

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE JIJEL
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE



MB.25/08

02
02

MEMEOIRE

de fin d'études pour l'obtention du Diplôme d'études supérieures
(D.E.S.) En Biologie

OPTION
Microbiologie

Thème

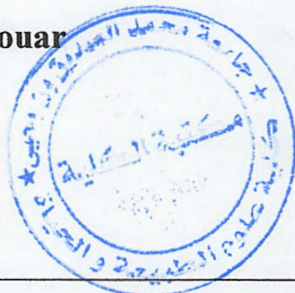
La protéase alcaline : Intérêts biotechnologiques

Encadré par :

Dr. H. Ouled Haddar

Examiné par :

L. Benguedouar



2007/2008

Réalisé par :

Nassiha Stitra

Habiba Serrar

Merbouha Chaabani



Remerciement

Avant tout, nous rendons grâce AU bon Dieu de nous avoir aidé et à lui témoigner toute notre reconnaissance pour nous avoir facilité la tâche à la réalisation de ce projet.

Nous remercions notre encadreur "Dr. Ouled Haddar" d'avoir accepté de nous encadrer durant cette année, ainsi pour leurs aides, leurs conseils instructifs, et surtout leurs patiences.

Nous exprimons notre gratitude à nos enseignants qui nous ont aidés à compléter notre étude

Nous remercions également nos chers amis et collègues soit de cette promotion ou de la précédente.

Merci à toutes nos familles et à tous ceux qui ont partagé avec nous les bons moments durant notre formation.

Nous remercions vivement les membres du jury d'accepter de juger notre modeste travail.

En fin nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin...



❖ SOMMAIRE

Introduction.....	01
I- Chapitre I : L'origine des protéases alcalines	
I-1 : Introduction	02
I-2 : Classification et origine des protéases.....	02
I-2-1 : Exopeptidase :.....	03
I-2-1-1 : Aminopeptidase.....	03
I-2-1-2 : carboxypeptidase.....	03
I-2-2 : Endopeptidase :.....	04
I-2-2-1 : protéase à sérine.....	04
a-trypsine et chymotrypsine.....	04
b-subtilisine.....	04
I-2-2-2 : protéase à cystéine.....	04
I-2-2-3 : métalloprotéase	06
I-2-2-4 : protéase aspartique.....	06
I-3 : Les protéases alcalines	07
I-4 : Les sources des protéases alcalines	08
I-4-1 : Les protéases végétales.....	08
I-4-2 : Les protéases animal	09
I-4-3 : les protéases microbiennes	09
II- Chapitre II : Enzymologie des protéases alcalines	
II-1-Les types des protéases alcalines :.....	11
II-1-1-protéase alcalines à sérine.....	11
II-1-2-métallo-protéase alcaline.....	11
II-1-3- protéase à cystéine	11
II-2-La spécificité du site actif des protéases.....	13
3-Mécanisme d'action des protéases alcalines à sérine	13

III- Chapitre III : Production microbienne de protéases alcalines et Gènes impliqués

III-1- Les milieux de culture.....	15
III-2- Les gènes des protéase alcalines.....	15

IV- Chapitre IV : Application industrielle des protéases alcalines

IV-1-Définition de la biotechnologie	17
IV-2-Application industrielle des protéases	17
IV-2-1-L'alimentation et l'industrie alimentaire.....	17
IV-2-2-L'industrie de cuir.....	18
• La transformation de cuir.....	18
IV-2-3-Détergent.....	19
IV-2-4-Des déchets industriels et ménagers.....	22
IV-2-5-Industrielle photographique.....	22
IV-2-6-Application médicale.....	22

Conclusion.....	23
------------------------	-----------

Bibliographie

Résumé

Listes des tableaux

- **Tableau 1** Classification des protéases.....03
- **Tableau 2** Protéases à thiol de différentes origines.....05
- **Tableau 3** Classifications des protéases selon l'acide aminé du site actif.....07
- **Tableau 4** Origines de quelques protéases végétales..... 08
- **Tableau 5** Source microbiennes des protéases alcalines..... 10
- **Tableau 6** Caractéristiques physico-chimique des protéases de différentes Sources.....12
- **Tableau 7** Les milieux de culture utilisée pour la production des protéases Alcalines.....15
- **Tableau 8** Les gènes de protéases alcalines clonés dans différents Microorganismes..... 16
- **Tableau 9** Les étapes de transformation de cuir..... 18
- **Tableau 10** les protéases commercialisées.....21

Liste des figures :

❖ Figure 1 : Contribution des différents types d'enzymes au niveau mondial de la vente d'enzym.....	08
❖ Figure 2 : Triade catalytique de protéase à serine.....	11
❖ Figure 3 : Le site actif de la protéase.....	13
❖ Figure 4 : Mécanisme catalytique des protéases à serine.....	14
❖ Figure 5 : Préparation de la lessive on poudre.....	20

LISTE DES ABBREVIATIONS :

DIFP : Di-isopropyl fluorophosphate.

EDTA :Ethylenediaminetetera-acetic acid.

PMSF :Phenylmetane sulphonyl floride.

PEG : Polyéthylène glycol.

WT : wild type : type sauvage.

PE : protein engineering.

Introduction

INTRODUCTION :

L'histoire des enzymes protéolytiques est intimement liée à celle de la chimie des protéines. Dans les premiers jours, les enzymes protéolytiques étaient considérées comme un obstacle qui devait être supprimé dans l'isolement des protéines en général.[1]

Aujourd'hui, les protéases sont la seule classe qui occupe une position clé en ce qui concerne à la fois leur application physiologique et commerciale.

Les enzymes protéolytiques catalysent le clivage des liaisons peptidiques, elles sont des enzymes de dégradation qui catalysent l'hydrolyse totale des protéines. La grande diversité des protéases et leur spécificité d'action a attiré l'attention du monde entier dans les tentatives d'exploiter leurs applications technologiques.

La valeur actuelle estimée des ventes mondiale d'enzymes industrielles et de 1 milliard de \$, parmi ces enzymes 75% sont des hydrolases. [2]

Les protéases représentent un des trois plus grands groupes d'enzymes industrielles et comptent pour environ 60% du total au niveau de la vente d'enzyme, et représentent 30% du total de la production d'enzymes. Ces protéases ont des applications dans différentes industries à savoir : l'industrie des détergents, des produits alimentaires, des produits pharmaceutiques, du cuir, des textiles, et de la récupération de l'argent utilisé dans les films photographiques.[3]

Les sources végétales, animales et microbiennes sont utilisées pour la production de protéase. Les microbes sont de la meilleure source de protéases en raison de leur croissance rapide, l'espace limité nécessaire à leur culture, et la facilité avec laquelle elles peuvent être manipulées génétiquement pour générer de nouvelles enzymes avec des propriétés modifiées.[4]

Dans ce mémoire, on va étudier certaines enzymes protéolytiques alcalines, leur propriété physico-chimique ainsi que leurs applications biotechnologiques.

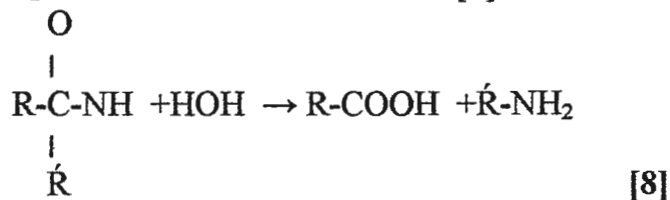
Chapitre I:

L'origine de la protéase alcaline

I-1- Introduction :

Toutes les réactions biochimiques nécessitent l'intervention d'enzymes : macromolécules protéiques qui jouent un rôle fondamental de biocatalyseurs [5], les protéases sont actuellement les catalyseurs les plus efficaces et les plus recherchées dans des domaines extrêmement variés [6].

