forts [ex : EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetate*)] ou phenanthroline (Beynon et Oliver, 2004).

La thermolysine est une métalloprotéase neutre thermostable produite par *Bacillus stearothermophilus*. La collagénase est une autre métalloprotéases très spécifique, elle réagit seulement sur le collagène et la gélatine, elle est produite par *Achromobacter iophagus* et autres microorganismes y compris les moisissures (Rao *et al.*, 1998).

I.3.4. Les protéases et l'industrie

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Les principaux secteurs industriels employant des protéases sont :

I.3.4.1. Industrie alimentaire

Mis à part le cas de la protéase alcaline dans les détergents, les industries alimentaires constituent aujourd'hui encore le principal domaine d'application des technologies enzymatiques, qui à partir d'un nombre limité de types de réactions catalysées donnent lieu à une grande diversité d'application (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Les principales industries alimentaires utilisant les protéases sont :

✓ Fromageries

L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages (Rao *et al.*, 1998). La présure a été l'enzyme utilisée à cette fin depuis longtemps. Cependant, les fluctuations du prix de caillette et leur pénurie épisodique fait qu'elle est de moins en moins utilisée et tend à être remplacée par des protéases microbiennes (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Les protéases utilisées à cette fin sont produites par des microorganismes GRAS tels que *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* et *Endothia parasitica*. Les protéases fongiques acides, alcalines et neutres produites par *Aspergillus oryzae* ont également été utilisées en industrie laitière (Aguilar *et al.*, 2008).

✓ Boulangeries

Les endo et les exoprotéinases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour modifier le gluten de blé par une protéolyse limitée selon les caractéristiques désirées de la pâte ; un tel traitement enzymatique permet de réduire le temps de pétrissage (Aviron-Violet *et al.*, 1982 ; Aguilar *et al.*, 2008). Des protéases bactériennes sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (Rao *et al.*, 1998).

✓ Préparation de produits à base de soja

Les protéases neutres ou alcalines d'origine fongiques sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce de soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Le traitement de ces protéines par la protéase alcaline "alcalase" à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats solubles utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans la formulation des aliments diététiques (Rao *et al.*, 1998). Kojizyme™ est un complexe d'exopeptidases et d'endopeptidases dérivées d'*A. oryzae* utilisé dans la fermentation du sauce de soja (Sumantha *et al.*, 2006).

✓ Synthèse de l'aspartam

Biens que les protéases soient des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse. Sous certaines conditions cinétiquement contrôlées, une préparation de thermolysine provenant de *Bacillus thermoprotolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartam (un édulcorant à basse calorie) à partir de l'acide L-aspartique et de la L-phénylalanine méthyle ester. Il est produit industriellement par Toya Soda (Japon) (Rao *et al.*, 1998; Leisola *et al.*, 2001).

I.3.4.2. Industrie pharmaceutique et médicale

La grande diversité et spécificité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement des agents thérapeutiques efficaces. Par exemple, des protéases d'*A. oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion ; des collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des brûlés, plaies et des ulcères dermiques (Rao *et al.*, 1998) ; la « Brinase » (une protéase acide *plasmin-like*) permet l'hydrolyse de la fibrine et la fibrinogène chez les patients souffrant d'une hémodialyse (Sumantha *et al.*, 2006) ; une élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes (Kudrya et Simenenko, 1994) ; etc.

I.3.4.3. Détergents

A l'heure actuelle, les protéases sont ajoutées comme des ingrédients clé dans la formulation des détergents pour usage domestiques (détergents à lessive, détergents à vaisselles), les produits de nettoyage pour usage industriels et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le marché le plus important au niveau de détergents est de loin celui des détergents à lessive (Kumar *et al.*, 2008a). Une protéase détergente idéal doit avoir une large spécificité de substrat et stable dans l'environnement hostile de la machine à laver (température élevée et pH alcalin) (Rao *et al.*, 1998). Bien que la pepsine soit utilisée depuis 1913 (Hajji *et al.*, 2007), la plupart des protéases ajoutées dans les détergents sont produites par des souches de *Bacillus* (Gupta *et al.*, 2002a).

Clear-lens Pro®, une marque de Novozyme Denmark est utilisée pour enlever les dépôts à base de protéines ainsi que les films protéiniques présentent dans les lentilles cornéennes (Sumantha *et al.*, 2006).

I.3.4.4. Tanneries

Les protéases sont utilisées en tannerie depuis le début du siècle dernier pour leurs capacités à libérer les poils et la laine (Laxman *et al.*, 2005). Les trois traitements de la peau à tanner (le reverdissage, le délainage et le confitage) sont susceptibles de solutions enzymatiques de protéases produites par *B. licheniformis*, *A. oryzae*, *B. amyloliquefasciens*. 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 (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002a).

I.3.4.5. Autres applications

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines (Dalev, 1994; Ichida *et al.*, 2001). La protéase neutre de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir les films photographiques par hydrolyse de la gélatine (Sumantha *et al.*, 2006).

Partie 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 Avril-Mars et Juin de l'année 2012.

II.1. Matériel

a- Appareillages

- Agitateurs (de tubes type VORTEX, magnétiques, basculants).
- Four pasteur (Controls).
- Bain-Marie (Mettler).
- Centrifugeuse (LABOFUGE max. 6000 x g).
- pH-mètre (HANNA).
- Spectrophotomètre UV- visible (SCHIMADZU).
- Autoclave.
- Microscopie.
- Etuve (Mettler).
- Bain marie à agitateur.

b- Réactifs et solutions

- Réactif de Bradford.
- Réactif parasulfanique (NIT1).
- Réactif alpha-naphtylamine (NIT2).
- Réactif KOH (VP1).
- Réactif d'alpha-naphtol (VP2).
- Réactif TDA.
- Eau oxygéné.
- Huile de paraffine.
- Eau distillée.
- Solution de citrate de sodium à 2%.
- Glucose.
- Ethanol.
- Amidon.
- Lugol.
- Fuchsine.
- Violet de gentiane.
- Eau peptoné.
- Eau physiologique stérile.
- Milieu citrate de Simmons.
- Milieu Clark et Lubs.
- Gélatine.
- Solution de L-lysine.
- Solution de L-ornithine.
- Solution de L-arginine.
- Milieu urée-indole.
- Milieu mannitol-mobilité.
- Milieu TSI.
- Solution de TCA 5%.
- Solution de caséine dans le citrate de sodium 0.01M.
- Solution de Tyrosine 0.01%.

- Solution de BSA 0.1%.
- Tampon phosphate de 1M pH 7.

II.2. Méthode d'isolement des bactéries à activité protéolytique

II.2.1. Echantillonnage

Trois prélèvements ont été réalisés à partir de trois sites différents. À partir d'une zone agricole de la région de Bouhaddade que localisé à 03km de sud de Taher-Jijel, le 08 avril 2012.

Ces échantillons sont sélectionnés pour l'isolement de quelques souches à une activité protéolytique, ce sol est fertilisé par les engrais, les déchets des animaux et des végétaux. Environ 100g du sol sont prélevés, tous les prélèvements du sol sont réalisés dans des conditions d'asepsie rigoureuse, et récupérés dans des flacons stériles et fermés. Et les échantillons du sol sont prélevés à partir de la surface. Ils sont transportés directement au laboratoire au cours de 3h, et gardés au frais (4°C), jusqu'à l'utilisation.

II.2.2. Traitement du sol avant isolement

II.2.2.1. Préparation de la suspension du sol

Pour préparer la suspension du sol, 10g de l'échantillon sont dilués dans 90ml de l'eau physiologique, puis une agitation avec le Vortex (Beukes *et al.*, 2001).

II.2.2.2. Chauffage de la suspension du sol

Les spores ne sont pas tuées par une exposition de 10 minutes à des températures de 80°C, lesquelles tuent rapidement la plupart des formes végétatives des bactéries (Lambin *et German.*, 1969). Le chauffage de la suspension à 80°C pendant 10 minutes réduit considérablement le nombre des microorganismes, sauf les germes sporulés.

II.2.2.3. Préparation des dilutions de la suspension du sol

A partir de la solution mère, une série de dilutions décimales est effectuée sur l'échantillon dans l'eau distillée. Et la dilution est à partir de 10^{-1} jusqu'à 10^{-10} . Après la préparation des dilutions, une agitation vigoureuse avec le Vortex permet l'homogénéisation des milieux (Beukes *et al.*, 2001). A chaque tube de dilution, il a été attribué un code désignant son degré de dilution.

II.3. Les milieux de culture

- La gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia.

Un milieu utilisé pour le screening des bactéries protéolytiques, ce milieu (la gélose au lait) présente plusieurs avantages tel que la simplicité de préparation, la variété et la richesse en protéines et le faible coût (Smith *et al.*, 1952).

- Bouillon nutritif.

II.4. L'isolement bactérienne

A partir de chaque dilution, on étale 1ml sur la gélose à 10% du lait écrémé Candia, puis l'incubation à 37°C pendant 18h (Beukes *et al.*, 2001).

II.5. Screening des souches à activité protéolytique

L'utilisation de la gélose au lait permet la mise en évidence de l'activité protéolytique par l'apparence d'une zone claire autour de la colonie productrice (**Anagnostakis et Hankin, 1975 ; Harrigan et McCance, 1976**). Des mesures sur le diamètre de chaque colonie et sa zone d'hydrolyse, sont effectuées. Celles-ci permettent de sélectionner les souches protéolytiques les plus performantes (**Moulay *et al.*, 2006**).

II.5.1. Purification des bactéries protéolytiques

Pour la purification des souches isolées, on utilise la méthode de repiquages successifs sur la gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia.

Cette méthode de repiquage se fait comme suivant :

- ✓ Le premier repiquage se fait sur la gélose nutritive 10% du lait écrémé Candia, à partir des colonies bien distinctes et isolées et présentant une zone d'hydrolyse.
- ✓ Le deuxième repiquage se fait sur la gélose nutritive 10% du lait écrémé Candia à 37°C pendant 24h.
- ✓ On suit le repiquage (de ces 10 types de culture) jusqu'à l'obtention de colonies de même tailles, de même formes, de même couleur et bien distinctes (de chaque type de colonies) ; ce qui renseigne sur la pureté des souches.

II.5.2. Sélection des bactéries les plus protéolytiques

II.5.2.1. Mesure de l'activité protéolytique des souches isolées

L'activité protéolytique des 10 souches isolées 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 280nm), elle devient alors une mesure de l'activité de l'enzyme. La solution protéique est préparée en ajoutant 2,5g de caséine à une solution de citrate de sodium 0.01M (0.294g de citrate de sodium hydraté dans 100ml d'eau distillée).

❖ Préparation de l'extrait enzymatique

10 séries de tubes contenant 5ml de bouillon nutritif, ont étéensemencés à partir de la culture sur boîtes (chaque sérieensemencée par une souche, la pureté de chaque souche confirmée par la coloration de Gram), ensuite les tubes ont été incubés à 37°C pendant 18h. 1ml de chaque tube a été centrifugé à 6000tr/10min. Le surnageant ainsi obtenu représente l'extrait enzymatique (ou surnageant brut).

