



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques

# Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine Des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie et protection des végétaux

## Thème

**Caractérisation des protéases produites**

**par la souche**

***Streptomyces* sp. TKJ2**

Présenté par : M<sup>lle</sup>. HAMOUDI MOUNA

M<sup>lle</sup>. FERHANE ASMA

M<sup>lle</sup>. DAOU AMEL

Devant le jury :

**Président:** M<sup>r</sup> Sedrati Nouari

MAA (Univ Mohammed El Bachir El Ibrahimi BBA)

**Encadreur:** M<sup>r</sup> BETTACHE Azzeddine

MCA (Univ Mohammed El Bachir El Ibrahimi BBA)

**Examineur:** M<sup>lle</sup> SOUAGUI Yasmina

MAB (Univ Mohammed El Bachir El Ibrahimi BBA)

Année universitaire : 2015/2016





# Remerciements

*Avant toute chose, je tiens à remercier «Allah» qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.*

*Mes vifs remerciements vont en particulier à Dr BETTACHE Azzeddine. De m'avoir proposé ce sujet et de diriger mon travail par ses précieux conseils et ses encouragements.*


*J'exprime mes respectueuses reconnaissances à Dr MESSIS Abdelaziz. (Co-encadreur) pour ses aides techniques et ses orientations.*

*Mes sincères remerciements vont aux membres de jury : Mr SEDRATI Nouari et M<sup>lle</sup> SOUAGUI Yasmina pour l'honneur qu'ils ont fait en acceptant de juger et d'examiner ce travail.*

*Je tiens aussi à remercier mes camarades qui ont participé au bon déroulement de ce mémoire.*

*J'attache une importance particulière à remercier tous les membres du laboratoire pour leur contribution à ce travail.*

*C'est avec un réel plaisir que j'adresse mes sincères reconnaissances et ma profonde gratitude à tous ceux qui ont m'aidé de près ou de loin pour réaliser ce travail.*





# Dédicace

*A DIEU, pour m'avoir donné la force dans les moments difficiles d'éditer ce mémoire.*

*A mes chers parents qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour ; leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études ; que DIEU les bénisse.*

*A mes chers sœurs Assia et Souad et mon cher frère Abdrahim qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*A tous mes amies.*

*A tous mes collègues de promotion.*

*A tous ceux que j'aime.*

*Amel*



# Dédicace

*Avant tout : louanges à Dieu, élément et miséricordieux pour nous avoir donné la force de mener à terme ce travail.*

*Je dédie cet humble travail à mes chers parents, mais aucune dédicace ne serait témoin de mon profond amour, mon immense gratitude et mon plus respect ;*

*À mon très cher père «Ali» qui m'a toujours soutenu, et a été toujours présent pour moi.*

*À la plus chère au monde, ma mère «Aldjia» la lumière de ma vie pour son amour, qui m'a toujours encouragé durant toutes mes années d'études.*

*À mes très chers frères «Yacine et Laid» pour leur disponibilité, leur soutien moral, leur encouragement incessant, d'être coopératif et d'assumer à ma place certaine de mes responsabilités familiales.*

*À mes fleurs sœurs, leurs époux et leurs enfants «Alima, Nazha, Amina, Samiha, Amel, Hayzia, Khadidja, Hadjer et Romaisa».*

*À mon chère tonton Lmnawer et son adorable femme Tata Fatome et toutes mes cousines et cousins pour leur soutien et leurs encouragements tout le long de mes études ; À toute ma famille Hamoudi.*

*À mes chères amies : Aicha, Nassima, Khalissa, Amina, Mimouna, Amina, Chayma, Rima, Amel, Kholoud, Nour Amel, Razika et Naima.*

*À mes sœurs et collègues : Halima, Saida, Amel, Faiza, Nadjet, Boubaker, Sayf Eldin et Zin Edine.*

*À mes chers enseignants sans exception.*

*À toutes les promotions de 2<sup>ème</sup> année Master Biologie LMD, ainsi que toute personne qui m'aime et me respecte.*

## Mouna



# Dédicace

*Ce modeste travail est dédié :*

*À mes **parents** grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux, Je prie le bon Dieu de les bénir, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.*

*À mon prince et mon cher mari **Imade** Qui m'a toujours soutenu et aidé dans mes études.*

*À tous mes proches de la famille **Ferhane**, et plus particulièrement, mes chères sœurs **Aya, Khadîdja et Chaima** et mon frère **Seifelddine**.*

*À tous mes chères amies et mes collègues de l'université de **Mohamed El Bachir El ibrahimi**.*