Les protéases également connues sous le nom de protéinases ou enzymes protéolytiques, sont un grand groupe d'enzyme. Les protéases appartiennent à la classe des enzymes connues sous le nom des hydrolases [7]. Elles hydrolysent la liaison peptidique entre les acides aminés c'est-à-dire une rupture de la liaison peptidique par fixation de H₂O selon la réaction suivante : [8]



Les protéases peuvent être classées selon leur activité et la nature de leurs groupes fonctionnels [9], elles se répartissent en deux grands groupes : les **exopeptidases EC (3.4.17)** et les **endopeptidases EC (3.4.24)** [10] comme elles peuvent aussi être classés selon leur pH d'activité ; et à ce stade, il existe des protéases présentant une activité optimale à pH neutre (pH 6,0 → 8,0) ou / et à pH alcalin (pH 7,0 → 12,5); par contre les protéases acides possèdent une activité optimale à pH acide [9].

Puisque les protéases sont physiologiquement nécessaires pour la matière organique elles sont ubiquitaires étant trouvées dans une large diversité de source telle que les plantes, les animaux et les microorganismes [11].

I- 2- Classification et origine des protéases :

Les microorganismes élaborent un grand rang de protéase, qui est intracellulaires ou extracellulaire. Les protéases intracellulaires sont importantes pour différents processus cellulaires et métabolique, tels que la sporulation, la différenciation ...etc.

Les protéases extracellulaires sont importantes pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement et permettent à la cellule d'absorber et utiliser les produits hydrolytiques. Beaucoup des protéases ont été décrites dans la littérature, elles sont classées dans divers groupes, dépendant des conditions d'activité : acides, neutres, ou alcalines [12]

Les protéases peuvent être également classées à base de trois critères majeurs qui sont :

- 1) Le type de réaction catalytique.
- 2) La nature chimique des sites catalytiques.
- 3) La relation évolutionnaire avec leur structure. Le **tableau (1)** ci dessous présente les protéases classées selon leur capacité à hydrolyser les liaisons peptidiques en exopeptidases et endopeptidases.

➤ **Tableau (1) : Classification des protéases. [11]**

Protéases	Site d'action	EC (Enzyme commity)
Exopeptidases :		
- Aminopeptidases :	NH ₃ -●-○-○-○-○- - -	3.4.11
• Dipeptidases	●-●-○-○-○- - -	3.4.14
• Tripeptidases	●-●-●-○-○- - -	3.4.14
• Carboxypeptidases :	○-○-○-○-○-●-COOH	3.4.16 -3.4.18
• Protéase à serine		3.4.16
• Métalloprotéase		3.4.17
		3.4.17
• Protéase à cysteine		3.4.18
• Peptidyl dipeptidase	- - -○-○-○-○-●-●	3.4.15
	●-●	3.4.13
	- - -●-○-○- - -	3.4.19
		3.4.19
Endopeptidases :	- - -○-○-○-○-○-○- - -	3.4.21 – 3.4.34
- Protéases à serine		3.4.21
- Proteases à cysteine		3.4.22
- Protéases à aspartyl		3.4.23
- Métalloprotéases		3.4.24
- Endopeptidase ayant un mécanisme catalytique inconnu		3.4.99

I-2-1 - Exopeptidases :

Hydrolysent la liaison peptidique de l'extrémité terminale amine ou carboxyle du substrat. [11]

I- 2-1 -1-Aminopeptidases :

Elles peuvent hydrolyser les résidus terminaux amines des peptides successivement, ces enzymes nécessitent habituellement le Mg⁺⁺ ou Mn⁺⁺ pour l'activité [13]

I-2-1-2-Carboxypeptidases :

Elles agissent sur l'extrémité terminale carboxyle de la chaîne polypeptidique et libèrent un acide aminé simple ou un dipeptide, elles peuvent être divisées en trois groupes importants : carboxypeptidases à serine, métallocarboxypeptidases et carboxypeptidase à cystéine basé sur la nature des résidus d'acides aminés au site actif de l'enzyme [12].

I-2-2-Endopeptidases :

Hydrolysent les liaisons peptidiques éloignées des extrémités terminales du substrat, elles sont composées des groupes suivants [11]:

I-2-2-1-Protéases à sérine :

Ces protéases sont très répandus dans la nature, leur poids moléculaire varie entre 18-35 KD à 90KD [14], la plupart d'entre elles sont des endopeptidases et forment une famille d'enzymes apparentées entre elles ainsi qu'avec certaines estérases. Toutes ces protéases ont en commun d'avoir un pôle à serine capable de former une liaison covalente avec le DIFP (di-isopropyl fluoroposphate) [10]. Les protéases à serine ont recours à la triologie aspartate, histidine, Serine, elles se divisent en deux sous groupes: le sous groupe similaire à la Trypsine et le sous groupe similaire à la Subtilisine [8].

a- Trypsine et chymotrypsine :

Sont formées par le pancréas à l'état de trypsinogènes dépourvus d'activité enzymatique [10]. Elles sont retrouvées également chez les mammifères : l'élastase, les protéases de la cascade de coagulation sanguine (thrombine) [11]

b- Subtilisine :

Protéases bactériennes, enzymes extracellulaires produites par *Bacillus subtilis* et les espèces voisines, elles ont une masse moléculaire de 27537 D [9]

I-2-2-2- Protéases à Cystéine :

Nommées aussi thiol protéases ;ce sont des protéases dont le mode de fonctionnement est analogue aux protéases à serine, leur triade catalytique est composée des acides aminés Cystéine, Asparagine, Histidine. [15] Les protéases à cystéine constituent toutes une famille d'enzymes parmi lesquelles : la papaïne qui a été identifiée en premier, l'actinidine, la chymopapaïne, la ficine, la protéase du *streptocoques...*etc. Ces enzymes existent dans différentes espèces végétales, animales et dans les microorganismes, et les mieux connues sont celles issues d'une origine végétale. Le tableau (2) ci-contre indique les différentes protéases à thiol qui sont généralement des protéines monomériques dont le poids moléculaire se situe entre 25000 et 28000 avec quelques exceptions.

Les enzymes d'origine végétale ont une spécificité très large. Il a été suggéré que leur rôle est de protéger le fruit contre l'attaque des insectes ou des champignons. [10]

➤ **Tableau (2) : Protéase à thiol de différentes origines [9]**

Enzyme	Origine	Masse moléculaire
Enzyme de plantes		
Papaïne	<i>Caricapapaya</i>	23 500
Chymopapaïne*	<i>Carica papaya</i>	35 000
Peptidase A	<i>Carica papaya</i>	26-28 000
Actinidine	<i>Actinidia chinensis</i>	24 000
Ficine	<i>Ficus</i>	23 500
Bromélaïne (tige)*	<i>Ananas comosus</i>	24-26 000
Bromélanine(fruit)*	<i>Ananas comosus</i>	33 500
Asclépaïne A	<i>Asclepasis syriaca</i>	31 000
Asclépaïne B	<i>Asclepias syriaca</i>	23 000
Calotropine DI	<i>Calotropis gigantea</i>	21 000
Calotropine FI*	<i>Calotropis gigantea</i>	23 400
Enzymes de mammifères		
Cathepsine B*	Foie de rat	23-26 000
	Foie de humain	24-27 500
Cathepsine B ₂	Poumon de lapin	52 000
Cathepsine H	Foie de rat	28 000
	Foie humain	28 000
Cathepsine L	Foie de rat	23-24 000
	Rate de bœuf	23-25 000
Cathepsine I	poumon de lapin	26 000
Cathepsine N	rate de bœuf	18-20 000
	placenta humain	34 600
Cathepsine T	foie de rat	33-35 000
Cathepsine P	ilôts de rat	31 500
Calpaïne	foie de rat	90 000
Enzymes bactériens		
Protéinase du Streptocoque	<i>Streptococci hemolyticus</i>	32 000
Calostripaïne	<i>Clostridium histolyticum</i>	55 000

* *glycoprotéine*

I-2-2-3-Metalloprotéase : carboxypeptidase A :

Les metalloprotéases à Zn^{++} forment une catégorie d'enzymes très largement répandues, incluant les carboxypeptidases, l'enzyme de conversion de l'angiotensine très importante dans la régulation de la pression sanguine et la thermolysine qui est une endopeptidase qui libère l'acide aminé en position C-terminale d'une chaîne polypeptidique. Il existe d'autres carboxypeptidases de plantes et de microorganismes qui ne sont pas des metalloenzymes.