❖ Réaction enzymatique

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

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

❖ Préparation de la courbe d'étalonnage de la tyrosine

La gamme-étalon est établie à partir d'une solution mère de tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 0,1mg/ml (Voir annexe 3.a).

Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1µg de tyrosine libérée pendant 1h du temps par 1ml d'une solution d'enzyme ou 1U= 1µg/ml/h (Sumantha *et al.*, 2006; Paranthaman *et al.*, 2009).

II.5.2.2. Détermination de la concentration des protéines

Les protéines solubles ont été déterminées par la méthode de dosage des protéines selon la méthode de Bradford (1976). La réaction s'effectue dans 10 séries de tubes qui contiennent 0.1ml de surnageant brut et 4ml du réactif de Bradford (préparation de réactif de Bradford voir annexe 2), les tubes ont été bien vortexés et laissés à température ambiante pendant 30min, après le développement de la couleur, l'absorbance est mesurée à 595nm. Parallèlement aux échantillons, un blanc a été préparé par l'addition de 0.1ml d'eau distillée au réactif de dosage.

Les concentrations en protéines ont été déduites à partir d'une courbe d'étalonnage en utilisant le sérum albumine bovine (BSA) comme protéine de référence.

❖ Préparation de la courbe d'étalonnage des protéines

La gamme-étalon est établie à partir d'une solution mère de BSA dont les concentrations sont comprises entre 0 et 1mg/ml (Voir annexe 3.b).

Au cours de la mesure de l'activité protéolytique des souches isolées, pour la bonne estimation des résultats, chaque dosage et chaque mesure sont effectués en triple.

L'activité spécifique est calculée à l'aide de la formule ci-dessous (Jamson, 2011) :

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

II.6. Identification de genre des souches sélectionnées

II.6.1. Etude morphologique

a. Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation. Avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification, les éléments d'identification macroscopique sont :

- La forme des colonies : rondes, irrégulières.....etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre : ponctiformes ou non ponctiformes.
- La chromogène : couleur de la colonie.

- L'élévation : convexe, concave, plate.
- L'opacité : opaque, translucide, ou transparente.
- La surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée.....etc.

Cette étude est basée sur l'observation de l'aspect des cultures sur le milieu.

b. Etude des caractères morphologiques cellulaires

Les caractères sont étudiés d'après des préparations microscopiques (objectif x40 puis x 100), effectuées entre lame et lamelle à l'état frais et en utilisant la coloration de GRAM (Annexe 1). L'étude microscopique permet de définir la morphologie, la taille, le type de GRAM, la mobilité et l'arrangement.

II.6.2. Identification de l'espèce bactérienne des trois souches isolées les plus protéolytiques

Pour l'identification de l'espèce bactérienne des trois souches isolées, les caractères biochimiques et physiologiques permettent d'orienter l'identification des bactéries isolées, parmi ces caractères :

II.6.2.1 Caractères biochimiques

- **Recherche de la catalase**

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène.

On dépose sur une lame de verre une ou deux gouttes d'eau oxygénée, et on prélève, à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur, un fragment de colonie et dissocie la culture dans l'eau oxygénée. La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation des bulles d'oxygène (Dart, 1996 ; Lansing *et al.*, 2003).

- **Recherche d'une nitrate-réductase**

On cultive la bactérie dans un bouillon nitrate, et incube à 37°C jusqu'à l'obtention d'une culture abondante.

On ajoute une ou deux gouttes d'acide parasulfanilique en milieu acétique (réactif NIT1) puis une à deux gouttes d'alpha-naphtylamine en milieu acétique (réactif NIT2).

- ❖ **Lecture**

- Apparition en quelques secondes d'une coloration rose ou rouge : réaction positive, la bactérie réduit les nitrates en nitrites.
- Absence de coloration : ajouter de la poudre de zinc :
 - Apparition en cinq minutes d'une coloration rose ou rouge : réaction négative.
 - Absence de coloration : réaction positive (bactérie réduisant les nitrites jusqu'au stade azote gazeux) (Harrigan, 1998).

- **Utilisation du citrate**

On ensemence le milieu du citrate de Simmons à partir d'une culture prélevée sur un milieu gélosé. En aucun cas, on ne se servira d'une culture en bouillon ou en eau peptoné qui apporterait

avec les germes des éléments nutritifs susceptibles de fausser les résultats, puis l'incubation à 37°C.

Observation du milieu tous les jours durant cinq jours.

❖ **Lecture**

La majorité des auteurs considère qu'une bactérie est citrate de Simmons positive lorsqu'elle utilise le citrate en provoquant une alcalinisation du milieu.

- Présence d'une coloration bleue (même localisée uniquement en surface) : réaction positive.
- Présence d'une coloration verte dans tout le milieu : réaction négative (Rozar, 2002).

• **Réaction de Voges-Proskauer (VP) et rouge de méthyle**

On ensemence un milieu de Clark et Lubs (peptone, phosphate bipotassique, glucose, pH 7,5), et incubation 48 heures à 37°C.

On prélève 1ml du milieu et ajoute 0,5ml de KOH ou de NaOH (réactif VP 1) et 0,5ml d'alpha-naphtol (réactif VP 2) pour le VP. Et 1ml du milieu et ajoute quelques gouttes de rouge de méthyle.

❖ **Lecture**

On attend un temps maximum de 10minutes. La présence d'acétoïne (bactérie VP positive) se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu.

Pour le rouge de méthyle, l'apparition d'une couleur rouge brillante indique que le test est positif (Dart, 1996).

• **Test LDC (lysine décarboxylase), ODC (ornithine décarboxylase) et ADH (arginine dihydrolase)**

Les milieux utilisés ne contiennent qu'un seul acide aminé (lysine, ornithine ou arginine), on ensemence les trois tubes contiens ces milieux avec une suspension bactérienne, et l'incubation à 37°C pendant 24h.

❖ **Lecture**

- Apparition d'une coloration jaune (acidification du milieu) : réaction négative.
- Apparition d'une coloration orange foncée ou rouge (alcalinisation du milieu) : réaction positive.

• **Hydrolyse de l'urée (uréase)**

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée et conduit à la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone. En solution, le produit final de la réaction est le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu.

On ensemence un milieu synthétique contenant de l'urée, du tryptophane et du rouge de phénol (milieu urée indole), et incubation pendant 18 à 24heures à 37°C.

❖ Lecture

- Uréase positive : Le milieu présente une coloration rouge violacée ou orange foncée.
- Uréase négative : Le milieu a une teinte jaune (Dart, 1996).

• Tryptophane désaminase

Le tryptophane désaminase désamine le tryptophane pour donner de l'acide indole-pyruvique. En présence de perchlorure de fer et en milieu acide, l'acide indole-pyruvique donne un composé de couleur brune foncée (presque noire).

Onensemence un milieu urée-indole, et l'incubation 24 heures à 37°C.

❖ Lecture

On ajoute une goutte d'une solution acide de perchlorure de fer (réactif TDA) :

- Apparition d'une coloration brune foncée : bactérie TDA positive.
- Apparition d'une coloration jaune : bactérie ne produisant pas de tryptophane désaminase.

• Recherche de la gélatinase

La **gélatinase** ou **collagénase** est une enzyme qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides.

Onensemence un tube d'eau peptoné à 1% de gélatine, et l'incubation à 37°C.

❖ Lecture

Lorsque la gélatine est hydrolysée par la gélatinase, elle ne se solidifie pas en baissant la température et reste liquide (Lansing *et al.*, 2003 ; Lambin *et German.*, 1969).

Remarque : l'observation quotidiennement pendant au moins 8 jours.

• La mise en évidence de l'utilisation du mannitol

Le milieu utilisé est le mannitol-mobilité. C'est une gélose semi molle permettant de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. L'obtention des résultats bien clairs nécessite un temps d'incubation de 24h à 37°C (Guiraud, 1998).

Onensemence le milieu mannitol-mobilité par piqure centrale, et l'incubation 37°C pendant 24h.

❖ Lecture

- Colonies au lieu de l'ensemencement, bactérie non mobile.
- Répartition des colonies dans le milieu, bactérie mobile.
- Milieu rouge : mannitol -
- Milieu jaune : mannitol +

- **Utilisation de milieu TSI**

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des bactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène.

A partir d'une colonie suspecte, on ensemence le culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées, il est nécessaire d'utiliser des cultures pures prélevées au centre de colonies bien isolées, si non les réactions croisées rendent l'identification impossible à réaliser. Puis l'incubation à 37°C pendant 24 heures.

- ❖ **Lecture**

La gélose TSI fournit quatre renseignements principaux :

(1) **Fermentation du glucose**

Culot rouge : glucose non fermenté

Culot jaune : glucose fermenté

(2) **Fermentation du lactose et/ou du saccharose**

Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés

Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s)

(3) **Production du gaz**

Apparition de gaz dans le culot.

(4) **Formation d'H₂S**

Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre (Sulkin *et* Willet., 1940 ; Hajna, 1945).

- **Hydrolyse de l'amidon**

On ensemence par une strie centrale à partir d'une suspension bactérienne, la gélose nutritive à 1% d'amidon, puis l'incubation 24 heures à 37°C.

- ❖ **Lecture**

Après l'incubation, on recouvre la gélose par le lugol :

Pas de coloration noire autour des cultures: absence d'amidon → il a été hydrolysé, test positif.

Coloration noire autour des cultures: présence d'amidon → test négatif (Tatsinkou *et al.*, 2005 ; Lansing *et al.*, 2003).

II.6.2.2. Caractères physiologique

- **Etude du type respiratoire**

Le milieu utilisé contient du glucose (métabolisme énergétique), on utilise la gélose profonde telle que la gélose MEVAG (Milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides) sans sucre additionné du glucose, coulées dans des tubes longs et étroits (tube à essai).

- On utilise une culture pure pour ne pas avoir de résultats faussés.
- On utilise deux milieux coulés en tube: la surface du premier est exposée à l'air tandis que l'autre est isolée de l'air avec de la paraffine liquide.
- Régénération de milieu à 100°C pendant 30 minutes.

- On ajoute la solution du glucose à 20% dans les tubes contenant la gélose surfusion (10 gouttes environ) à l'aide d'une pipette pasteur.
- On laisse refroidir le milieu jusqu'à ce qu'il se durcisse (à mettre sous un robinet d'eau froide pour gagner du temps).
- On ensemence les tubes par piqûre centrale avec une pipette pasteur boutonnée.
- On ajoute de la paraffine dans l'un des tubes, sur une hauteur de 1cm environ.
- Incubation à 37°C pendant 24h.