*Et à tous ce qui m'ont enseigné*

***Asma***

# Table des matières

---

## Table des matières

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des annexes	
Introduction.....	<b>01</b>
<b>Chapitre I : Synthèse Bibliographique</b>	
1. Les actinobactéries.....	<b>03</b>
1.1. Historique et classification.....	<b>03</b>
1.2. Production d'antibiotiques.....	<b>04</b>
1.3. Production d'enzymes.....	<b>05</b>
1.4. Le genre <i>Streptomyces</i> .....	<b>06</b>
2. Les protéases.....	<b>07</b>
2.1. Généralités.....	<b>07</b>
2.2. Propriétés.....	<b>08</b>
2.3. Classification.....	<b>09</b>
2.4. Les applications des protéases.....	<b>12</b>
2.4.1. Industrie alimentaire.....	<b>12</b>
2.4.2. Synthèse des peptides.....	<b>14</b>
2.4.3. Gestion des déchets industriels et ménagers.....	<b>14</b>
2.4.4. Utilisation médicale.....	<b>15</b>
2.4.5. Industrie des détergents.....	<b>15</b>
2.4.6. Industrie photographique.....	<b>16</b>
<b>Chapitre II : Partie expérimentale</b>	
1. Matériel et méthodes.....	<b>18</b>
1.1. Matériel analytique.....	<b>18</b>
1.2. Matériel biologique.....	<b>18</b>
1.2.1. Revivification de l'espèce <i>Streptomyces</i> sp. TKJ2.....	<b>18</b>

# *Table des matières*

---

1.2.2. Préparation des pré-cultures.....	18
1.2.3. Extraction des enzymes.....	19
1.3. Dosage de l'activité enzymatique.....	20
1.3.1. Effet de pH sur l'activité enzymatique.....	20
1.3.2. Effet de température sur l'activité enzymatique .....	21
1.3.3. Effet des ions sur l'activité enzymatique .....	21
<b>Chapitre III : Résultats et discussion</b>	
1. Revivification de la souche TKJ2.....	23
2. Caractérisation des protéases produites.....	23
2.1. Effet de pH sur l'activité enzymatique.....	23
2.2. Effet de température sur l'activité enzymatique.....	25
2.3. Effet des ions métallique et les réactifs chimiques.....	26
Conclusion générale.....	29
Références Bibliographiques	
Annexes	



# Résumé

## Résumé

Les protéases de la souche *Streptomyce* sp. TKJ2 ont été caractérisées des conditions physicochimiques des protéases de façon à obtenir une meilleure activité protéolytique. Des essais de caractérisations biochimiques ont été effectués à partir de l'étude de l'effet de pH, température et l'effet des ions métalliques sur l'activité protéolytique produite par la souche *Streptomyce* sp. TKJ2.

Les résultats obtenus montre que la meilleure activité enzymatique de ces protéases est de 1.224 mg/ml, obtenue a pH 7 et une température de 60°C après un temps d'incubation de 5 heure et 30 min. Les ions métalliques peuvent stimule fortement l'activité protéolytique des protéases avec une activité relative de 520.42 % avec l'ion  $CaCl_2$ .

**Mots clés :** Acténobactéries, *Streptomyces* sp. TKJ2, caractérisation, protéases, activité protéolytique.

### المخلص

إنزيمات السلالة *Streptomyce* sp. TKJ2 درست بطريقه تمكننا من الحصول على أفضل نشاط بروتينوليزي ، مجموعة من الاختبارات البيوكيماوية أجريت على النشاط البروتينوليزي من خلال دراسة تأثير pH و الحرارة و كذا تأثير الشوارد المعدنية على النشاط البروتينوليزي للبروتياز المنتج من طرف السلالة *Streptomyces* sp. TKJ2.

النتائج المحصل عليها أكدت أن أفضل نشاط إنزيمي للبروتياز هو 1.224 ملغ/مل تم الحصول عليها في pH 7 و في درجة حرارة 60 درجة مئوية بعد فترة حضانة دامت 5 ساعات و 30 دقيقة.

الشوارد المعدنية استطاعت تحفيز و بقوة النشاط البروتينوليزي للسلالة *Streptomyces* sp. TKJ2 بنشاط نسبي بلغ 520.42 بالمئة شوهدت عند الشاردة  $CaCl_2$  .

**الكلمات المفتاحية :** أكتينوبكتيرية, *Streptomyces* sp. TKJ 2, تمييز, بروتياز , النشاط البروتينوليزي.

## *Liste des abréviations*

---

### **Liste des abréviations**

- ✓ ADN<sub>r</sub> : Acide désoxyribonucléique ribosomique.
- ✓ EDTA: Ethylenediaminetetra-acetic acid.
- ✓ SDS : Sodium Dodécyl Sulphate.
- ✓ TCA : Trichloroacétique.