Deux carboxypeptidases sont secrétées par le pancréas sous forme de zymogène ou procarboxypeptidases. Ce sont les carboxypeptidases A et B. L'enzyme comme le zymogène contient un ion Zn^{++} par molécule. Toutes les formes de carboxypeptidases résultant de l'activation de la procarboxypeptidases contiennent du Zn^{++} . [9]

I-2-2-4-Protéase Aspartique :

Les protéases acides ou aspartyl-protéases : constituent une autre classe de protéases. Elles comprennent les protéases gastriques comme la pepsine de porc est connue depuis longtemps, dès 1930, elle est secrétée sous forme de zymogène. D'autres enzymes de cette famille comme la rénine interviennent dans des processus de contrôle biologique. Les protéases aspartique catalysent l'hydrolyse de la liaison peptidique, elles sont actives entre pH 1 et 7. Les enzymes gastriques sont impliquées dans la dégradation des protéines alimentaires. Diverses approches ont montré que les groupes catalytiques sont deux acides aspartiques ; cependant le mécanisme catalytique a fait l'objet de controverses.

On trouve des protéases acides de certaines moisissures, la penicillinopepsine de *Penicillium janthinellum*, la pepsine de *Rhizopus chinensis* et celle d'*Endothiaparasitica*. [9]

Le tableau (3) ci-dessous présente une classification des protéases selon l'acide aminé qui représente le site actif.

-
-
-
-
-
-
-
-
-
-

Tableau (3) : classification des protéases selon l'acide aminé du site actif. [16]

Classe (site actif)	Localisation	Exemples
Serine /Threonine	soluble	Trypsine, chymotrypsine, subtilisine, elastase, enzymes de coagulation, proteasome.
	membrane	Rhomboïde famille
Aspartique	soluble	Pepsine, cathepsine, rénine, protéase du HIV
	membrane	Presenilins, peptide signal peptidase
Cysteinyll	soluble	Bromelaine, papaïne, cathepsine, keratinases
	membrane	
Metallo	Soluble	Thermolysine, angiotensine, enzyme de conversion.
	membrane	La famille S2P

I-3-Les protéases alcalines :

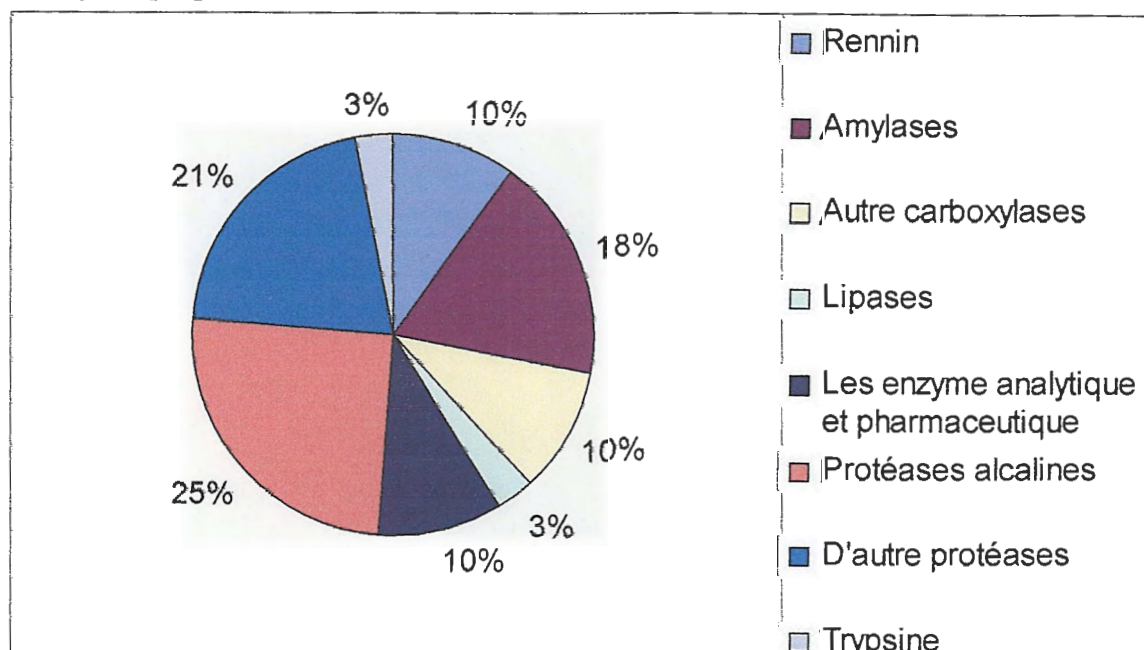
I- 3-1- Définition :

Les protéases alcalines EC (3.4.21.14) catalysent la réaction de l'hydrolyse de la liaison peptidique à pH neutre et / ou alcalin. Les protéases alcalines sont ubiquistes dans l'occurrence et comprennent un groupe important constituant des enzymes avec des fonctions diverses tout en partageant le même mécanisme de catalyse.

Les protéases microbiennes alcalines sont divisées en deux sous-familles : les subtilisines caractéristiques du bacille et les protéases similaires à la trypsine, qui sont distinguées par un arrangement fortement semblable de triade catalytique d'histidine, d'aspartate et de résidus sérine.

Les protéases alcalines microbiennes expliquent une grande fraction des enzymes industrielles disponibles (Figure 1). Elles ont la capacité d'hydrolyser des protéines avec des spécificités variables [17], certaines de ces protéases peuvent également hydrolyser les protéines insolubles comme la kératine et l'élastine, [12] par exemple, les subtilisin-like protéases produites par l'alcalophile *Bacillus lentus* ont totalement remplacés les subtilisines classiques. L'enzyme montrait une activité sur la gamme de pH entre 8,5 – 12,0, l'optimum étant entre 10,0 – 11,0

Figure (1) : Contribution des différents types d'enzymes au niveau mondial de la vente d'enzyme [12]



I-3-2 Les sources des protéases alcalines :

Les protéases alcalines sont retrouvées chez une grande variété d'espèces, il existe des végétaux courants possédant des enzymes faciles à extraire, comme il existe des sources animales et microbiennes produisant aussi ces protéases. [10]

I-3-2-1-Les protéases végétales :

Beaucoup des protéases ont été isolées du latex, des plantes, des fruits et des graines. La présence de l'activité protéolytique a été rapportée dans plusieurs compartiments de la cellule, tels que les vacuoles, les chloroplastes, la paroi cellulaire, le micrososome, les mitochondries, le cytosol et l'appareil de Golgi. Hoorn et Jones 1988 ont suggère que les protéases jouent des rôles principaux dans le contrôle des processus biologiques chez les plantes, tel que l'identification des protéases de microbes pathogènes et l'induction de réponses efficaces de la défense. La papaïne isolée du latex de *Carica papaya* (fruits), la bormelaine, la kératinase et la ficine représentent certaines des protéases bien connues de l'origine végétale. **Tableau (4).** [18]

Tableau (4) : origine de quelques protéases végétales. [18]

Enzymes	Origine
- La papaïne	• Papayer (<i>Carica papaya</i>)
- La bromélaïne ou bromeline	• ananas (<i>Ananas comosus</i> et <i>A. brateatus</i>)

I- 3-2-2 -Les protéases animales :

Les protéases les plus familières d'origine animale sont les trypsines pancréatiques, les chymotrypsines et la pepsine.