Après incubation, on peut reconnaître quatre types respiratoires :

La hauteur de la culture permet de déterminer le type respiratoire (Guiraud, 1998) :

- Culture sur toute la hauteur : aéro-anaérobie facultatif.
- Culture seulement en haut : aérobie stricte.
- Culture limitée entre 0,5 et 1,5cm du haut : micro-aérophile.
- Culture seulement 1cm au-dessous du haut : anaérobie stricte.

- **Croissance à 6,5% NaCl**

On ensemence un milieu tel que le bouillon nutritif à 6,5% NaCl, puis l'incubation à 37°C pendant 24h. La présence d'une croissance indique que la souche tolère la salinité (6,5% NaCl).

- **Croissance à 55°C**

On ensemence un milieu tel que la gélose nutritive, puis l'incubation à 37°C pendant 24h. La présence d'une croissance indique que la souche est thermophile (croissance à 55°C).

II.7. Conservation des souches

Pour la conservation des 10 souches isolées au cours du travail (ou temps de trois mois), les cultures subissent des repiquages périodiques (Lansing *et al.*, 2003), à chaque deux semaines tous les souches subissent de repiquage, et conservés à température de -4°C.

Pour la conservation des souches d'un temps d'ordre d'année, les souches sont reconstituée dans le bouillon nutritif à 12,5% du lait écrémé Candia et supplémenté avec 30% du glycerol (Shady *et al.*, 2009), puis incubé à 37°C pendant 24h, après l'observation de présence d'une culture, on conserve à température de congélateur.

II.8. Optimisation de la production de protéase par la meilleure souche productrice de protéase

Une procédure d'optimisation séquentielle a été appliquée dans la présente partie de l'étude. La recherche de la température, le pH optimal et l'effet de concentration du substrat sur la production de protéase par la souche ayant la meilleure activité protéolytique. Ainsi l'étude de la cinétique de croissance et la de production de protéase en fonction du temps.

II.8.1. Détermination du pH et de la température optimal de la production de protéase

▪ pH optimal

Pour la détermination du pH optimal de la production de protéase par la meilleure souche productrice de protéase, une série des tubes contient 4,5ml du bouillon nutritif à différents pH (5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9) ont été préparés, et inoculée par 0,5ml (1:9/v:v) à partir de même inoculum. L'ensemble des tubes ont été incubés à 37°C pendant 18h, et ensuite les activités protéasique ont été calculées après dosage de l'activité enzymatique (Chaque dosage est effectué en double).

▪ Température optimale

La détermination de la température optimale se fait par la même méthode pour la détermination du pH optimal, mais les tubes remplacés par le bouillon nutritif à pH 7 et incubés à différentes températures (25, 30, 37, 45°C).

II.8.2. L'effet de la concentration en substrat sur la production de protéase

Pour étudier l'effet de la concentration en substrat sur la production de protéase, on utilise le glucose comme un substrat (source de carbone), 4 tubes à essai contenant 4,5ml du milieu de la production à différent concentration en glucose (0.1, 0.2, 0.3, 0.4%), et inoculés par 0,5ml de même inoculum et incubés pendant 24h à 37°C, et après l'incubation les activités protéasique ont été calculées après dosage de l'activité enzymatique (Chaque dosage est effectué en double).

II.8.3. Cinétique de la croissance et de la production de protéase par la meilleure souche productrice sélectionnée

II.8.3.1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé par le transfert de colonies, à partir d'une culture de 24h sur gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia, dans un tube à essai contenant 10ml du bouillon nutritif, cette culture a été incubée à 37°C pendant 24h. A partir de cette culture, onensemence un tube par un rapport de (1:9/v:v) qui sera ensuite incubé à 37°C pendant 24h. La dernière culture a été utilisée pour inoculation.

II.8.3.2. Le milieu de culture pour la production de protéase

Il n'ya pas du milieu de culture générale pour la production de protéase par diverses souches microbiennes (Reddy *et al.*, 2008 ; Chauhan et Gupta., 2004), le milieu utilisé pour la production de protéase à partir de la meilleure souche productrice de protéase est un bouillon que contient les gradients suivant (g/l) : glucose 1, peptone 10, extrait de levure 0.2, CaCl₂ 0.1, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄ 0.1 et pH 7 (Shah *et al.*, 2009), et autoclave à 120°C pendant 20min.

III.8.3.3. Conduite de la production

900ml du milieu de production inoculé par 100ml de l'inoculum et incubé à 37°C pendant un temps, dans un incubateur à agitation (Shah *et al.*, 2009).

A chaque temps, le taux de croissance, l'activité protéasique est mesurée (Shah *et al.*, 2009). Le taux de croissance dans cette étude est la mesure directe de la DO de la suspension de la culture à 550nm (Alaïde et Humberto., 2011).

Partie III

Résultats et discussions

III.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Le choix des milieux de culture est déterminé dans l'isolement des microorganismes, il l'est aussi dans la mise en évidence de l'activité enzymatique. Pour cela, on a utilisé la gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia (la gélose au lait) comme milieu sélectif.

Les résultats obtenus après l'ensemencement de la gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia donnent des colonies avec ou sans zones d'hydrolyse, dans toutes les boîtes, ce qui indique la présence des souches productrices des protéases extracellulaires. Cependant, les zones d'hydrolyses apparues prouvant la production des protéases sont plus claires avec certaines colonies. À partir de ces colonies, 10 types ont été sélectionnés pour leur pouvoir protéolytique sur la gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia (purifiées par repiquage successif), ou la production des enzymes protéolytiques a été mise en évidence par les zones d'hydrolyse autour des colonies (Figure III.1). Le diamètre de chaque colonie (Y) et de la zone d'hydrolyse (X) ont été notés après 18h d'incubation à 37°C, le rapport (X/Y) a été pris comme indication de l'activité protéasique.

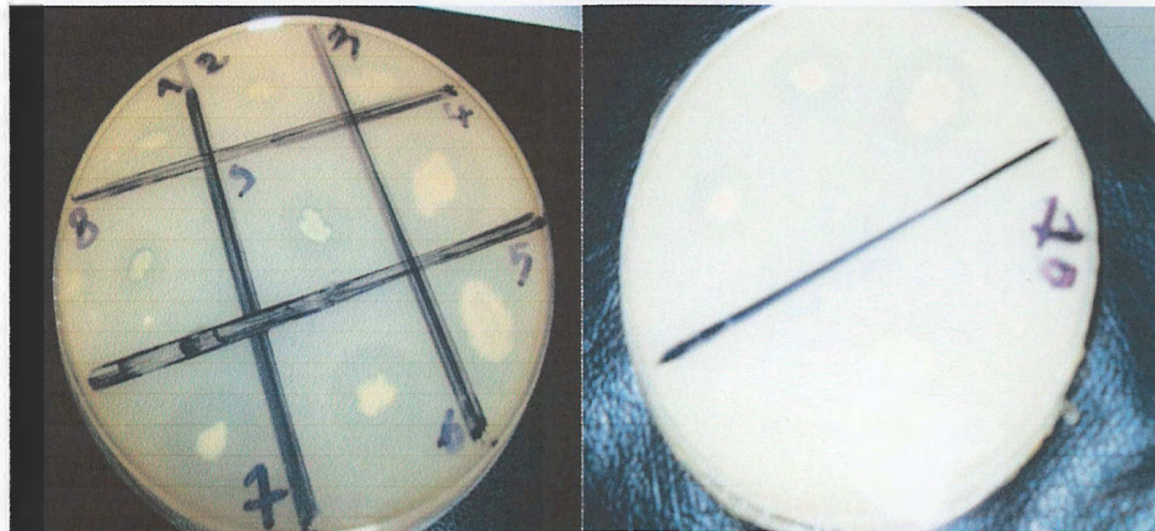


Figure III.1. L'effet de quelques souches isolées sur la gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia.

La figure III.1, représente des colonies entourées par des zones claires qui sont résultant de l'hydrolyse de la caséine du lait par les enzymes protéolytiques extracellulaire des bactéries isolées, le diamètre des zones de lyses variées selon la capacité de la souche pour la production de protéase extracellulaire.

Les résultats du screening primaire pour la production des enzymes protéolytiques sont portés dans le tableau III.1.

Tableau III.1. Mise en évidence de la production de l'activité protéolytique par les 10 souches isolées sur la gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia après 18h de l'incubation à 37°C.

Code de la souche	Diamètre de la zone d'hydrolyse X (mm)	Diamètre des colonies Y (mm)	Rapport X/Y
S1	5	2	2,5
S2	8	3	2,66
S3	16	4	4
S4	18	5	3,6
S5	17	6	2,83
S6	12	3,5	3,42
S7	12	3	4
S8	4	2	2
S9	10	3	3,33
S10	17	6	2,66

Les résultats obtenus sur la gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia ont montré que les souches présentaient des zones d'hydrolyse d'un diamètre allant de 4 à 18 mm, tandis que les plus grandes zones ont été observées chez les deux souches S3 et S7, avec un rapport (X/Y) de 4 pour les deux, et de 3,6 pour la souche S4, où ce sont les souches les plus productrices de protéase extracellulaire.

III.2. Screening des souches les plus protéolytiques

Pour plus de certitude, un second screening basé sur la détermination de l'activité spécifique des surnageant récupéré après 18h de la culture, les activités protéasique ont été déterminées selon la méthode de **Sutar et al., (1986)**, via une courbe d'étalonnage de tyrosine (Figure III.2), ainsi les concentrations en protéines totales ont été déterminées selon la méthode de **Bradford, (1976)**, à partir d'une courbe d'étalonnage des protéines (Figure III.3).