# *Liste des figures*

---

## **Liste des figures**

<b>Figure 01</b> : Les étapes de revivification de l'espèce <i>Streptomyces</i> sp. TKJ2.....	18
<b>Figure 02</b> : Préparation des pré-cultures.....	19
<b>Figure 03</b> : Extraction des enzymes .....	19
<b>Figure 04</b> : Effet de pH.....	20
<b>Figure 05</b> : Effet de température.....	21
<b>Figure 06</b> : Effet des ions.....	22
<b>Figure 07</b> : Aspect des colonies de l'isolat « TKJ2 » sur le milieu M2 après incubation de 7 jours à 28°C.....	23

# *Liste des tableaux*

---

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau I :</b> Quelques actinobacteries producteurs d'enzymes.....	05
<b>Tableau II :</b> Classification des protéases.....	10
<b>Tableau III:</b> Exemples d'enzymes employées dans différents secteurs industriels.....	17
<b>Tableau IV :</b> Densité optique des activités enzymatiques en fonction du pH.....	24
<b>Tableau V :</b> Densité optique des activités enzymatiques en fonction de la température.....	25
<b>Tableau VII :</b> les résultats de la lecture spectrophotométrique pour les ions.....	26
<b>Tableau VIII :</b> Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatiques.....	27

# *Introduction*

## Introduction

Le marché mondial des enzymes industrielles s'élevait à 3,3 milliards de dollars en 2010. En calculant un taux de croissance de 6,6 %, des revenus de 4,4 milliards de dollars sont prévus pour 2015. Ce marché est estimé à 7,1 milliards de dollars en 2018 (**BCC Research, 2014**) ; la plus grande part est liée aux protéases (**Sarrouh et al., 2012**).

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans les molécules protéiques. La diffusion large des protéases chez les plantes, les animaux et les microorganismes montre qu'elles sont nécessaires pour tous les organismes où elles jouent des rôles physiologiques importants dans des processus biologiques diverses (**Sandhya et al., 2004**).

Les protéases sont les enzymes les plus recherchées dans les bioindustries et l'agro-alimentaire (**Zaraï Jaouadi et al, 2013**). Plus de 300 tonnes d'enzyme sont produites annuellement (**George et al., 1995**).

Dans le domaine de la biotechnologie industrielle, les microorganismes restent la source la plus importante pour la production de protéases à caractère agro-alimentaire et industriel (**Zaraï Jaouadi et al, 2013**).

Ces protéases d'origine microbiennes sont souvent optimisées, purifiées et caractérisées pour être utilisées dans différents domaines industriels notamment la détergence, la tannerie, l'industrie de textile, l'industrie agroalimentaire (**Horikichi, 1999**), alimentaire, brassicole et pharmaceutique (**Reed, 1975**). Les nouvelles propriétés de ces protéases ont également révolutionné la biotechnologie avec leur exploitation dans différentes applications comprenant la synthèse des acides nucléiques, des acides aminés et l'étude des structures protéiques (**Sterner et Liebl, 2001**).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la recherche de protéases produites par des actinobactéries issues des sols. Ces bactéries forment un grand groupe de procaryotes, les plus importants dans la nature (**Lacey, 1997**). Continuellement de nouveaux métabolites secondaires à différentes activités biologique sont isolés de souches d'actinobactéries. Les enzymes, qui après les antibiotiques sont les produits les plus importants des actinomycètes (**Lopes et al, 1999**).

# Introduction

---

Le présent travail de recherche relate pour objectifs :

- ❖ Une étude théorique par une recherche bibliographique qui cadre le sujet de travail
- ❖ Une étude expérimentale se présentant comme suite :
  - Extraction des enzymes de la souche d'actinobactérie *Streptomyces* sp. TKJ2
  - Détermination de pH optimum de l'activité enzymatique.
  - Détermination de température optimum de l'activité enzymatique.
  - Détermination de l'effet des ions métallique sur l'activité enzymatique.

*Chapitre I*  
*Synthèse*  
*Bibliographique*



## 1. Les Acténobactéries

### 1.1. Historique et classification

Le plus ancien genre d'actinobactérie aérobie décrit par Cohn (1875), a été appelé *Streptothrix*. Ce nom était assigné à un vrai champignon et donc pour des raisons de priorité dans la classification, ce genre bactérien a été déclaré infirme. En 1877, l'espèce *Actinomyces bovis* isolée d'un cas d'actinomycose de bœuf a été décrite comme étant une moisissure. Ainsi, les actinomycètes ont débuté leur carrière appelés: moisissures rayonnants.

Comme dans le cas de *Streptothrix*, beaucoup de taxonomistes attirent l'attention sur l'existence du champignon *Actinomyce horkelii* qui contrarie la validité du non *Actinomyces bovis*. Néanmoins, le nom *Actinomyces* a été accepté comme un nom d'un genre bactérien pour deux raisons, premièrement parce que le nom est orthographié différemment, et deuxièmement le nom *Actinomyce* n'a été utilisé que par son auteur **Meyen, en 1827**, et universellement considéré comme infirme. En conséquence, le nom générique, *Streptomyces* est proposé comme combinaison des deux noms qui pour la première fois ont été attribués aux actinobactéries: *Streptothrix* et *Actinomyces*.