Les protéases sont secrétées sous forme de zymogènes inactifs [9] et le site actif de ces enzymes est masqué par une petite région de la chaîne peptidique, qui est enlevée par l'hydrolyse du site spécifique du peptide. Elles sont préparées dans la forme pure en grande quantité par fermentation discontinue (batches). Cependant, leur production dépend de la disponibilité de la matière première animale qui est régie par des politiques et des lois. [12]

I-3-2-3-Les protéases microbiennes :

Les microorganismes représentent une excellente source de protéases en raison de leur diversité biochimique et génétique et de leur représentante susceptibilité à la manipulation, elles représentent un tiers de la production commerciale en protéases dans le monde. Bien qu'il existe de nombreuses sources microbiennes pour la production des protéases, seuls quelques microbes sont reconnus comme producteurs commerciaux. Compte tenu de l'intérêt commercial. Des microbes de divers habitats ont été examinés par de nombreux chercheurs pour l'industrie adaptés à la protéase alcaline. [12]

Les protéases alcalines sont produites par une large gamme de microorganismes comprenant les bactéries, les champignons, les moisissures et les levures ou de certaines insectes. Actuellement, une grande proportion, parmi les protéases alcalines est issue de souche *Bacillus* en raison de leur capacité à sécréter de grandes quantités de protéases alcalines compte tenu de l'activité protéolytique et considérablement à leur stabilité au pH et à la température. [11]

Les différents microorganismes produisant les protéases alcalines sont résumées dans le **tableau (5)**

Tableau (5) : Sources microbiennes à des protéases alcalines.

Microorganismes	Type	Références
<i>Bacillus subtilis</i>	Protéases alcalines	19
<i>Alkalophilic Bacillus LG12</i>	Protéases à serine	20
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Serine peptidase	21
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Protéases alcalines	22
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Protéases alcalines	23
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protéases à subtilisine	14
<i>Bacillus Eicheniformis</i>	Protéases alcalines	11
<i>Bacillus brevis</i>	Metalloprotéases	11
<i>Microsporium canis</i>	Subtilisine	12
<i>Streptomyces YSA-130</i>	Protéases alcalines à serine	24
<i>Nesterenkonia sp AL20</i>	Protéases alcalines	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Protéases alcalines	25
<i>Serratia E-15</i>	Metalloprotéases	11
<i>Streptomyces griseus</i>	Protéases à serine A et B	11
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	Metalloprotéases	11
<i>Thermoactinomyces HS682</i>	Protéases alcalines	24
<i>Vibrioproteolyticus</i>	Protéases alcalines	26
Champignons		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Metalloprotéases	27
<i>Aspergillus oryzae</i>	Protéases alcalines	11
<i>Aspergillus fusarium</i>	Protéases alcalines	11
<i>Beauveria felina</i>	Protéases alcalines	28
<i>Scedosporium apiospermum</i>	Protéases à serine	12
<i>Tritirachium albumlinber</i>	Protéases à serine (protéinase K)	29

Chapitre I:

Enzymologie des protéases alcalines



II-1- Les types de protéases alcalines : Selon le site actif nous avons :

II-1-1- Protéases alcalines à serine :

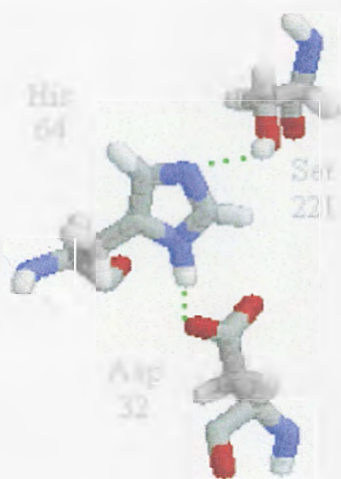
EC (3.4.21.62) sont produites par plusieurs bactéries, elles sont inhibées par DIFP (diisopropyl fluorophosphate). Leur spécificité du substrat est similaire, mais moins rigoureuse que celui de la chymotrypsine.

Elles hydrolysent la liaison peptidique comportant la tyrosine, la phénylalanine, ou la leucine de l'extrémité carboxyle. Le pH optimal de l'activité des protéases alcalines est d'environ 10 et leur pH isoelectrique est de l'ordre de 9,0.

Bien que les protéases alcalines à serine sont produites par plusieurs bactéries telles que *Artrobacter*, *Streptomyces* et *Flavobacterium sp.* Les subtilisines produites par *Bacillus sp.* Sont les plus connues. [12]

Cette famille de protéase possède un site catalytique composé de 3 acides aminés caractéristiques : Histidine, acide Aspartique et Sérine (**Figure 2**)

Figure (2) : Triade catalytique de protéase à serine [29]



II-1-2 - metallo-protéases alcalines :

EC (3.4.24) : ce groupe d'enzymes ont un pH optimal d'activité de 7-9, elles semblent moins sensibles à l'EDTA (Ethylenediaminetetra-acetic acid), que les protéases neutres, un ion divalent, souvent Zn^{++} , est présent au niveau du site catalytique par ailleurs au moins une histidine et un acide glutamique sont impliqués, l'histidine permet la coordination de l'ion métallique qui conduit à l'attaque nucléophile pendant laquelle l'acide glutamique a un rôle de donneur d'électrons.

II-1-3 - protéases à cystéine :

EC (3.4.22) la triade catalytique est composée des acides aminés asparagine (N), Histidine (H) et Cystéine (C). Lors de l'hydrolyse protéolytique, l'intermédiaire enzymatique acyle est formé par liaison entre les groupements carboxyle et soufre. Le groupement amine est protoné par le groupement carboxyle du substrat qui est hydrolysée entraînant la régulation du site actif de la protéase. [15]

Certaines propriétés physicochimiques des protéases alcalines sont représentées dans le tableau (6)

➤ **Tableau (6) :** Caractéristiques physico-chimique des protéases de différentes sources

Enzyme	Source microbienne	Masse moléculaire	pH	T°	Inhibiteur	Référence
Protéases alcalines	<i>Haloalkaliphilic Bacillus sp</i>	22,870KDa	9-11	30-60°C	EDTA, PMSF	23
Protéases alcalines	<i>Bacilluslicheniformus</i>	/	7-10	45-65°C	/	30
Protéases alcalines à sérine	<i>Xanthomonas maltophilia POA-1</i>	36 KDa	9	60°C	EDTA, PMSF	21
Protéases à cystéine	<i>Pyrococcus sp KOD</i>	44 KDa	7	110°C	/	31
Protéases alcalines – Keratinases-	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	36 KDa	9	60°C	PMSF	21
Subtilisin	<i>Bacillus amylolique faciens</i>	35 KDa	10	40°C	PMSF, DFP	12
Protéases à sérine hydrolyse la Keratine	<i>Fervidobacterium</i>	130 KDa	10	8°C	/	11
Protéases alcalines	<i>Pseudomonas aeruginosa PseA</i>	35 KDa	8	60°C	EDTA	12
Protéases alcalines	<i>Alcaligenes faecalis</i>	/	9	55°C	PMSF	12
Protéases alcalines	<i>Haloalkaliphilic Bacillus sp</i>	29 KDa	10-11	35°C	PMSF, Fe ⁺² , Cu ⁺² , Mn ⁺²	12

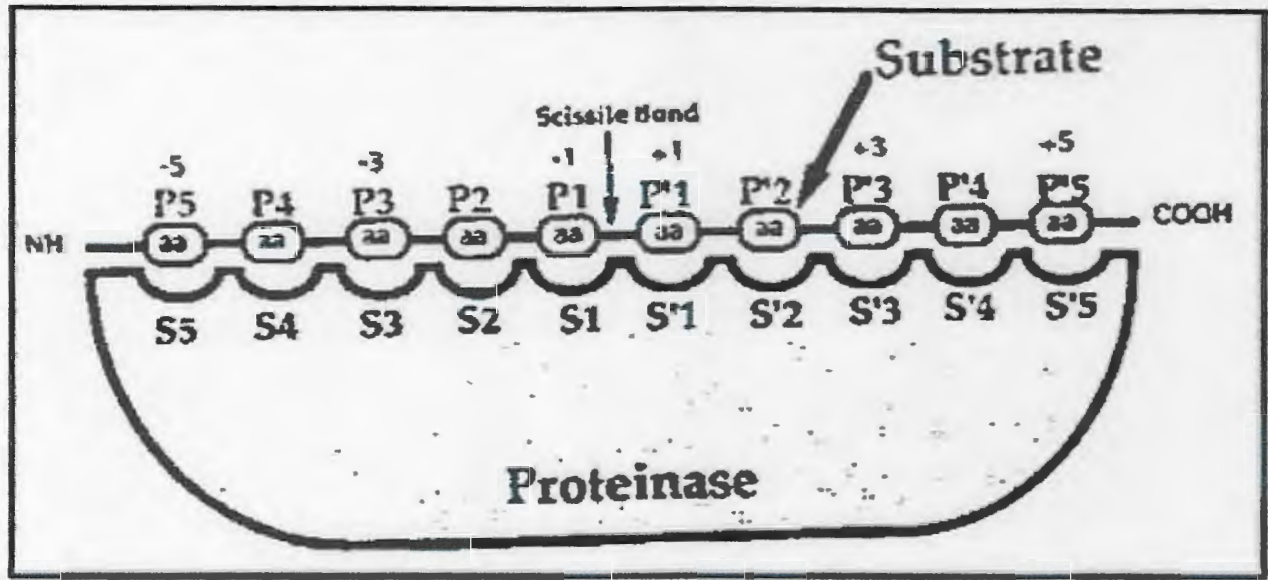
T° : Température

II-2- La spécificité du site actif des protéases alcalines :