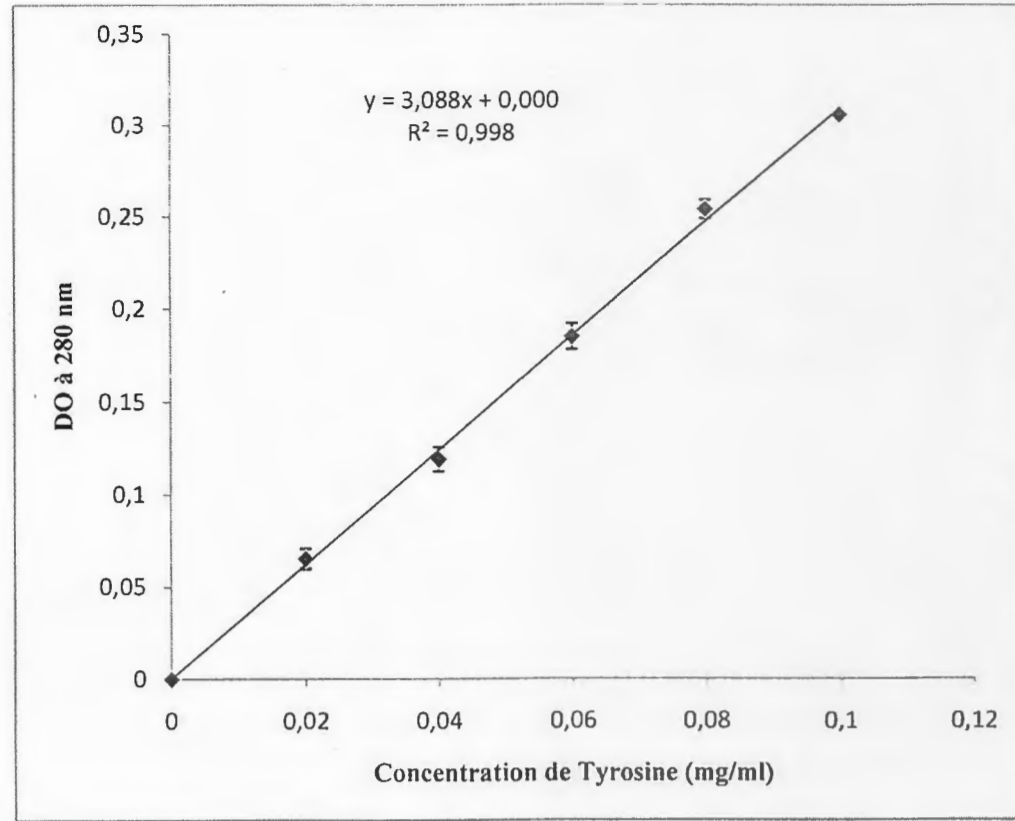


Figure III.2. Courbe d'étalonnage de la tyrosine

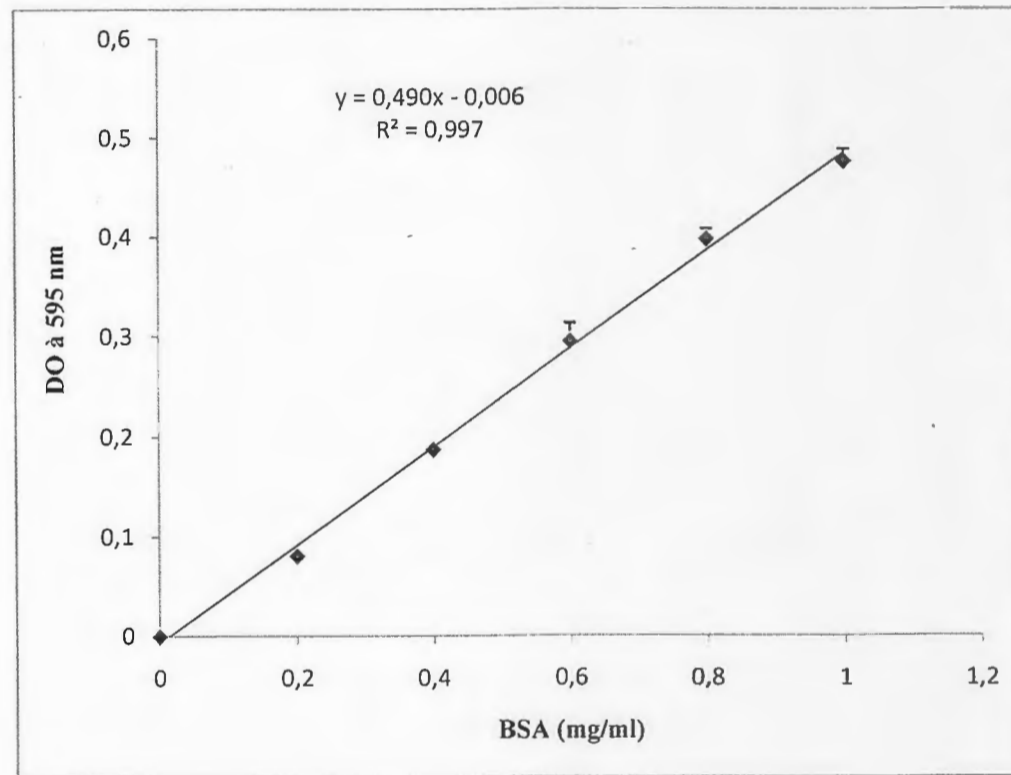


Figure III.3. Courbe d'étalonnage des protéines.

Les résultats de screening secondaire (Tableau III.2), ont montré que les souches testées possédaient des activités spécifique allant de 3,978 à 36,079 U/mg, ce qui confirme les résultats observés sur la gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia, où les souches S3, S4 et S7 sont les meilleures souches à une activité protéolytiques isolées.

Tableau III.2. Screening secondaire des souches les plus protéolytiques.

Code de la souche	Protéines totales (mg/ml)	Activité protéasique (U)	Activité spécifique (U/mg)
S1	0,848	66	77,830
S2	0,661	54	81,694
S3	0,742	134	180,592
S4	0,571	90	157,618
S5	0,579	24	41,450
S6	0,573	18	31,413
S7	0,571	76	133,099
S8	0,873	18	20,618
S9	0,951	26	27,339
S10	1,106	22	19,891

III.3. Identification du genre des bactéries isolées

La forme de colonie et la couleur (Figure III.4), la morphologie cellulaire et le type de GRAM permettent de donnée une idée sur l'identification du genre bactérien. Les bactéries isolées sont des bactéries sporulées car elles sont résistantes à la température à 80°C pendant 10min par leur forme de résistance ou la formation des endospores.



Figure III.4. L'aspect des colonies des souches S6 et S9 sur la gélose nutritive après 18h d'incubation à 37°C.

Le tableau III.3 résume les résultats des caractères macroscopiques et microscopiques étudiées sur les 10 souches isolées.

Tableau III.3. Caractères macroscopiques et microscopiques des 10 souches isolées

Caractères Souches	La forme de la colonie	La couleur de la colonie	La forme et la taille de la cellule	L'arrangement de la cellule	Coloration de GRAM
S1	Circulaire et lisse	Blanc	Bacille, en bâtonnet	En chaînette ou isolé	positif
S2	Irrégulière, granuleuse et mat	Blanc	Bacille en bâtonnet	En chaînette ou isolé	positif
S3	Irrégulière, bombé et muqueuse	Blanc	Bacille en bâtonnet à extrémités arrondies	En chaînette ou isolé	positif
S4	Irrégulière et muqueuse	Blanc	Bacille, longue et fin	En chaînette ou isolé	positif
S5	Circulaire, bombé et lisse	Blanc	Bacille, courte à extrémités carrées	En chaînette ou isolé	positif
S6	Circulaire et lisse	Blanc	Bacille, en bâtonnet et longue à extrémités arrondies	En chaînette ou isolé	positif
S7	Circulaire et lisse	Blanc	Bacille, courte et fin	En chaînette ou isolé	positif
S8	Petite, irrégulière et granuleuse	Blanc	Petite bacille et courte	En chaînette ou isolé	positif
S9	Grande, irrégulière et mat	Blanc	Bacille fin	En chaînette ou isolé	positif
S10	Irrégulière et muqueuse	Blanc	Bacille, fin et longue	En chaînette ou isolé	positif

En plus, le test de catalase et le type respiratoire permettent aussi d'orienter l'identification du genre bactérien. Les résultats de test de catalase obtenus sont positifs pour les 10 souches. Les 10 souches isolées sont des aérobies stricts ou des aérobies anaérobies facultatifs car elles sont cultivées dans les conditions d'aérobiose.

Les 10 souches isolées sont :

Des bactéries sporulées ; aérobies stricts ou aérobies anaérobies facultatifs ; GRAM positif ; forme des bacilles ; catalase positive ; présentant en abondant dans le sol. D'après les références suivantes : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second édition, William et Whitman. 2009 ; Lansing *et al.*, 2003; Colin et Harwood., 1989. Ce sont des caractères spécifiques du genre *Bacillus*, donc les 10 souches isolées sont des *Bacillus* sp..

III.4. L'identification de l'espèce des trois souches les plus hautes activités spécifique

Trois souches S3, S4 et S7, ont été sélectionnées pour l'identification car elles ont les plus hautes activités spécifique ; S3 : 180,592 U/mg, S4 : 157,618 U/mg, S7 : 133,099 U/mg.

Les résultats de l'identification physiologiques et biochimiques des trois souches isolées sont résumés dans les tableaux III.4 et III.5 respectivement.

Tableau III.4. Résultats des caractères physiologiques des trois souches isolées S3, S4 et S7.

Souches	S3	S4	S7
Caractères			
Croissance à 55°C	Non	Oui	Non
Croissance à 6,5% NaCl	Oui	Oui	Oui
Type respiratoire	Aérobie anaérobie facultatif	Aérobie anaérobie facultatif	Aérobie stricte
Mobilité	Mobile	Mobile	Mobile

Tableau III.5. Résultats d'étude des caractères biochimiques des trois souches S3, S4 et S7.

Souche	S3	S4	S7
Caractères			
Amidon	+	+	+
Catalase	+	+	+
VP	+	+	-
RM	-	-	-
Citrate	-	+	+
Nitrate Réductase	+	+	-
ODC	+	+	-
LDC	+	+	-
ADH	+	+	-
Lactose	+	+	+
Glucose et gaze	-	-	-
Saccharose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
TDA	+	+	+
Caséine	+	+	+
Gélatine	+	+	+
H ₂ S	-	-	-
Uréase	-	-	-

(+) pour le caractère positif, (-) pour le caractère négatif.

D'après les références suivantes:

- **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition, William et Whitman. 2009; Lansing, 2003; Colin et Harwood., 1989; Logan et Berkeley., 1984.**

Les trois souches isolées sont identifiées comme :

S3: *Bacillus polymixa*, S4: *Bacillus licheniformis*, S7: *Bacillus megatherium*.

III.5. L'optimisation de la production de la protéase

Le processus de l'optimisation est un sujet d'une importance capitale dans les processus de production industrielle. En ce qui concerne notamment des procédés de production biotechnologiques, dans laquelle même des petites améliorations peuvent être décisives pour le succès. Dans la technologie de fermentation, l'amélioration de la productivité du métabolite microbienne est atteinte, en général, par l'intermédiaire de la manipulation des paramètres nutritionnels et physiques et par l'amélioration de contrainte que le résultat de la sélection de mutation (Greasham, 1983).

III.5.1. Le pH et la température optimaux de la production de la protéase par la souche S3

❖ Le pH optimal

La recherche du pH optimal de la production de la protéase par la souche S3 a été testée par la culture de cellules bactériennes dans un milieu dont le pH allant de 5 à 9. La croissance des cellules et la production de la protéase extracellulaire sont optimales à pH 7 (Figure III.5), ou l'activité protéasique est de 272 U. Les protéases de *Bacillus mojavensis* (Beg, 2003), de *Bacillus* sp. RGR-14 (Chauhan et Gupta., 2004) et de *Bacillus* sp PCSIR EA-3 (Shah et al., 2009), ont été généralement produite dans un milieu à un pH initial d'environ 7. Toutefois, la production de protéase dans un milieu du pH initial supérieur à 7 (pH 8. 9) a été également rapportée (Tari et al., 2006 ; Mabrouk et al., 1999).