Par la suite, d'autres genres sont décrits par Lehmann et Neumann: *Corynebacterium* et *Mycobacterium* en 1896, ces genres sont réunis avec les deux premiers dans la famille des *Mycobacteriaceae*. **Winslow et al., (1917)**, incluent aussi les genres *Nocardia*, *Leptotrichia* et *Fusiformis*. **Buchanan (1917; 1918)** propose l'ordre des *Actinomycetales*, contenant deux familles *Actinomycetaceae* et *Mycobacteriaceae*. Entre les années 1950 et 1960, une description massive de nouvelles espèces a introduit une ambiguïté dans la classification de ces bactéries. Cette ambiguïté a demeuré jusqu'à l'année 1970 avec la mise au point des techniques chimiotaxonomiques qui ont démontré l'hétérogénéité phénotypique des genres d'actinomycètes.

Les réarrangements taxonomiques majeurs au niveau des genres et des familles n'ont débuté qu'après les années 1980, sur la base des caractéristiques chimiotaxonomiques et moléculaires (**Stackebrandt et Schumann, 2006**). Dans le volume 4 du « *Bergey's Manual* »

# Synthèse bibliographique

---

(1989) les actinomycètes sont regroupés dans un seul ordre des *Actinobacteria*, qui est répartie en repartis en 8 groupes, dans lesquels les genres sont rassemblés selon la morphologie et la chimiotaxonomie (**Williams et al., 1989; Holt et al., 1994**).

Dans le volume 5 du Bergey's Manual (2012) la classification des actinobactéries est basée principalement sur l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S, les actinobactéries sont classés dans le phylum des *Actinobacteria*, qui est arrangé en classes, ordres, familles, genres et espèces (**Whitman et al., 2012**).

Pour la caractérisation et l'identification des actinobactéries un ensemble de données phénotypiques et génotypiques doivent être rassemblées, pour arriver jusqu'au niveau de l'espèce ou de la souche. Cette caractérisation polyphasique repose sur les techniques classiques qui sont l'étude de la culture, de la morphologie, de la physiologie, de la chimiotaxonomie et les méthodes génotypiques (**Whitman et al., 2012**).

## 1.2. Production d'antibiotiques

Les actinobactéries représentent le groupe de microorganismes le plus important dans la production de métabolites bioactifs, ils sont à l'origine de plus de 45 % de composés bioactifs connus, 34 % dérivent du genre *Streptomyces* et 11 % des genres d'actinomycètes rares (**Bérdy, 2005**).

Les antibiotiques occupent la part la plus importante des métabolites produits par les actinomycètes. Depuis la découverte du premier antibiotique, la streptomycine, à partir d'une espèce du genre *Streptomyces*, beaucoup d'intérêts ont été donnés à ce genre, durant les années 1950 et 1960. Environ 70 % des antibiotiques ont été isolés de ce genre. Ainsi, durant ces dernières décennies, l'importance a été donnée aux actinomycètes rares, de ce fait ces derniers sont à l'origine de 25 à 30 % des antibiotiques (**Bérdy, 2005**).

Cependant, les *Streptomyces* sp. Sont toujours les producteurs de la majorité des antibiotiques utilisés en thérapeutique. Les actinomycètes rares produisent les composés les plus singuliers et les plus divers et le plus souvent non toxiques, possédant un excellent potentiel antibactérien. Parmi les métabolites produits par ces actinomycètes rares, il y a beaucoup de molécules qui sont très importantes en pratique clinique comme les gentamicines, les erythromycines, la vancomycine et la rifamycine. Ainsi d'autres molécules comme le ziracine, le dalbavacine et le spynosine sont utilisées en agriculture. Aussi, nous

# Synthèse bibliographique

---

notons que la vancomycinristocetine est un type complexe de glycopeptide produit, presque en exclusivité, par plusieurs espèces d'actinomycètes rares (Bérdy, 2005).

## 1.3. Production d'enzymes

Dans leur environnement naturel, les actinobactéries sont des bactéries saprophytes, ils participent à la dégradation, par la production d'enzymes extracellulaires, de la matière organique, donc au recyclage des biopolymères complexes comme la cellulose, la lignine, la lignocellulose, la kératine, la chitine, la pectine et le xylane. De ce fait ces enzymes ont été exploités dans l'industrie, tel que les amylases, les protéases, les ligninases, les cellulases et les lipases (Demain et Solomon, 1985; Sanglier et Trujillo, 1997; Chitte et al., 1999; Pitinate et al., 1999; Mason et al., 2001; Rivas et al., 2003).

Tableau I : Quelques actinobactéries producteurs d'enzymes (Saci, 2012).