Le mécanisme d'action des protéases est un sujet de grand intérêt pour les chercheurs

Le site catalytique des protéases est flanqué de l'un ou des deux côtés par des sous sites de spécificité, chacun est capable de s'accommoder à la chaîne latérale d'un seul résidu d'acide aminé du substrat. Ces sites sont numérotés à partir du site catalytique par S_1 à S_n vers l'extrémité N-terminale de la structure et S'_1 à S'_n vers l'extrémité C-terminale. Les résidus correspondants sur le substrat sont numérotés p_1 à p_n et p'_1 à p'_n respectivement [11]

❖ *Figure (3) : Le site actif de la protéase [12]*



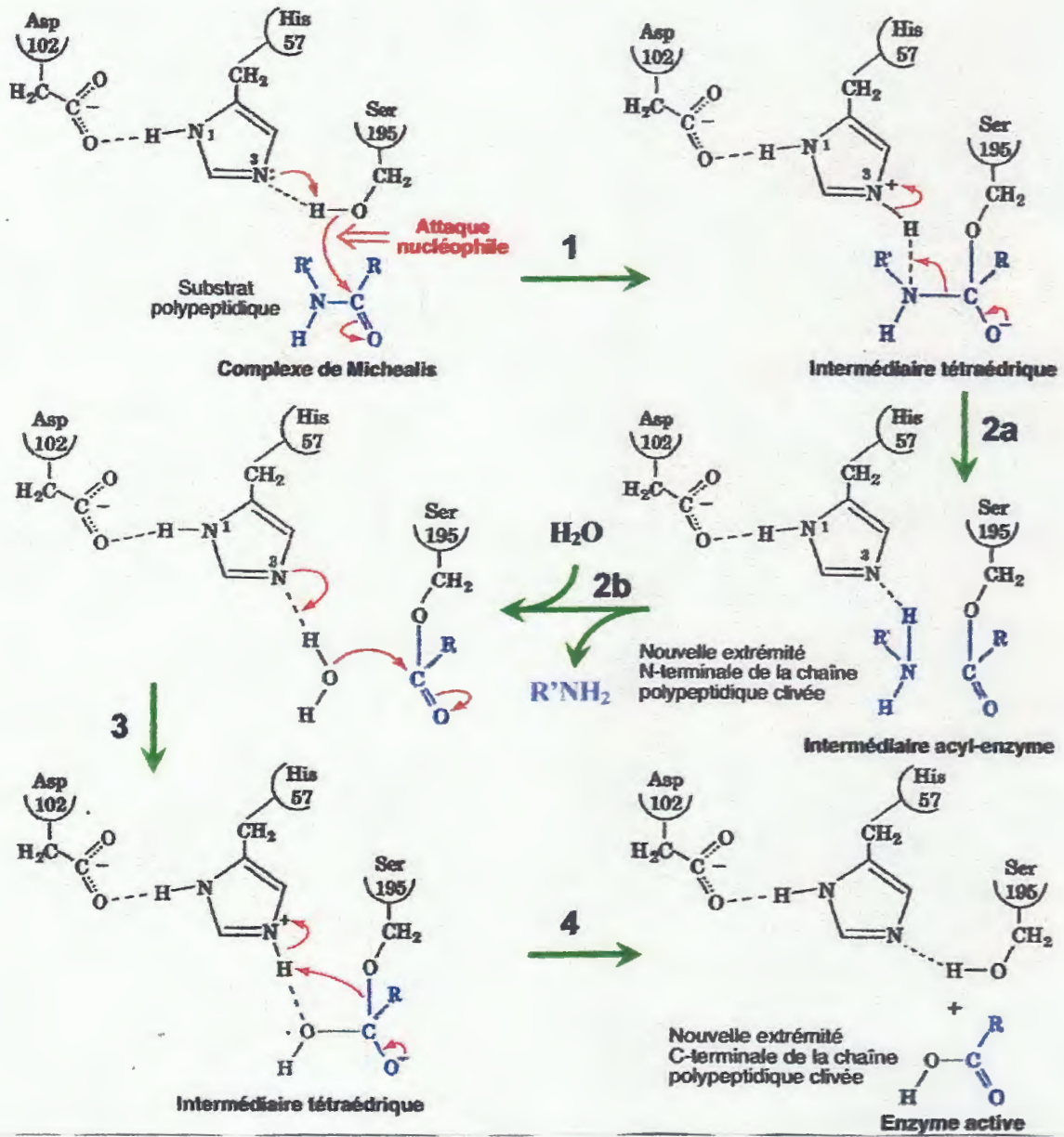
II-3- Mécanisme d'action des protéases à sérine :

Les protéases à sérine sont parmi les premières à être étudiées en profondeur. La majorité des études récentes sur les protéases à sérine se sont basées sur l'élucidation du mécanisme chimique et cinétique de la catalyse. [12]

Les protéases à sérine suivent généralement une réaction à deux étapes pour l'hydrolyse dans laquelle un intermédiaire se forme par liaison covalente entre l'enzyme et le peptide, cette étape est suivie par un processus de désacylation dans lequel l'intermédiaire : " enzyme acyl" est hydrolysé par une molécule d'eau pour libérer le peptide et rétablir le ser-hydroxyle de l'enzyme. [11]

Ce mécanisme est capable d'accélérer les taux d'hydrolyse des liaisons peptidiques par un facteur de plus de 10 par rapport à une réaction non catalysée. [12]

Figure (4) : mécanisme catalytique des protéases à sérine. [15]



Chapitre III:

Production microbienne des protéases alcalines gènes impliqués

III-1-Les milieux de culture :

Différents milieux de culture qui ont été utilisés pour cultiver les souches productrices de protéase alcaline. Quelques sources de carbone et d'azote utilisées dans la production des protéases alcalines par les micro-organismes sont illustrées dans le tableau (7)

➤ **Tableau (7) :** Les milieux de culture utilisés pour la production des protéases alcalines.

Bactérie	Source de carbone	Source d'azote	L'enzyme	Référence
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Kératine	Kératine	Protéase à serine	21
<i>Nesterenkonia sp-AL20</i>	La farine de plumes	La farine de plumes	Protéase alcaline	17
<i>Haloalkalophilic Bacillus sp</i>	glucose	L'extrait de levure	Protéase alcaline	23
<i>Bacillus subtilis</i>	La farine de plumes	La farine de plumes	Protéase alcaline	33
<i>Thermophilic Bacillus species (p-001A)</i>	glucose	L'extrait de levure	Protéase alcaline	35
<i>Bacillus subtilis</i>	/	L'extrait de levure	Protéase alcaline	19
<i>Alcaligenes faecalis</i>	La farine de Soja	La farine de soja	Protéase alcaline	22
<i>Bacillus pumilus</i>	/	L'extrait de levure	Protéase à serine	36

III-2- Les gènes des protéases alcalines

L'objectif du clonage des gènes des protéases bactériennes a été principalement la sur production d'enzyme pour diverses applications commerciales dans les secteurs alimentaires, des détergents et des produits pharmaceutiques. La virulence de plusieurs bactéries est liée à la sécrétion de plusieurs protéases extracellulaires. Le clonage des gènes de ces microbes a été étudié pour comprendre la base de leur pathogénécité et de développer des traitements correspondants. Les protéases jouent un rôle important dans la physiologie cellulaire. [11]Le tableau (8) représente les gènes de protéases alcalines clonés dans différents microorganismes.