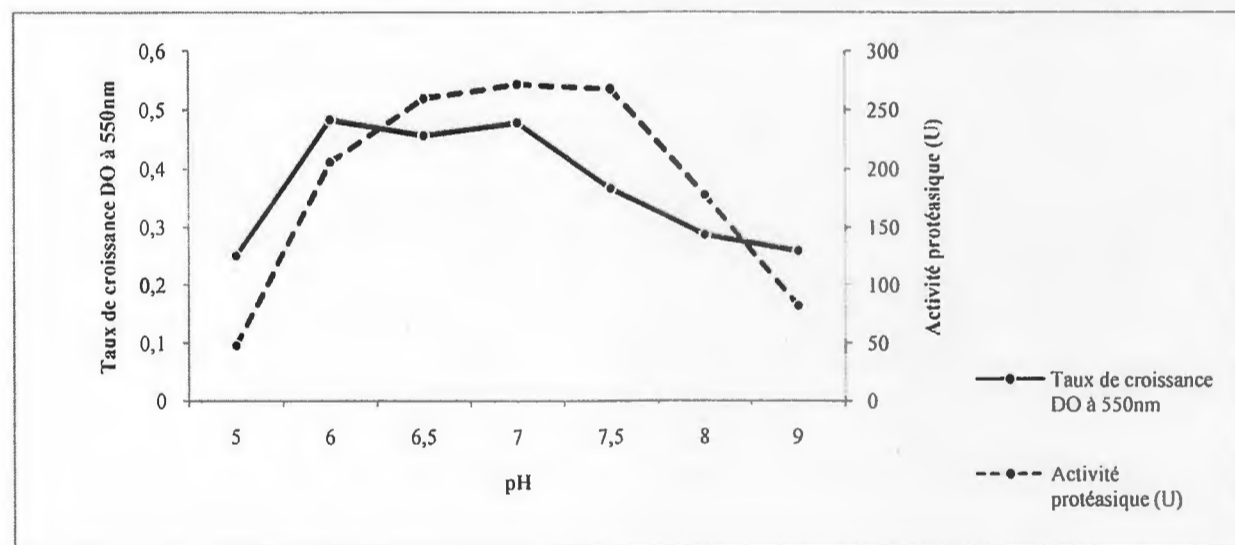


Figure III.5. Le pH optimal de la production de protéase par la souche S3.

❖ La température optimale de la production de protéase par la souche S3

La température est un autre paramètre critique qui doit être contrôlé. La souche isolée a été incubée à différentes températures 25, 30, 37, et à 45°C dans le milieu bouillon nutritif pendant 24 heures afin de déterminer quelle température est adaptée pour la production maximale de la protéase. A 37°C la souche isolée produit l'activité enzymatique maximale (198 U) et la croissance maximale, après 24 heures de la période d'incubation. Une forte baisse de la production de protéase a été observée, lorsque la température d'incubation a été augmentée, passant de 37°C à 45°C (Figure III.6). En revanche, une température optimale de 35°C pour l'optimisation de la production de protéase par *Bacillus* sp. PCSIR (Shah *et al.*, 2009).

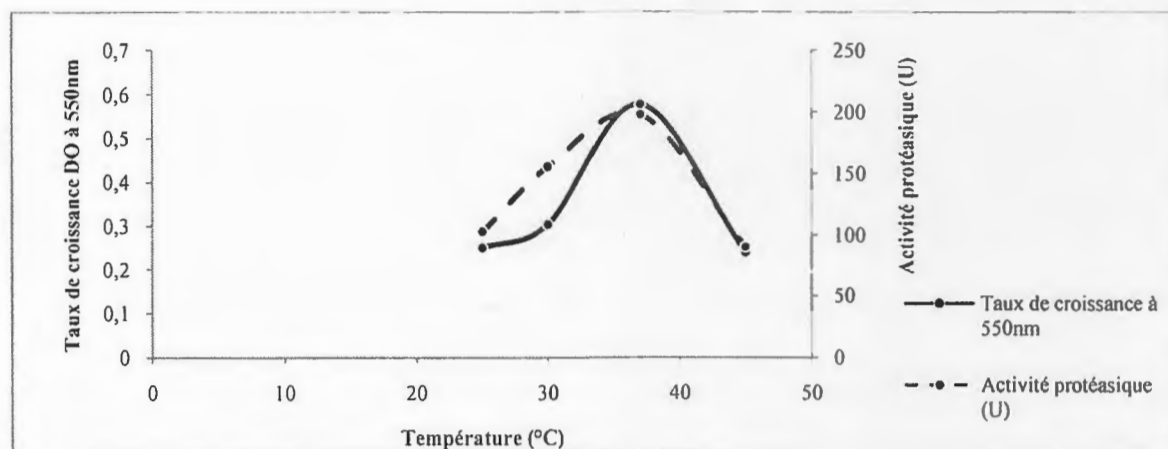


Figure III.6. La température optimale de la croissance et la production de protéase par la souche S3.

La nouvelle souche de *Bacillus* sp. S3 isolée pourrait produire d'environ 272 U de protéase à 37°C et à pH 7,0 pendant 18h d'incubation.

III.5.2. L'effet de la concentration en substrat sur la production de protéase par la souche S3

L'effet de la concentration en substrat sur la production de protéase par la souche S3 a été réalisé, on utilise le glucose comme substrat (source de carbone). La souche S3 présente une activité protéolytique maximale quand la concentration en glucose est de 0,3% dans le milieu, malgré le taux de croissance est maximale quand la concentration en glucose est de 0,4% (Figure III.7), et l'activité protéolytique diminue quand la concentration en glucose est de 0,1%, ou 0,4%. Donc la meilleure concentration en glucose dans le milieu pour la production de protéase par la souche S3 est de 0,3%, cependant, le glucose a été signalé à supprimer la production de la protéase (Sonnleitner, 1983; Sen et Satyanarayana, 1993), dans cette étude la température de 37°C, le pH de 7, la concentration du glucose à 0,3% sont les meilleures conditions pour la production de protéase, le glucose, il a été constaté à être une source de carbone relativement bonne pour la production d'enzymes. Et d'autres chercheurs ont également signalé une meilleure production de la protéase alcaline en présence du glucose comme source de carbone (Sinha et Satyanarayana, 1991; Gajju *et al.*, 1996).

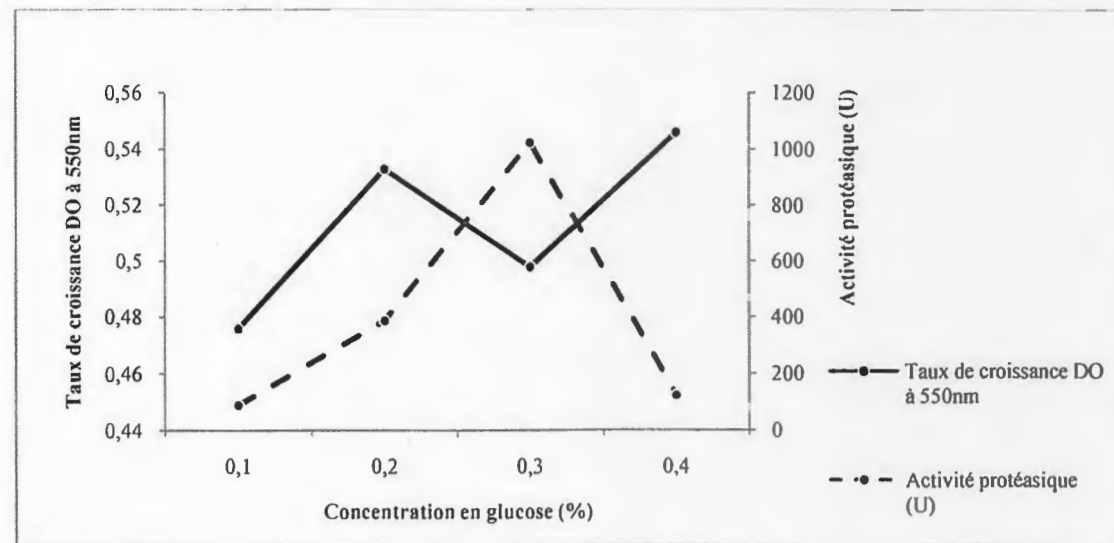


Figure III.7. L'effet de la concentration en substrat sur la production de protéase par la souche S3.

III.5.3. Comparaison entre la cinétique de la croissance et de la production de protéase par la souche S3 au cours de 6h

- **Cinétique de la croissance de la souche S3**

La souche S3, présente une cinétique classique de croissance microbienne avec ces 02 phases (Figure III.8), en effet, la croissance commence par une phase de latence d'environ 1h, permettant une adaptation de la souche au milieu de culture. A la fin de cette dernière, on assiste à un démarrage de la croissance à partir de la 2ème heure, où l'absorbance à 550nm passe de 0,165 à 0,470. L'évolution rapide de la reproduction cellulaire, caractérisée par une phase d'accélération, puis une phase exponentielle, permet d'atteindre un maximum de croissance à 6h ou la DO à 550nm est de 0,679.

- **Cinétique de la production de protéase par la souche S3**

La cinétique de la production de protéase par la souche S3, est décrite dans la figure III.8. La synthèse de l'enzyme commence dès le début de la fermentation, mais en faible quantité (2U). La production de protéase augmente avec la croissance cellulaire. L'activité protéolytique augmente de façon importante durant la phase exponentielle, où elle passe de 6 à 192U, après 6heures de la production. On note globalement une relation entre l'augmentation de l'activité enzymatique et la croissance cellulaire, ce qui laisse suggérer que la protéase est produite aux dépens de taux de croissance cellulaire.

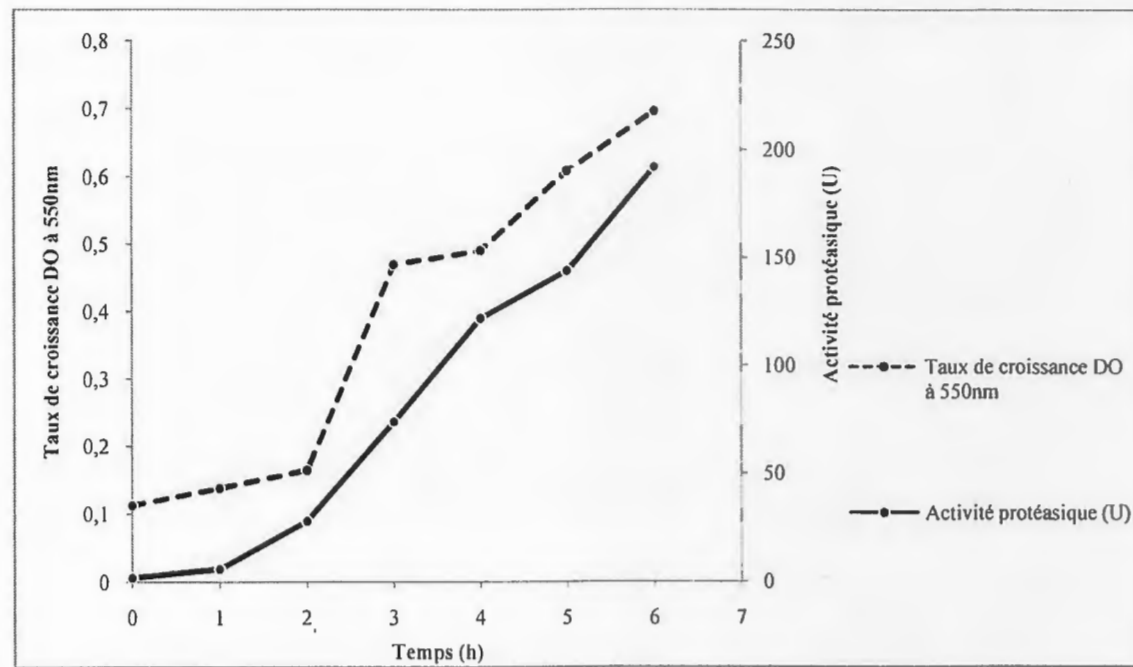


Figure III.8. Cinétique de la croissance et de la production de protéase par la souche S3 pendant 6h.