Enzyme	Genre ou espèce d'actinomycète
Cellulases	- <i>Streptomyces</i>
Laccases	- <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> - <i>Streptomyces viridosporus</i> - <i>Streptomyces fusca</i>
Pectinases	- <i>Micromonospora</i> - <i>Microbispora</i> - <i>Actinoplanes</i> - <i>Streptosporangium</i> - <i>Streptomyces</i>
Xylanases	- <i>Streptomyces</i> - <i>Promicromonospora</i> - <i>Microbispora</i> - <i>Micromonospora</i> - <i>thermomonospora</i>
	- <i>Jonesia denitrificans</i>
Amylases	- <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> - <i>Thermomonospora curvata</i> - <i>Saccharomonospora viridis</i> - <i>Streptomyces</i>

## Synthèse bibliographique

---

Dextrinases	<i>-Oerskovia</i> <i>-Xanthineolytica</i> <i>-Actinomyces israeli</i>
Chitinases	<i>-Microbispora</i> <i>-Micromonospora</i> <i>-Nocardiopsis</i> <i>-Planobispora</i> <i>-Planomonospora</i> <i>-Thermoactinomyces</i> <i>-Thermomonospora</i>
Lipases	<i>-Thermoactinomyces vulgaris</i> <i>-Streptoverticillium</i> <i>-Micromonospora chalcea</i>
Protéases	<i>-Actinomadura</i> <i>-Micromonospora</i> <i>-Nocardiopsis</i> <i>-Planomonospora</i> <i>-Planobispora</i>

### 1.4. Le genre *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces*, proposé par Waksman et Henrici (1943), est classé sur la base de la morphologie puis du type de la paroi cellulaire (**Anderson et Wellington, 2001; Xiao et al., 2009**); C'est le plus important genre des actinobactéries aérobies, de 1940 à 1957, **Williams et al. (1981, 1983)**.

Plus de 1000 espèces de *Streptomyces* ont été décrites, avant les années 1970 le nombre total a augmenté jusqu'à 3100, bien que beaucoup d'espèces ont été insuffisamment décrites, à cette époque l'identification au niveau de l'espèce été basée, seulement, sur la pigmentation et un nombre limité de caractères morphologiques. Cependant, après de nouvelles études phénotypiques exhaustives, **Williams et al. (1981, 1983)**, Considérant que l'intérêt donnée aux caractères morphologiques n'est pas justifié, ils ont suggéré que toutes les espèces qui ont une relation doivent être classées dans des groupes dans le genre des

# Synthèse bibliographique

---

*Streptomyces*. D'autres études menées par **Goodfellow et al. (1986; 1992)** ont, aussi, aidé à limiter le nombre des espèces et à clarifier la classification des *Streptomyces* sp. Avec l'introduction de l'outil moléculaire, beaucoup d'ambiguïtés ont été écartées. *Streptomyces* est le genre type de la famille des *Streptomycetaceae* dans l'ordre des *Streptomycetales*. Ce genre contient 1890 espèces et 114 sous espèces. L'espèce type de ce genre est *S. albus* (**Holt et al., 1994; Reddy et al., 2010; Euzéby, 2012; Whitman et al., 2012**).

Les *Streptomyces* se trouvent dans tous les milieux terrestres et aquatiques ainsi que les environnements symbiotiques et endophytiques (**Xiao et al., 2009**). Elles sont très abondantes dans les sols riches en matière organique en décomposition (**Holt et al., 1994**).

Elles représentent le genre le plus abondant de la population des actinomycètes dans le sol et elles sont responsables de son odeur d'humus caractéristique (**Katsifas et al., 1999; Zaitlin et al., 2003**). Mais elles sont, aussi, trouvées dans les milieux où les conditions sont extrêmes (**Zhao et al., 2009**).

## 2. Les protéases

### 2.1. Généralités

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Elles sont générées comme des pro-enzymes inactives (zymogènes) et selon les exigences, elles seront converties en forme active par une protéolyse limitée (**Mukherjee et al., 2008; Benedykt et Katarzyana, 2008; Reddy et al., 2008; Wilkesman et Kurz, 2009**). Elles représentent la seule classe des enzymes qui occupe une place essentielle dans les différentes applications industrielle, biotechnologique, médicinale et dans les domaines de recherche (**Coral et al., 2003; Sandhya et al., 2005**). Elles ont été utilisées pour la première fois dans l'industrie alimentaire comme des agents de coagulation pour la production de fromage (**Sandhya et al., 2004**).

Les enzymes protéolytiques sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (**Gupta et al., 2002; Sandhya et al., 2005**). Cependant, les protéases microbiennes sont plus intéressantes que

## Synthèse bibliographique

---

celles provenant des sources végétales ou animales depuis qu'elles présentent les caractéristiques les plus recherchées dans les applications biotechnologiques:

- La susceptibilité à la manipulation génétique;
- La grande diversité biochimique des produits obtenus (**Coral et al., 2002; Sandhya et al., 2005; Aguilar et al., 2008**).

Les microorganismes élaborent une large gamme des protéases, qui peuvent être intra et/ou extracellulaires :

- Les premières sont importantes dans les différents processus cellulaires et métaboliques, tel que la sporulation, la différenciation, la maturation des enzymes et la maintenance du réserve cellulaire en protéines.
- Tandis que les autres sont essentielles pour l'hydrolyse des sources nutritionnelles protéiques et pour inhiber la cellule d'absorber ou d'utiliser des produits hydrolytiques (**Gupta et al., 2002**).

### 2.2. Propriétés

Les protéases constituent un groupe très large et complexe contenant des enzymes qui diffèrent dans leurs propriétés tels que : le site actif, le mécanisme catalytique, les optima du pH et de température, le profil de la stabilité et la spécificité du substrat (**Sumantha et al., 2006; Vishwanatha et al., 2009**).