➤ **Tableau (8) :** les gènes de₅ protéases alcalines clonés dans différents microorganismes.

Gène	Enzyme	Source	Hôte	Vecteur	Référence :
<i>aprS</i>	Protéase alcaline	<i>Bacillus sp- G-825-6</i>	<i>E-coli HB 101</i>	pUC118, pUC 119	14
<i>aprX</i>	Protéase à serine	<i>Bacillus subtilis 168</i>	/	/	32
<i>aprA</i>	Protéase alcaline	<i>Bacillus subtilis PB100</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	/	33
<i>aprR</i>	Protéase alcaline	<i>Bacillus subtilis PB100</i>	<i>Bacillus subtilis 100 (souche Ps1)</i>	pS	19
<i>yaB</i>	Subtilisin	<i>Bacillus</i>	<i>E.coli : MCI061, JM109</i>	pUC18 pHY300 pLK	14
<i>sprB</i>	Protéase alcaline	<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Streptomyces lividans</i>	/	34
<i>subC</i>	Protéase alcaline à serine	<i>Bacillus licheniformis DSM1969</i>	<i>E-coli et Bacillus alveinanl B385 et B.cereus NRRLB569</i>	pRS316 et pHV1431	30
Gène structurel de 90K	Protéase alcaline	<i>Bacillus subtilis No, 16</i>	<i>E.coli DH5a</i>	pUC118 pUC119	14
SubtilisinE	Protéase alcaline	<i>Bacillus subtilis I-168</i>	<i>E.coli et souche Bacillus subtilis</i>	pBS42	14
Subtilisin J	Protéase alcaline	<i>Bacillus steao thermophilus NCIB1027s</i>	<i>E.coli MCI061, JM109 ET Bacillus subtilis DB104</i>	pZ124, pUC18	14

Chapitre IV:

Applications industrielles des protéases alcalines

IV-1- Définition de la biotechnologie :

La biotechnologie peut être définie comme l'application des systèmes biologiques et chimiques dans des procédés industriels, la biotechnologie englobe l'application de tous les systèmes biologiques qui comprennent l'ensemble des cellules, des tissus organites ou des enzymes issus d'animaux et de cellules, ainsi que des microorganismes.

De loin, la plus importante application de la biotechnologie a été l'utilisation des microorganismes [37]. Il s'agit d'une technologie essentielle fondée sur la catalyse biologique (Utilisation des enzymes pour catalyser les réactions chimiques) et la technologie de fermentation (utilisation orientée de microorganismes).

Pour la biotechnologie industrielle, elle offre des avantages techniques considérables par rapport à la technologie de la chimie conventionnelle : une cinétique de réaction plus rapide, une plus grande pureté du produit final, une réduction de la consommation d'énergie et une diminution de la production des déchets et résidus chimiques. Le développement de la biotechnologie industrielle présente un intérêt immédiat pour l'agro – industrie chimique dont le poids économique est considérable. [38]

IV-2-Applications des Protéases alcalines :

Les Protéases microbiennes ont été étudiées en vue de leur structure – fonction en relation avec le mécanisme catalytique. Ces enzymes suscitent un intérêt considérable. La Protéase à serine constitue l'un des plus importants groupes d'enzymes industrielles et la subtilisine est le plus grand sous groupe des protéases à serine. [14]

Les protéases alcalines microbiennes sont trouvées dans divers secteurs industriels, les différentes entreprises du monde entier, ont lancé avec succès plusieurs produits à base de protéases alcalines, le succès des enzymes dans les détergents a conduit à la découverte d'une protéase à serine de détergent avec des utilisations spécifiques

Le genre *Bacillus* a un nombre important de l'industrie et environ la moitié de la production commerciale de la masse des enzymes découle des souches de *Bacillus* sp. [37] Les plus grandes utilisations des protéases alcalines dans les secteurs industriels sont décrits dans la section suivante

IV- 2-1 L'alimentation et l'industrie alimentaire :

Traditionnellement les protéases microbiennes ont été exploitées dans l'industrie alimentaire de plusieurs façons, les protéases alcalines ont été utilisées dans la préparation des hydrolysats des protéines de haute valeur nutritionnelle, ces derniers jouent un rôle important dans la régulation de la pression sanguine, et sont utilisées aussi dans la préparation des formulations alimentaires pour nourrissons, des produits alimentaires thérapeutiques, la fortification des jus de fruits et les boissons non alcoolisées.

Les hydrolysats de protéine commerciale sont dérivés de la caséine et des protéines de soja. L'activité kératolytique de la protéase alcaline a été exploitée également dans la production de fourrages protéiques à partir des déchets de plumes ou de la kératine des matériaux riches en kératine [14].

IV-2-2- L'industrie de cuir :

L'industrie de cuir contribue à l'un des principaux problèmes de pollution industrielle que connaît le monde, elle cause une pollution avec les produits chimiques

(Le sulfure de sodium, les solvants, le sel ... etc. Ces produits découlent principalement du processus de tannage du cuir.

Bien que les enzymes de plantes d'animaux et de sources microbiennes ont été utilisées pendant des décennies, l'utilisation à grande échelle des enzymes microbiennes est augmentée seulement dans les années 1960 suite à l'introduction des technologies de fermentation [39]

- **Transformation de cuir :**

La peau animale est composée de 60 à 65 % d'eau, d'environ 30 % de protéines (dont 90 % de collagène) et de 2 à 10 % de graisses. Dans l'épiderme sont ancrées les racines des poils et les glandes sudoripares ou sébacées.

Dès leur réception, on conserve les peaux animales grâce à une dessiccation (traditionnellement par salage) pour prévenir une contamination microbienne ; cette opération contient 3 étapes, [40] qui sont mentionnées dans le **tableau (9)**

➤ **Tableau (9) :** Les étapes de transformation de cuir [40]

Etapes	pH	Protéines cibles	Enzymes
Trempe (décomposition des protéines, des cellules et des poils)	7-9	Protéines non pibcillaires, lipides	Protéases, d'origine microbienne et fongique (extrait du pancréas : trypsine ou issue de <i>B subtilis</i> ou <i>Aspergillus sojas</i> .)
Enlèvement des poils bain alcalin	10 12.5	Kératine Protéine non collagène	Kèratinase, Protéases. Protéase d'origine microbienne et fongique
Neutralisation et tannage	8-9	Reste des protéines cellules lipidiques	Protéases d'origine bactérienne et fongique, trypsine (extrait du pancréas)
Defroissage	6	Cuir tanné aux chromates	Protéases d'origine fongique

Lors de ces étapes, l'ajout d'enzymes protéolytiques contribue significativement à rendre les peaux bien souples, aussi les enzymes utilisées doivent présenter une forte activité protéolytique mais ne doivent pas en même temps attaquer le collagène. [40]

IV- 2-3- Détergent :

Il y a environ 100 ans, Otto Rohm développait la première lessive en poudre spécialisée, contenait des enzymes extraites du pancréas qui avaient pour but de dissoudre les salissures d'origine protéique.

Dès que les protéases alcalines issues de souches de *Bacillus* ont été disponibles, vers 1960, on a assisté à un développement extraordinaire de cette application pour les enzymes. Grâce aux possibilités offertes par l'ingénierie des protéines, les enzymes exploitées sont dorénavant adaptées le mieux possible aux procédés de lavage. Des Protéases recombinantes de *Bacillus* sont aujourd'hui fabriquées à raison de plus de 1000 tonnes. **Figure (5) [40]**

Le processus se déroule entre 30 et 90 °C et dure à peu près 30 minutes, à pH d'environ 10. Les espèces de *Bacillus* fournissent presque toutes les protéases utilisées dans l'industrie des détergents. L'amélioration des protéases pour l'utilisation dans les détergents se fait soit par l'ingénierie des protéines de Subtilisins traditionnelles ou par méta génome de la recherche de nouvelles enzymes. À l'heure actuelle, moins de 15 molécules de différentes enzymes sont utilisées dans le monde dans l'industrie de détergent. Ces enzymes sont originaires de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus lentus*, *Bacillus alkalophilus*, et de *Bacillus halodurans* [36].