III.5.4. Suivi de la croissance bactérienne et la production de protéase par la souche S3 pendant 96h

La Production de la protéase extracellulaire a été suivie au cours de la croissance de la souche S3 dans le milieu de la production comme décrit précédemment dans matériels et méthodes. La croissance bactérienne a été suivie en mesurant l'absorbance de la suspension de la culture à 550nm, tandis que l'activité protéasique a été déterminée comme c'est mentionné précédemment. Les données sont illustrées dans le tableau III.6 et la figure III.9, Les données du tableau III.6, et figure III.9, a révélé que l'activité protéasique et la croissance maximale de l'organisme ont été déterminé à 24h.

Bacillus sp., est une bactérie sporulée, donc au cours de la sporulation et la germination, il augmente l'activité protéasique (Cihangir et Ve Aksöz, 1988). Les scientifiques ont renommée que lors de la sporulation et la germination, les protéines hydrolysées ont été utilisés pour composer des protéines pour des endospores ou cellules végétatives (Prestidge *et al.*, 1971). Ce processus implique une augmentation de la production de protéase. L'activité protéasique maximale de la plupart des bactéries sporulées rencontre dans la phase tardive stationnaire (Mehrotra *et al.*, 1999; Dube *et al.*, 2001).

Dans cette étude, l'activité protéasique et la croissance maximale de l'organisme ont été déterminées à 24h, où la souche dans la phase stationnaire tardive. Ces résultats, sur la production de l'enzyme pendant la phase stationnaire, montrent clairement le rôle prépondérant des protéases extracellulaires dans la subsistance écologique de nombreux micro-organismes. Les protéases sont connues pour être associées à l'apparition de la phase stationnaire et sont souvent liées à la phase de la sporulation chez beaucoup de bacilles tels que *B. subtilis* (O'Hara et Hageman., 1990).

Pendant la phase stationnaire et le début de la phase de décroissance (de 24 à 96h), nous assistons à une diminution dans le taux de croissance et l'activité protéasique, cette chute résulte à cause de limitation des éléments nutritifs et l'accumulation des déchets toxiques dans le milieu.

Tableau III.6. Suivi de la croissance bactérienne et la production de protéase par la souche S3 pendant 96h.

Temps (minute)	0	6	24	48	96
Activité protéasique (U)	2	192	616	556	86
Taux de croissance DO à 550nm	0,113	0,697	0,766	0,450	0,359

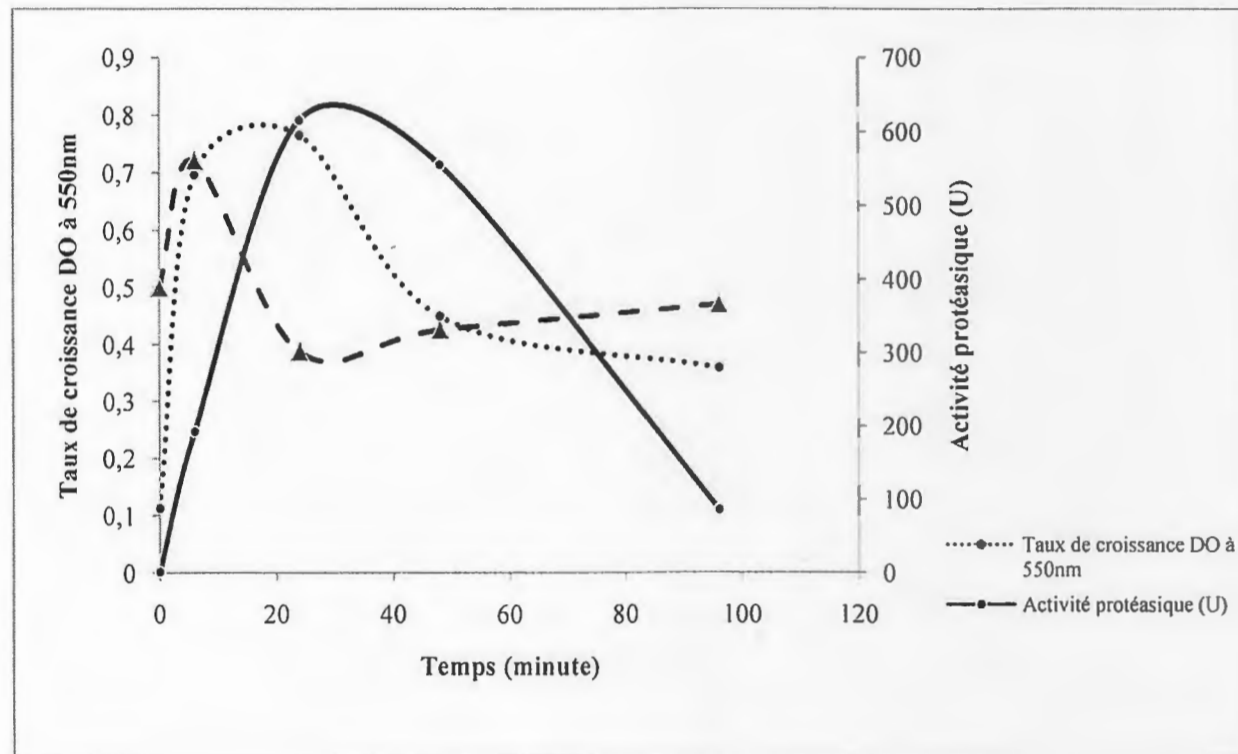


Figure III.9. Suivi de la croissance bactérienne et la production de protéase et l'évolution des protéines par la souche S3 pendant 96h.

III.5.5. Evolution des protéines au cours de la production

Le taux des protéines dans 1L du milieu de la production augmente pendant la phase exponentielle de la production (variation de 389 à 561 mg/l), expliquée par la synthèse d'enzymes et en particulier des hydrolases (Arnaud et Guiraud, 1999). Cette progression est en parfaite synergie avec les cinétiques de croissance et de production de la protéase par la souche S3, précédemment décrites, durant les premières 6 heures de la production (Figures III.8). Pendant la phase exponentielle et jusqu'à la phase stationnaire (de 6 à 24h) (Figure III.9 et tableau III.7), le taux de protéines est quasiment diminué (de 561 à 301mg/l), résulte de l'hydrolyse des protéines du milieu par les protéases produites, puis à partir de 24h jusqu'à 96h, le taux de protéines prend une légère hausse, cette chute probablement due à la libération des protéines endocellulaires lors de la lyse cellulaire (Leveau et Bouix, 1999).

Tableau III.7. Evolution des protéines au cours de la production de protéase par la souche S3.

Temps (h)	0	6	24	48	96
Protéines totales (mg/l)	389	561	301	331	366

Conclusion

Dans le cadre de la recherche des souches protéolytiques locales, trois prélèvements ont été effectués à partir d'un sol à activité protéolytique de «*Bouhadda Teher-Jijel*». Les cultures des prélèvements sur la gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia a révélé la production des protéases chez dix souches. Trois souches ont une activité protéolytique importante (le rapport de diamètre de la zone d'hydrolyse sur le diamètre de colonie est supérieur à 3 mm).

Pour l'identification des souches protéolytiques isolées, une étude sur les caractères : morphologiques, physiologiques et biochimiques sont effectuées. Cette dernière a permis de déterminer que les souches isolées sont des genres de *Bacillus sp.* Et les trois meilleures souches productrices de protéase qui sont identifiées comme: S3 *Bacillus polymixa*, S4 *Bacillus licheniformis* et S7 *Bacillus megatherium*.

La recherche des conditions optimales de la production de protéase par la meilleure souche à une activité protéolytique a été effectuée, la souche produit l'enzyme en maximum 1024 U à pH 7 et à température 37°C avec une concentration de 0,3% du glucose dans le milieu. L'étude de la cinétique de la production de protéase, révèle que la production enzymatique atteint son maximum après 24 heures d'incubation.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives :

- Une identification de l'espèce des sept autres souches isolées (par les techniques de la biologie moléculaire).
- Tester la production de l'enzyme à l'échelle semi-pilote.
- Une optimisation du milieu de la production de protéase, à base de déchets agroalimentaires, afin d'augmenter le rendement en enzyme.
- Une purification plus poussée de l'enzyme pour une éventuelle utilisation de la protéase en industries alimentaires ou pharmaceutique est recommandée (une électrophorèse SDS, chromatographie d'exclusion moléculaire etc...).

**Références
bibliographiques**

- Abu E.A., Ado S.A., James D.B. 2005.** Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. *Afr. J. Biotechnol.*, **4**(8) : 785-790.
- Agrawal D., Patidar P., Banerjee T., Patil S. 2005.** Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Proc. Biochem.*, **40**: 1131-1136.
- Aguilar C.N., Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán P.A., Rodríguez-Herrera R., Martínez-Hernández J.L., Contreras-Esquivel J.C. 2008.** Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American J. Biochem. Biotechnol.*, **4**(4); 354-366.
- Alaíde J-S., Humberto H-S. 2011.** Effect of Different Antibiotics and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on the Growth of *Lactobacillus casei* Shirota. *Curr. Microbiol.*, **62**: 1028-1033.
- Alexander M. 1994.** Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, New York (USA).
- Anagnostakis D. & Hankin A. 1975.** Enzymes tests in bacterial identification. *Biochem. J.*, **312**: 543-583.
- Arnaud A., Guiraud J.P. 1999.** Le métabolisme microbien. *Ds. Scriban .R. Biotechnologie. 5ème édition. Techniques et Documentation – Lavoisier.*, p : 91-96.
- Atlas R.M., Bartha R. 1992.** Microbial ecology. Fundamentals and applications. 3rd edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. San Francisco, California (USA), p: 563.
- Aunstrup K. 1980.** Proteinases, Microbial Enzymes and Bioconversions. Edited by: Rose AH, Academic Press., p: 49-114.
- Aviron-Violet P., Baret J.L., Bertrand C., Blazy B., Bouvier F. 1982.** Les enzymes : Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris., p : 23; 123; 140-153.
- Beg Q.K., Sahai V. and Gupta R. 2003.** Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Proc. Biochem.*, **39**: 203-209.
- Beukes E.M., Bester H.B. & Mostert J.F. 2001.** The microbiology of South African traditional fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.*, **63**: 189-197.
- Beynon R.J., Oliver S. 2004.** Avoidence of proteolysis in extracts. *Methods Mol. Biol.*, **596**: 81-93.
- Boiron P. 1996.** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. p. 19-79.
- Bousseboua H. 2005.** Eléments de microbiologie. Campus-Club, Algérie, (2ème Edition), p: 79-199.
- Bradford M.J. 1976.** A rapid and sensitive methode for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bindings. *Anal. Biochem.*, **72** : 248-254.
- Calk P., Takaç S., Calk G., Ozdamar T.H. 2000.** Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enz. Microbiol. Technol.*, **26**(1): 45-60.