La spécificité d'action des enzymes protéolytiques est régie par la nature de l'acide aminé et d'autres groupes fonctionnels (aromatiques, aliphatiques ou la présence de sulfure) autour de la liaison à hydrolyser (**Sumantha et al., 2006; Benedykt et Katarzyana, 2008**).

Ces enzymes sont très importantes du fait qu'elles ne contrôlent pas seulement les réactions protéolytiques, mais aussi elles régulent les diverses cascades enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire tels que la décomposition des lipides et des glucides.

Les protéases sont capables de modifier les propriétés biologiques des chaînes polypeptidiques suite à la coupure des liaisons peptidiques (activation, inactivation ou une protéolyse non spécifique pendant la dégradation).

Les protéases peuvent être dangereuses pour les cellules en altérant leur environnement. De ce fait, la cellule a développé une large gamme des mécanismes pour contrôler l'activité protéolytique. Cette régulation peut être effectuée à n'importe quelle étape de l'expression des gènes (la transcription depuis l'opéron, la traduction, les modifications post-traductionnels, l'interaction avec les inhibiteurs et d'autres protéines). **(Benedykt et Katarzyna, 2008).**

### 2.3. Classification

D'après "*The Enzyme Commission of Classification*", les protéases appartiennent au groupe 3 (les hydrolases) et sous-groupe 4 (qui hydrolysent les liaisons peptidiques) **(Rao et al., 1998; Sumantha et al., 2006; Wilkesman et Kurz, 2009).**

Auparavant, la classification a été basée essentiellement sur la source d'enzyme, l'action de catalyse, le poids moléculaire et la spécificité de substrat ou de la charge. Cependant, un système plus rationnel s'utilise actuellement basé sur la comparaison des sites actifs, les mécanismes d'action et sur la structure tridimensionnelle **(Aguilar et al., 2008).**

Les protéases peuvent être réparties en deux grands groupes en fonction de leur capacité de couper les liaisons peptidiques N- ou C-terminales (exopeptidases : aminopeptidases, carboxy-peptidases respectivement), ou les liaisons peptidiques internes (endopeptidases, appelées également les protéinases) (tableau I) **(Sumantha et al., 2006; Benedykt et Katarzyna, 2008; Belitz et al., 2009).**

Les enzymes protéolytiques sont également distinguées selon la présence ou l'absence de groupements chargés dans une position relative à la liaison sensible et qui sont classifiées suivant :

- Le pH optimum : protéases acides, alcalines et neutres;
- Le substrat spécifique : collagénases, kératinases, élastases,...
- L'homologie avec d'autres protéases antérieurement étudiées comme la trypsine, la pepsine,... (trypsin-like, pepsin-like,...).

# Synthèse bibliographique

**Tableau II : Classification des protéases (Rao et al., 1998).**

Protéases	Mode d'action	EC N°
<b>Exopeptidases</b>		
<b>Amino-peptidases</b>	● ↓ ○-○-○-○-○---	3.4.11
Dipeptidyl peptidase	●-● ↓ ○-○-○-○-○---	3.4.14
Tripeptidyl peptidase	●-●-● ↓ ○-○-○-○-○---	3.4.14
<b>Carboxy-peptidases</b>	---○-○-○-○-○-○ ↓ ●	3.4.16-3.4.18
protéase type Sérine		3.4.16
Métallo-protéase		3.4.17
Protéase type cystéine		3.4.18
Peptidyl dipeptidase	---○-○-○-○-○ ↓ ●-●	3.4.15
Dipeptidase	● ↓ ●	3.4.13
<b>Omega peptidases</b>	*-● ↓ ○-○-○-○-○---	3.4.19
	---○-○-○-○ ↓ ●-*	3.4.19
<b>Endopeptidases</b>	---○-○-○ ↓ ○-○-○-○---	3.4.21–3.4.34
Protéase à sérine		3.4.21
Protéase à cystéine		3.4.22
Protéase à acide aspartique		3.4.23
Métallo-protéase		3.4.24
Endopeptidases (mécanisme catalytique est inconnu)		3.4.99

○ Ces cercles représentent les résidus d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique ;

● Les cercles pleins indiquent les acides aminés terminaux ;

\* Les étoiles signifient les terminus bloqués ;

↓ Les flèches indiquent les sites d'action d'enzyme.

### 2.3.1. Les protéases à acide aspartique

Les protéases aspartiques appelées également protéases acides, sont des enzymes protéolytiques dont l'activité catalytique dépend d'un résidu d'acide aspartique présent au niveau du site actif de l'enzyme. Elles ont été regroupées en trois familles, à savoir, la pepsine (A1), retro-pepsine (A2), et les enzymes de para-rétrovirus (A3).

La majorité de ces enzymes ont à un pH isoélectrique entre 3 et 4,5 et une activité maximale à des faibles pH (généralement de 3 à 5) qui est déterminée par la position et l'orientation de tous les résidus à proximité du site actif (Rao et al., 1998).