❖ **Figure (5) : Préparation des lessives on poudre. [40]**

PRECULTURE

Souche à haute performance de *Bacillus lentus* modifiés par génie génétique : 10m³, 24h à 35 °C.

FERMENTATION PRINCIPALE

120m³, 48 h à 35 °C, source de carbone : dextrines, source d'azote : farine de soja, induction à l'aide de caséine

»15 g /l de subtilisine après 60 h

Séparation DE SUBTILISINE APR à 7S 60 h

Microfiltration et ultra Filtration ou filtration à contre –courant, précipitations

GRANULATION PAR ATOMISATION

Noyau (sels recouverts / granulé de sucre), antiradicaux, PEG, atomisation

GRANULATION CONVENTIONNELLE

Noyau (sels / PEG). granulation dans un mélange et séchage, recouvrement au PEG / atomisation

Dans le **tableau (10)** les différentes enzymes commercialisées sont représentées.

➤ **Tableau (10)** : les protéases commercialisées [41].

N. commercial	Producteur	Origine	WT/PE	Souche productrice
Alcalase	Novozymes	<i>B. licheniformis</i>	WT	<i>B. licheniformis</i>
FNA	Genencor	<i>B. amyloliquefaciens</i>	PE	<i>B. subtilis</i>
Savinase	Novozymes	<i>B. clausii</i>	WT	<i>B. clausii</i>
Purafect	Genencor	<i>B. lentus</i>	WT	<i>B. subtilis</i>
KAP	Kao	<i>B. alkalophilus</i>	WT	<i>B. clausii</i>
Evertase	Novozymes	<i>B. clausii</i>	PE	<i>B. subtilis</i>
Purafect OxP	Genencor	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. subtilis</i>
FN4	Genencor	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. licheniformis</i>
BLAP S	Henkel	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. licheniformis</i>
BLAP X	Henkel	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. licheniformis</i>
Esrerase	Novozymes	<i>B. halodurans</i>	WT	<i>B. halodurans</i>
Kannase	Novozymes	<i>B. clausii</i>	PE	<i>B. clausii</i>
Properase	genencor	<i>B. alkalophilus</i>	PE	<i>B. alkaliphilus</i>

WT = wild type : type sauvage .

PE : Protein Engineering .

IV- 2-4- Des déchets industriels et ménagers :

L'utilisation des protéases alcalines dans la gestion des déchets de divers produits alimentaires, de l'industrie de transformation et des activités à la maison a ouvert une nouvelle ère dans la gestion des déchets.

L'action des protéases sur les déchets protéiques lors du traitement aide à réduire la demande biologique en oxygène des systèmes aquatiques.

Dalev (1994) utilisa la protéase alcaline de *Bacillus subtilis* dans la gestion des déchets de plume en provenance des abattoirs de volailles. Les déchets de plumes, représentent environ 5% du poids corporel de volaille. Ils sont considérés comme une source de protéine pour l'alimentation humaine et animale, à condition que la structure de la kératine rigide soit complètement détruite.

Une formulation contenant des enzymes protéolytiques de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* et *Streptomyces sp.* et un agent réducteur le disulfure(thiosulfate, qui améliore la dégradation des poils est actuellement disponible sur le marché. [14]

IV-2-5- Industrie photographique :

Les protéases alcalines jouent un rôle crucial dans les bioprocédés utilisant des rayons X ou des films photographiques pour la récupération de l'argent. Les déchets de ces procédés contiennent 1,5 à 2% en poids d'argent dans leur couche de gélatine, qui est devenue très utilisée comme une source d'argent pour diverses raisons.

Traditionnellement, cet argent est récupéré par la combustion des films, ce qui entraîne la pollution de l'environnement. Comme l'argent est lié à la gélatine, il est possible de l'extraire de la couche de protéines par le traitement protéolytique. Les protéases alcalines de *B. subtilis* décomposent la gélatine dans 30 minutes à 50-60°C et libère l'argent. [14]

IV- 2-6- Application médicale :

Les protéases alcalines sont également utilisées pour le développement important des produits médicaux.

Kudray et Simonenko (1994) ont exploité l'activité élastolytique de *B. subtilis* 31618 pour la préparation d'élastoésterase, qui a été appliquée pour le traitement des brûlures. L'utilisation des protéases alcalines de *Bacillus sp.* Souche CK 1164 comme un agent thrombolytique ayant une activité fibrinolytique, a également été citée. [11]

Concernant la désinfection des instruments de chirurgie, l'utilisation d'enzymes protéolytiques dans l'orifice à pH alcalin entraînerait une inactivation partielle des prions de la scrapie. [42]

Conclusion

CONCLUSION :

Les protéases sont devenues essentielles dans une très large gamme de secteurs industriels qui réalisent les réactions chimiques au moyen de biocatalyse. Généralement il s'agit d'enzymes microbiennes qui sont fabriquées par procédés de fermentation.

Suivant l'évolution des nouvelles technologies comme les modifications mutagéniques et génétiques dirigées, de nouvelles enzymes peuvent être fabriquées sur mesure :

Cette technologie permet d'améliorer encore d'avantage les synthèses et de conduire à des applications complètement nouvelles.

Références

- [1]: Neurath, H. (1999): Proteolytic enzymes past and future. J. proc. Natl . Sci . USA . (96) : 10962-10963
- [2]: Sandhya, C. Nampoothiri, K.M.; Pandey, A. (2005): Microbial enzymes and Biotransformation: Methods in Biotechnology. 17. Springer protocols.
- 3 : Adinarayana, K. ; Ellaiah, P. (2002):Response surface optimisation of the critical medium components from a newly isolated *Bacillus* sp. J. Pharm. Sci. (5): 281.
- [4]: Sharma, J.; Singh, A.; Kumar, R.; Mitall, A. (2006): Partial purification of an alkaline protease from a new strain of *Aspergillus oryzae* AWT 20 and its enhanced stabilization in entrapped Ca-Alginate Beads. J. Microbiol. (2).170-175.
- [5]: Angere, B. (2001) : Les enzymes biocatalyseurs protéique. Ellipses Edition Marketing. France.
- [6]: Durand, G. et Monsan, P. (1982) : Les enzymes production et utilisation Industrielle.Bordas. Paris.
- [7]: www.sciencedirecte.com.consulté le /16/04/2008.
- [8] : Yon-Kahn, J .et Hervé, G. (2005) : Enzymologie Moléculaire et Cellulaire. Tome I. EDP Sciences. France.
- [9] : Yon- Kahn, J. et Hervé, G. (2005) : Enzymologie Moléculaire et Cellulaire. Tome II EDP Sciences. France.
- [10] : Pelmont, J. (1993) : Propeptides et activation des protéases. Dans : Enzymes. Office des Publications Universitaires. Alger.
- [11]: Malo, B. R.; Aparna, M.; Tanksale, H; Mohivis, F; Ghattge, A and Vasant, V. D. (1998): Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. J. Microbiol. Mol. Biol. (62): 597-635.
- [12]: Alili, M. (2007): Enhancing Expression of the cloned proteases gene VIA *Bacillus subtilis* Temperature sensitive dna C30 Mutan .Thèse de doctorat. University of Alexandria, Egypt.
- [13] : www.uoguelph.ca. consulté le 13/04/2008.
- [14] : Gupta, R .; Beg , Q. K .; Lorenz , P . (2002): Bacterial alkaline proteases: Molecular Approaches and industrial application. Appl. Microbiol. Biotech. (59).15-32.

[15] : Joubert, P. (2000): Virus de la maladie Hémorragique de lapin. INRA. France
Site web de l'INRA : www.

[16] : www.Classification des protéases. com. Consulté le 26/04/2008.

[17]: Bakhtiar, S.; Estiveria , R. J .; Hatti –Kaul, R . (2005): Substrate specificity of alkaline proteases from Alkaliphilic Feather- degrading *Nesterenkonia sp.* AL 20J. *Enz. Micro. Technol.* (27): 141-229.

[18] : www. Vealion .fr pedagogie/svt/biologie/protéase végétale htm.