- Cano R., Borucki M. 1995.** Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science*, **268**(5213) : 1060-4.
- Chauhan B., Gupta R. 2004.** Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Proc. Biochem.*, **39**: 2115-2122.
- Chi Z., Ma C., Wang P., Li H.F. 2007.** Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresources Technol.*, **98**: 534-538.
- Cihangir N., Ve Aksöz N. 1988.** *Bacillus* sp. proteazının sentezi ve etkili bazı kültürel parametrelerinin saptanması, *Kükem Dergisi*, **11**: 27-34.
- Colin R., Harwood. 1989.** *Bacillus*. In: isolation and identification of aerobic endospore forming bacteria. Fergus P. Plenum Press. New York., p: 29-48.
- Colwell R.R., Grigorova R. 1989.** *Methods microbiol.* (Ed) St E dimundsbert press limited. Great Britain., p: 133-138.
- Cousin D., Matagne A., Laemmler U. K., Stewart D. J. 1982.** The purification of neutral bacterial proteases *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **34**: 1157-1166.
- Dalev P.G., 1994.** Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresources Technol.*, **48** : 265-267.
- Dalmis-Lenaers. 2007.** Relation entre le métabolisme central carboné et la réplication de l'ADN chez la bactérie *Bacillus subtilis*. Mémoire des Hautes Etudes. Ecole Pratique Des Hautes Etudes. Etats-Unis.
- Dart R.K. 1996.** *Microbiology for analytical chemist.* The Royal Society of chemistry., p: 61-65.
- Desmazeaud M. 1978.** Enzymes des microorganismes intervenant dans l'affinage des fromages. XXème Cong. Intern. Lait. Paris.
- Devi M.K., Banu A.R., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V., Palaniswamy M. 2008.** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.*, **1**(7): 1-6.
- Dube S., Singh L., Alam S.I. 2001.** Proteolytic anaerobic bacteria from lake sediments of Antarctica, *Enzyme Microb. Technol.*, **28**: 114-121.
- Durand G., Monson P. 1998.** *Les enzymes: production et utilisations industrielles.* Bordas. Paris., p: 36-153.
- Falch E.A. 1991.** Industrial enzymes-developments in production and application, *Biotechnol. Adv.*, **9**: 643-658.
- Ferrero M.A. 2000.** Protein hydrolysis: Isolation and characterization of microbial proteases. *Food Microbiol. Protocols.*, **14**: 227-232.

- Ferrero M.A., Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D., Sineriz F. 1996.** Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation, production and characterization, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**: 327-332.
- Frazier W.C. 1967.** Food microbiology. Academic press London., p. 3-429.
- Fredrickson J., Zachara J., Balkwill D. 2004.** Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state. dans *Appl Environ Microbiol.*, **70**(7) : 4230-41.
- Fuke Y., Matsuoka H. 1993.** The purification and characterization of prolylaminopeptidase from *Penicillium camemberti*. *J. Dairy Sci.*, **76**(9): 2476-2484.
- Gajju H., Bhalla T.C., Agarwal H.O. 1996.** Thermostable alkaline protease from thermophilic *Bacillus coagulans* PB-77. *Indian J Microbiol.*, **36**:153-155.
- García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L.A. 2009.** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.*, **112**: 604-608.
- George S., Raju V., Krishnan M.R.V., Subramanian T.V., Jayaraman K. 1995.** Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. *Proc. Biochem.*, **30**: 457-462.
- Germano S., Pandey A., Osaku C.A., Rocha S.N., Soccol C.R. 2003.** Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, **32** : 246-251.
- Greasham R.L., 1983.** Biotechnology. In: Rehm H. J., Read G., Puhler A., Stagler P. (Eds.), *Bioprocessing*. VCH Publishers, New York, USA., p: 128-139.
- Guiraud J.P. 1998.** *Microbiologie Alimentaire*. Dunod (Ed.). Paris. France., p: 652.
- Gupta R., Beg Q.K., Khan S. and Chauhan B. 2002a.** An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**: 381-395.
- Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. 2002b.** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**: 15-32.
- Hahn M.W., H. Lunsdorf., Q. Wu., M. Schauer., M.G. Hofle., J. Boenigk., P. Stadtler. 2003.** Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 1442-1451.
- Hajji M., Kanoun S., Nasri M., Gharsallah N., 2007.** Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Proc. Biochem.*, **42**: 791-797.
- Hajna A.A. 1945.** Triple Sugar Iron Medium for the Identification of the Intestinal groups of Bacteria. *J. Bact.*, **49**: 516-517.
- Harrigan W.F. 1998.** *Laboratory methods in food microbiology*. Third edition. p: 101-113.

- Harrigan W.F., McCance M.E. 1976.** Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London., p : 21-277.
- Hozzein W.N., Li W., Ali I.A., Ola M., Ahmed S., Xu L., Jiang C. 2004.** *Nocardiopsis alkaliphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycetes isolated from desert soil in Egypt. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **54**; 247–252.
- Ibukun E.O., Akindumila F. 1998.** Extracellular amylase production by isolates of Bacilli micro-organism cultured on different starchy food broths. Nig. J. Biochem. Mol. Biol., **13**, p: 91-95.
- Ichida J.M., Krizova L., Lefebvre C.A., Keener H.M., Elwell D.L., Burt Jr E.H. 2001.** Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. J. Microbiol. Methods., **47**; 199–208.
- Jamson J.C. 2011.** Protein purification. In: Introduction to protein purification. **Ersson B., Lars R., Jamson J.C.** Third edition. John Wiley & Sons. Inc., p: 14.
- Jean M.G., Michel A., Willy M. 2003.** Le sol vivant. In :Les briques du système sol. 2^{ème} Edition revue et augmentée ISBN 2-88074-501-2., p:33, 37, 38, 364.
- Julien R. 2002.** Les moisissures parlons-en. Objectif prevention., **25**(4): 7-8.
- Kalisz H.M. 1988.** Microbial proteinases. Adv Biochem Eng Biotechnol., **36** : 1–65.
- Kresze G.B. 1991.** Proteases during purification. Bioprocess-technol., **12** : 85-120.
- Kudrya V.A., Simonenko I.A. 1994.** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **41**; 505–509.
- Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R., Bhalla T.C. 2008a.** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. Res. J. Microbiol., **3**(12); 661–672.
- Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G. 2008b.** Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. Bioresour. Technol., **99**; 2364–2372.
- Lambin S., German A. 1969.** Précis de Microbiologie. 2^e édition. Masson, Paris., p : 306. 180.,181. 306. 149-155.180.
- Lansing M.P., John P., Donald A. 2003.** Microbiologie. 2^e édition. De Boeck Université. Bruxelles., p : 28, 192, 525, 835, 836, 839, 1069.
- Laxman R.S., Sonawane A.P., More S.V., Rao B.S., Rele M.V., Jogdand V.V., Deshpande V.V., Rao M.B. 2005.** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. Proc. Biochem., **40**; 3152–3158.
- Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O. 2001.** Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc. Eng.*, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.
- Leveau J.Y., Bouix M. 1999.** Les moisissures. In:Florent J . (Ed.). Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intéret industriel. Ed. Lavoisier., p: 112-168.

- Logan N.A., Berkeley R.C.W. 1984**, Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. J. Gen. Microbiol., **130**(187):1-1, 882.
- Mabrouk S.S., Hashem A.M., E1-Shayeb N.M.A., Ismail A.M.S., Abdel-Fattah A. F. 1999**. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. Bioresour. Technol., **69**: 155-159.
- Mehrotra S., Pandey P.K., Gaur R., Darmwal N.S. 1999**. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate, Bioresour. Technol., **67**: 201-203.
- Mehta V.J., Thumar J.T., Singh S.P. 2006**. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. Bioresour. Technol., **97**: 1650-1654.
- Moulay M., Aggad H., Benmechernene Z., Guessas B., Henni D.E., Kihal M. 2006**. Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity. World J. Dairy. Food Sci., **1**(1): 12-18, 2006.
- Nicholson W., Munakata N., Horneck G., Melosh H., Setlow P. 2000**. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiol Mol Biol Rev., **64**(3): 548-72.
- Nicholson W., Fajardo-Cavazos P., Rebeil R., Slieman T., Riesenman P., Law J., Xue Y. 2002**. Bacterial endospores and their significance in stress resistance. Antonie Van Leeuwenhoek., **81**(1-4): 27-32.
- Nicholson W., Schuerger A., Setlow P. 2005**. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. Mutat Res., **571**(1-2): 249-64.
- O'Hara M.B., Hageman J.H. 1990**. Energy and calcium ion dependence of proteolysis during sporulation of *Bacillus subtilis* cells. J. Bacteriol., **172**: 4161-4170.
- Paranthaman R., Alagusundaram K., Indhumathi J. 2009**. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. World J. Agric. Sci., **5**(3); 308-312.
- Patel R., Dodia M., Singh S.P. 2005**. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.* : Production and optimization. Proc. Biochem., **40**; 3569-3575.
- Pelmont J. 1995**. Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble. Paris., p : 619-655.
- Peppler H.J., Perlman D. 1979**. Microbial technology. Academic press. San Francisco., p: 42-60.
- Prestidge L., Gage V., Spizizen J. 1971**. Protease activities during the course of sporulation in *Bacillus subtilis*, J. Bact. **107**: 185-213.
- Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J., Van den H.C. 2002**. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. Trends Biotechnol., **20**(5): 200-206.