## Synthèse bibliographique

---

Les protéases acides sont reconnues par leur inhibition spécifique par le pepstatin, un pentapeptide produit naturellement par des souches de *Streptomyces sp.* (**Kocabiyik et Özel, 2007**). Il contient deux résidus d'acide aminé inhabituel: la statine. L'oxygène de l'hydroxyle de la première statine forme des liaisons hydrogènes avec les deux résidus catalytiques d'aspartate, ce qui provoque l'inhibition (**Yang et Quail, 1999**).

### 2.3.2. Les protéases à sérine

Les protéases à sérine constituent une sous-classe d'endopeptidases d'un grand intérêt au niveau industriel. Elles comportent généralement dans leur site actif trois résidus d'acides aminés essentiels à la catalyse (Ser, His, Asp) formant la triade catalytique (**Rawlings, 1998**).

Chaque enzyme présente une spécificité particulière plus ou moins étroite vis-à-vis des résidus après lesquels elle coupe la chaîne peptidique, sur cette base on distingue trois groupes :

- Le type trypsine provoque l'hydrolyse de la protéine après un site chargé positivement;
- Le type chymotrypsine qui hydrolyse les protéines après un résidu hydrophobe de haut poids moléculaire;
- Le type élastase coupe les protéines après un résidu hydrophobe de faible poids moléculaire. (**Rawlings, 1998**).

### 2.3.3. Les protéases à cystéine

Les protéases à cystéine, ou thiols, sont largement représentées dans le monde procaryote et eucaryote où elles sont impliquées dans de nombreux processus protéolytiques intra et extracellulaires, dont la papaïne d'origine végétale est la plus utilisée à l'échelle industrielle. La plupart de ces enzymes sont activées seulement en présence d'agents réducteurs comme la cystéine ou l'acide cyanhydrique (HCN). Leur activité est liée à la présence de Cys et His au niveau du site actif (**Rao et al., 1998; Wilkesman et Kurz, 2009**).

Il y'a eu un intérêt croissant pour ces protéases, en particulier pour la modification des protéines alimentaires et pour la synthèse des peptides biologiquement actifs et leurs analogues (**Rao et al., 1998; Wilkesman et Kurz, 2009**).

## 2.3.4. Les métallo-protéases

Les métallo-protéases sont les plus diversifiés de tous les types des protéases, caractérisées par une activité catalytique qui exige la présence d'un ion métallique divalent au niveau de leurs site actif habituellement le  $Zn^{2+}$ , bien que dans certains cas, autres métaux de transition (éléments de groupe B du tableau périodique) peuvent s'y substituer tel que le  $Mn^{2+}$  (cas de la prolidase et la prolinase) (Wilkesman et Kurz, 2009; Belitz et al., 2009).

Ces enzymes sont généralement des protéases neutres, dont le pH optimum se situe près de 7, mais certaines d'entre eux sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de 10. La stabilité de ces protéases augmente considérablement en cas d'addition des ions  $Ca^{2+}$  au milieu et au contraire elle diminue si des agents séquestrant sont ajoutés. Ainsi, ces protéases sont inactivées en présence d'agents chélateurs forts (ex : EDTA), qui enlèvent le  $Zn^{2+}$ , alors que l'enlèvement des ions  $Ca^{2+}$  affecte seulement leur thermo-stabilité. (Wilkesman et Kurz, 2009; Belitz et al., 2009).

## 2.4. Les applications des protéases

Les protéases sont parmi les trois plus grands groupes des enzymes industrielles (hydrolases), comptent pour environ 60-65% des ventes totales dans le monde entier des enzymes en raison de leurs applications dans plusieurs secteurs industriels (Wang et al., 2005; Chellappan et al., 2006; Barnali et al., 2008 ; Mukherjee et al., 2008).

### 2.4.1. Industrie alimentaire

#### a). La fabrication du fromage

Des recherches approfondies ont permis de prouver que la majorité des protéases microbiennes acides possède une grande capacité à coaguler le lait pour former le caillé, l'étape clé dans la production fromagère (Neelakantan et al., 1999; Sumantha et al., 2006); ce qui facilite l'expansion de l'industrie fromagère, dont le développement a été limité par la pénurie de la présure animale.

Le traitement chimique, par des agents oxydants, appliqué à l'extrait enzymatique obtenue à partir de *Mucor meihei* permet d'obtenir une enzyme aux propriétés similaires à celles de la présure de veaux, en termes de productivité et la qualité du produit final (Aguilar et al., 2008).

## Synthèse bibliographique

---

Dans l'industrie du lait, les protéases acides, neutres et basiques produites par *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Thermoascus aurantiacus*, *Irpex lactis*, *Endothia parasitica* et autres espèces du genre *Mucor* ont été également utilisées (**Channe et Shewale, 1998; Merheb et al., 2007; Aguilar et al., 2008**). La plupart de ces préparations engendre l'apparition des arômes anormaux et un goût amer. La protéase produite par *Pseudomonas fluorescens* R098 s'utilise actuellement comme un agent d'amélioration (**Koka et Weimer, 2000**).