[19]: Zaghloul, T.I.; Abdel wahabe, A. E.; and Mostafa, M. H. (2000): Enhanced Alkaline Proteases Production in Addition to α – Amylase via Constructing a *Bacillus subtilis* Strain. *J. Bioch . Biotech.* (84): 319 -327.

[20]: Schmidt, B. F.; Woodhouse, I.; Adams, R. M.; Ward, T.; Mainzer, S. E.; and Lab, P. J. (1995): Alkaliphilic *Bacillus sp.* strain LG 12 has a series of serine protease genes . *Appl . environment .Microbiol .* (61) : 4490-4493.

[21]: Toni, C. H.; Richter, M. F. Henrique, J. A. P. and Termigoni, C. (2002):Purification and cracterization of an Alkaline serine endopeptidase from a Feather-degrading *Xantomonas maltophilia* strain. (48): 342-348.

[22]: Tangam,E. B. and Rajkumar, G. S. (2002):Purification and characterization of Alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. *J. biotechnol.* (35): 149-154.

[23]: Gupta, A. ;Roy, I. ;Patel, R. K. ;Singh, S. P. ;Kare, S. K. ;Gupta, M. N. (2005): One-step purification and characterization of alkaline protease from holoalkalophilc *Bacillus sp.* *J. Chromato.* (21):03-127.

[24]: Horikoshi, K. (1999): Alkaliphiles: Some applications of their products for Biotechnology. *J. Microbiol. Mol. Biol.* (63): 735-750.

[25]: Atumi ;Yamamoto, Y. S. ;Moriyama, K. ; Fukushima, J.;Takenchi, H. ;Mizuki, N. ;Kawamoto, S.and Okuda, K. (1989): Cloning an expression of the alkaline protease gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* (171): 5173-5175.

[26]: David; Dentch, V. A. H.; Ioma, A.; Pawlyk, D.; Ally, A. and Durham, D. H. (1992): Cloning sequencing and expression of the gene encoding the extracellular neutral protease Vibiolmyin of *Vibrio proteolyticus* gene 112. *J. Biotechnol.* (27): 107-112.

- [27]: Jatou-ogay; Paris, K. S.; Huerre, M.; Quadrani, M.; Falchetto, R.; Togri, G. and Monod (1994): Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *J. Microbiol.* (14):917-928.
- [28]: Gunkel, P. A. ;and Gassen, H. G. (1996): Proteinase K from *Tritirachium albumlimber* characterization of the chromosomal gene and expression of the cDNA in *E.coli*. *J. Biochem.* (179) : 185-194.
- [29]: Leroy, C. (2006) : Lutte contre les salissures marines : approche par procédés enzymatiques. Thèse de doctorat.
- [30]: Çalik, P.; Nermi, K.; Özdamar, T.H. (2003): Overexpression of serine alkaline protease encoding gene in *Bacillus* species: performance analyses. *J. Enz. Microb. Technol.* (33): 967-974.
- [31]: Baebier, G. (1997) : Enzyme en agroalimentaire. Dans: Les enzymes des microorganismes extrémophiles: une nouvelle source en cours d'exploitation technique et documentation. Edition. France
- [32]: Valbuzzi, A.; Ferrari, E. and Albertini, A. M. (1999): A novel-member of the subtilisin-like Protease family from *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol.* (145): 3121-3127.
- [33]: Taha, I. Z. (1998): Cloned *Bacillus subtilis* alkaline protease (*aprA*) Gene showing high level of keratinolytic activity. *J. Biochem. Biotechnol.* (70-72): 199-205.
- [34]: Hwang, D. H.J.C.; Kim, J.H.; Chum, M.J .and Byvn (1993): Molecular cloning and nucleotide sequence of the proteases *B* gene from *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.* (26): 383-390.
- 35: Atalo, K. and Gashe, B. A. (1993): Protease production by a thermophilic *Bacillus* Species (P-001A) which degrades various kinds of fibrous proteins. *J. Biotechnol.* (15): 1151-1156.
- 36 : Han, X. Q. and Damodran, S. (1998): Purification and characterization of protease Q:A. Detergent and urea-stable serine endopeptidase from *Bacillus pumilus*. *J. Agric. Food. Chem.* (46):3596-3603.
- [37]: Van Dyke, M. I., H. Lee and J.T. Trevors (1991): Application of microbial surfactants. *Biotechnol. Adv.* (9): 241-252.
- [38]: Agathos, S. et al. : Biotechnologie industrielle et chimie durable. Capas : Comité de l'académie pour les applications de la science.

[39]: Kamini, N. R.; Hemachander, C. Geraldine Sandana Mala J. and Puvanakrishnan* R. (1988): Microbial Enzyme Technology as an alternative to conventional chemicals in leather industry. Central Leather Research Institute. India

40: Schmid, R. (2002) : Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique. Flammarion. Paris.

[41]: Maurer, K.H. (2004) : Detergent proteases . J . Biotechnol. (15) : 330-334.

[42]: Iffenecker, A. ;Ruef, C. ;Zurich ;(2002) : Risque de transmission des prions: prise de position sur le traitement des instruments chirurgicaux thermostables avant stérilisation. Swiss-Noso(32) 9. ..

Résumé

Les protéases alcalines sont des enzymes qui ont une action à pH alcalin compris entre 8 et 11. Ces enzymes exercent une action protéolytique sur les liaisons peptidiques entre les acides aminés spécifiques d'une molécule protéique.

Les protéases alcalines proviennent de diverses sources, végétales, animales ou microbiennes, cette dernière est la source la plus importante vu l'importance économique du rendement.

Il existe plusieurs types de microorganismes producteurs: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*,etc.

Différents types d'enzymes protéolytiques sont exploitées (sérine, metalloprotéases,) dont chacun est caractérisé par des propriétés physico-chimiques spécifiques, en outre, l'activité catalytique de chaque type dépend de la structure du site actif de l'enzyme.

Ces enzymes sont produites à grande échelle sur des milieux de culture adéquats à la croissance des microorganismes aussi qu'à une production maximale.

Les protéases alcalines ont trouvés des applications divers : lessive en poudre, tannage, pharmaceutique et industrie alimentaire.

Abstract:

Alkaline proteases are enzymes that act on alkaline pH (between 8 and 11). These enzymes showed proteolytic activity on peptide bonds between specific amino acids of a protein molecule.

Alkaline proteases have different origin: plants, animals or microbial, while the last is the most abundant source because of the economic value of the production yield.

Alkaline proteases have different origins: plants, animals or microbial. While the last is the most abundant source because of the economic value of the production yield: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*,

Many types of alkaline proteases exist: (serine, metallo,..), each of one is characterised by specific chemical and physical properties, and mechanism of catalysis depend on the composition of the active site.

They are produced at large scale on optimized culture media for growth and maximum production.

Application of alkaline proteases includes: detergent, tanning, pharmaceutical, food industry

المخلص

البروتياز القاعدية هي إنزيمات لها نشاط في وسط قاعدي أي في الرقم الهيدروجيني المتراوح بين (8-11). يقوم هذا الإنزيم بقطع الروابط الببتيدية بين الأحماض الأمينية الخاصة المكونة للبروتين. ينتج من مصادر متنوعة نباتية، حيوانية و ميكروبية، إلا أن أهم مصدر هو المصدر الميكروبي لأنه ذو أهمية كبيرة من الناحية الاقتصادية. توجد عدة أنواع من الكائنات الدقيقة المنتجة لهذه الإنزيمات وأهمها *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*,

توجد عدة أنواع من هذه الإنزيمات مثل إنزيمات السيرين، ولكل نوع خصائص فيزيائية وكيميائية خاصة به و يكون النشاط الإنزيمي الخاص لكل منها على حسب تركيب موقعها الفعال. يتم إنتاج هذا الإنزيم اعتمادا على أوساط مناسبة لتنمية هذه الأنواع البكتيرية من أجل الحث و الزيادة على إنتاج هذه الإنزيمات. تستعمل هذه الإنزيمات في مجالات عديدة مثل الصناعات الغذائية، مساحيق الغسيل، الدباغة، الأدوية..... الخ.