- Quénéa K. 2004.** Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**; 597-635.
- Rappé M., Giovannoni S. 2003.** The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.*, **57**: 369 - 94.
- Reddy L.V.A., Wee Y.J., Yun J.S. and Ryu H.W. 2008.** Optimization of alkaline protease production by butch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour.Technol.*, **99**: 2242-2249.
- Richard K.F. 2005.** Génomique fonctionnelle in vivo de l'oxydoréductase PA3498 chez *Pseudomonas aeruginosa*. Université Laval, Québec.
- Rozar A. 2002.** Practical methods for environmental microbiology and biotechnology. First edition. Krishna prakashan media (p) Ltd., p: 42-46.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakaes G., Pandey A. 2005.** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*, **40**; 2689-2694.
- Sathya R., Pradeep B.V., Angayarkanni J., Palaniswamy M. 2009.** Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **14** : 765-794.
- Scriban R. 1993.** Biotechnologie. 4e édition. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris., p : 39; 42; 351-356.
- Scriban R. 1999.** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris., p : 149-159.
- Sen S., Satyanarayana T. 1993.** Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40. *Ind. J. Microbiol.*, **33**(1), 43-47.
- Shady E., Michèle D., Yvan C., Mahmoud S., Iskra., Thomas H., Jean-Marc C. 2009.** Screening of strains of lactococci isolated from Egyptian dairy products for their proteolytic activity. *Food Chem.*, **120**: 758-764.
- Shah A. U. Q., Erum S., Samina I., Abida A. 2009.** Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus* sp. PCSIR EA-3. *Ind. J. Biotechnol.*, **8** : 286-290.
- Sinha N., Satyanarayana T. 1991.** Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*. *Ind. J. Microbiol.*, **31** : 425-430.
- Sinsuwan S., Rodtong S., Yongsawatdigul J. 2008.** Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Proc. Biochem.*, **43**; 185-192.

- Siunov A., Nikitin D., Suzina N., Dmitriev V., Kuzmin N., Duda V. 1999.** Phylogenetic status of *Anaerobacter polyendosporus*, an anaerobic, *polysporogenic bacterium*. dans Int J Syst Bacteriol., 49(3): 1119-24.
- Smith N.R., Gordon R.E. & Clark F.E. 1952.** Aerobic spores-forming bacteria. J. Appl. Bact., 27: 78-99.
- Soares V.F., Castilho L.R., Bon E.P.S., Freire D.M.G. 2005.** High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. Appl. Biochem. Biotechnol., p: 121-124.
- Spizizen J. 1958.** Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus Subtilis* by Deoxyribonucleate. Proc Natl Acad Sci U S A., 44: 1072-1078.
- Sonnleitner B. 1983.** Biotechnology of thermophilic bacteria growth, products and application. In: Fiechter, A. (Ed.), Adv. Biochem. Biotechnol. Ed. A. Fiechter. Springer, Berlin., p: 70-138.
- Sulkin E.S., Willet J.C. 1940.** A Triple Sugar Ferrous Sulfate Medium for use in Identification of Enteric Organisms. J. Lab. Clin. Med., 25: 649-653.
- Sumantha A., Larroche C., Pandey A. 2006.** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. Food Technol. Biotechnol., 244: 211-220.
- Sutar I.I., Vatak H.G., Srinivasan M.C., Sivaraman H. 1986.** Production of alkaline protease by immobilized mycellium of *Conidiobolus*. Enz. Microbiol. Technol., 8: 632-634.
- Tari C., Genckal H., Tokatli F. 2006.** Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. Process Biochemistry., 41: 659-665.
- Tatsinkou F.B., Taveai F., Ndjouenkeui R. 2005.** Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. African Journal of Biotechnology., 4(1) :14-18.
- Tobe S., Takami T., Ikeda S., Horikoshi K. 1976.** Production of some enzymatic properties of alkaline protease of *Candida lipolytica*. Agric. Biol. Chem., 40 : 1087-1092.
- Ul-Haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A., Quadeer M.A. 2003** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. Biotechnol., 2(1): 30-36.
- Vreeland R., Rosenzweig W., Powers D. 2000.** Isolation of a 250 million-year-old *halotolerant bacterium* from a primary salt crystal. Nature., 407 (6806): 897-900.
- Vullo D.L., Coto C.E., Sineriz F. 1991.** Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby). Appl. Environ. Microbiol., 57: 2392-2394.
- Whitman W., Coleman D., Wiebe W. 1998.** Prokaryotes: the unseen majority, Proc. Natl. Acad.Sci. U S A., 95(12) : 6578-83.
- William B., Whitman. 2009.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. SECOND EDITION. Volume three. Springer Dordrecht Heidelberg London. p: 42-77.

Wu T.Y., Mohammad A.W., Jahim J.M.d., Anuar N. 2006. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microb. Technol.*, **39**; 1223–1229.

Annexes

Annexe 1

Coloration de Gram

Selon la méthode de **Christian Gram** (1884), (Lansing *et al.*, 2003 ; Lambin *et al.*, 1969).

À partir d'une colonie

- Déposer une goutte d'eau physiologique sur une lame de verre.
- Prélever un fragment de colonie à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée.
- Dissocier soigneusement l'inoculum dans la goutte d'eau et laisser sécher.
- Fixer par flambage
- Recouvrir la lame de violet de gentiane phéniqué et laisser agir 30 secondes.
- Rincer rapidement à l'eau du robinet 2 secondes et éliminer l'excès d'eau.
- Recouvrir la lame de lugol ("Liquide de lugol stabilisé PVP") et laisser agir une minute.
- Rincer à l'eau du robinet et éliminer l'excès d'eau.
- Différencier (décolorer) avec l'alcool 30 secondes ("Différenciateur rapide"), ce temps est le plus délicat de la coloration de Gram.
- Rincer abondamment à l'eau du robinet.
- Recouvrir la lame de fuchsine de Ziehl 1/10 et laisser agir une minute.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Sécher puis observer au microscope (objectif x100 à immersion).

Annexe 2

Les solutions utilisées

Tampon phosphate 1M 100ml

38,50ml KH_2PO_4 (1M) et ajusté le pH à 7 par K_2HPO_4 (1M) et complété à 100ml par l'eau distillé.

Solution de caséine

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

Solution de BSA

0,1g de BSA dans 100ml d'eau distillée

Solution de tyrosine

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

Réactif de Bradford

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

Solution de TCA 5%

5g de l'acide trichloroacétique (TCA) dans 100ml d'eau distillée.

Annexe 3

a- Préparation de la courbe d'étalonnage de la tyrosine ($m \pm s$, $n=3$)

Solution de tyrosine 0,01% (ml)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	0,1
Eau distillé (ml)	0,1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,0
Tampon (P) (ml)	5	5	5	5	5	5
DO à 280nm	0,0	0,065 \pm 0,0540	0,119 \pm 0,0065	0,185 \pm 0,0071	0,254 \pm 0,0050	0,306 \pm 0,0018
Tyrosine (mg/ml)	0,0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1


b-Préparation de la courbe d'étalonnage des protéines ($m \pm s$, $n=3$)

BSA 0.1% (ml)	0,0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
Eau distillé (ml)	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,0
Réactif de Bradford (ml)	4	4	4	4	4	4
DO à 595nm	0,0	0,080 \pm 0,0020	0,187 \pm 0,0005	0,294 \pm 0,0184	0,397 \pm 0,0104	0,475 \pm 0,0125
BSA (mg/ml)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1

Annexe 4

Résultat de test d'hydrolyse de l'amidon par la souche S7



<p>Présenté par Bouhadda Hocine</p>	<p>Encadré par Dr. Laggoune S.</p>	<p>Soutenu Le 02/07/2012 A 8h-9h30.</p>
<p>Le thème : Screening de quelques souches isolées du sol à activité protéolytique.</p>		
<p>Résumé</p> <p>Dix souches différentes sont isolées à partir de l'échantillon prélevé de Bouhaddad Taher-Jijel. L'étude de l'activité protéolytique produite sur la gélose nutritive à 10% du lait écrémé Candia a montré que ces souches ont donné des zones d'hydrolyse ayant des diamètres variantes entre 5 et 18mm. L'étude des caractéristiques microscopiques, physiologiques et biochimiques, révèle que ces souches appartiennent au genre <i>Bacillus</i>, parmi ces dernières, 3 souches ont une meilleure activité protéolytique ont été identifiées: <i>Bacillus polymixa</i> (S3), <i>Bacillus licheniformis</i> (S4), <i>Bacillus megatherium</i> (S7). L'étude des conditions optimales de la production de protéase par la meilleure souche à une activité protéolytique S3 donne une production maximale à pH 7, une température de 37°C et 0,3% du glucose. L'étude de la cinétique de la production de protéase montre une production maximale après 24 heures d'incubation.</p> <p>Mots clés : Screening, Activité protéolytique, Protéase, <i>Bacillus</i> sp..</p>		
<p>Abstract</p> <p>Ten different strains were isolated from a sample taken from Bouhaddad Taher-Jijel. The study of the proteolytic activity carried out on nutrient agar medium at 10% skim milk Candia showed that these strains have hydrolysis zones with diameters varied from 5 and 18mm. The study of microscopic, physiological and biochemical characteristics, indicates that these strains belong to the genus <i>Bacillus</i>, three strains have a better proteolytic activity were identified as: <i>Bacillus polymixa</i> (S3), <i>Bacillus licheniformis</i> (S4), <i>Bacillus megatherium</i> (S7). Study of the optimal conditions for production protease by the best strain gives maximum production at pH 7.00, a temperature of 37 °C and 0.3% of glucose. The study of the kinetics of production of protease shows a maximum production after 24 hours of incubation.</p> <p>Key words: Screening, Proteolytic activity, Protease, <i>Bacillus</i> sp..</p>		
<p style="text-align: right;">ملخص</p> <p>تم عزل عشرة سلالات بكتيرية مختلفة من عينة أخذت من منطقة بوحداد الطاهير-جيجل. أظهرت دراسة النشاط البروتيازي الناتج في وسط الحليب الجيلوزي بنسبة 10% من حليب كنديا الخالي من الدسم، أن هذه السلالات أعطت مناطق تحليل بأقطار تتراوح بين 5 و18 ملم. كما أظهرت دراسة الخصائص المجهرية، الفسيولوجية و البيوكيميائية أن هذه السلالات البكتيرية تنتمي إلى جنس <i>Bacillus</i> sp. ثلاث سلالات منها لديها نشاط بروتيازي أفضل والتي تم تحديدها على النحو التالي:</p> <p style="text-align: center;"><i>Bacillus megatherium</i> (S7), <i>Bacillus licheniformis</i> (S4), <i>Bacillus polymixa</i> (S3).</p> <p>دراسة الظروف المثلى لإنتاج أنزيم البروتياز بواسطة أفضل سلالة ذات نشاط بروتيازي (S3) أعطت الإنتاجية القصوى في درجة الحموضة (7)، درجة حرارة 37 درجة مئوية والجلوكوز بنسبة 0.3% في الوسط، دراسة حركية إنتاج الإنزيم البروتيازي يظهر الحد الأقصى من الإنتاج بعد 24 ساعة من الزرع.</p> <p>الكلمات المفتاحية : الانتقاء، النشاط البروتيازي، بروتياز، <i>Bacillus</i> sp..</p> <div style="text-align: center;">  </div>		