### b) Les hydrolysats des protéines

Les protéases jouent un rôle important dans la préparation des hydrolysats de protéines de haute valeur nutritive à partir de divers substrats protéiques naturels (**Gupta et al., 2002**):

- Dans l'industrie de panification, les protéases d'*Aspergillus oryzae* (endo et exo-peptidases) s'utilisent pour modifier le gluten de blé (protéine insoluble) par protéolyse limitée, ce qui réduit le temps de mélange et augmente le volume du pain (**Sumantha et al., 2006**).
- Certaines protéases microbiennes (alcalines et neutres) jouent un rôle important dans le traitement de la sauce de soja, ainsi que dans l'hydrolyse de protéines de soja (ex : protéase alcaline du *Bauveria felina*), afin d'améliorer les propriétés fonctionnelles et réduire l'amertume des préparations (**Agrawal et al., 2005; Aguilar et al., 2008**).
- D'autres applications, qui exploitent les propriétés hydrolytiques des protéases sont : l'hydrolyse de la gélatine, la récupération des protéines de viande, l'hydrolyse des protéines de poissons et des déchets de crustacés pour produire la chitine par des protéases de *Bacillus subtilis* (**Yang et al., 2000; Sumantha et al., 2006**).
- La bromélaïne et la papaïne améliorent la valeur nutritive des aliments. En plus, cette dernière s'utilise dans la fabrication des extraits de levures et des POU (Protéines d'Organismes Unicellulaires), dans l'extraction des arômes et des composés colorés des plantes et dans la production des milieux de culture microbiologiques (**Sumantha et al., 2006**).

### 2.4.2. Synthèse des peptides

Dans des milieux aqueux, les protéases catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques, mais la réaction se procède en sens inverse (synthèse) dans des médias où l'eau est restreint (présence des solvants organiques) (Gupta et al., 2005; Mei et Jiang, 2005; Kumar et Bhalla, 2005; Wang et al., 2008).

Récemment, l'application des protéases (principalement des protéases à serine, à acide aspartique et les métallo-protéases) dans la production de certains oligopeptides (principalement des di- et tri-peptides) a reçu une grande attention comme une voie alternative à l'approche chimique en raison de ses avantages. Cependant, l'utilisation de ces biocatalyseurs est limitée par la spécificité et l'instabilité de l'enzyme en présence des solvants organiques (Kumar et Bhalla, 2005; Wang et al., 2008). Par exemple, l'aspartame (L-aspartyl-L-phénylalanine), un édulcorant artificielle à faible pouvoir calorifique, a été synthétisé par voie enzymatique en utilisant la métallo-protéase "thermolysine" produite par *Bacillus thermoprotelyticus*. La protéase provenant de *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 induit également la synthèse de l'aspartame avec une grande stabilité en milieux organiques par comparaison avec la thermolysine permettant d'avoir des meilleurs rendements (Aguilar et al., 2008 ; Ogino et al., 2010).

### 2.4.3. Gestion des déchets industriels et ménagers

La possibilité de dépuration des déchets issus de différents secteurs, en les utilisant comme des substrats pour diverses bio-productions d'intérêt économique potentiel, a été largement développée (Roukas, 1999; Guerra et Pastrana, 2003; Hernandez et al., 2006).

Récemment, l'utilisation des protéases dans la gestion des déchets provenant de diverses industries agro-alimentaires et activités ménagères, développe un nouvel espace dans la gestion des déchets. Les enzymes protéolytiques de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyliquesfaciens*, *Streptomyces sp.* et de différentes souches d'*Aspergillus* sont actuellement utilisées dans ce domaine (Gupta et al., 2002; Hernandez et al., 2006).

## 1.4.4. Utilisation médicale

Les enzymes protéolytiques sont également utilisées pour développer des produits d'importance médicale :

- Les protéases d'*Aspergillus* s'appliquent pour soulager les troubles digestives gastro-intestinaux tels que la dyspepsie.
- La brinase, une protéase acide plasmine-like, hydrolyse la fibrine et le fibrinogène. Elle est appliquée sur des patients en hémodialyse chronique avec des canules artério-coagulés.
- La collagénase, qui hydrolyse le collagène natif, a été utilisée pour le débridement des ulcères cutanés et les brûlures, trouve également une application dans le traitement des cellules pathologiques des disques intervertébraux.
- La protéase alcaline de *Bacillus* sp. CK 11-4 a une activité fibrinolytique appliquée comme un agent thrombolytique.
- La protéase neutre "dispase" (amino-peptidase) est une enzyme produite par *Bacillus polymyxa*, exerce une activité protéolytique douce, ce qui la fait très utile pour l'isolement de cellules primaires et secondaires (subculture), car elle maintient l'intégrité des membranes cellulaires (Gupta et al., 2002 ; Sumantha et al., 2006).

## 2.4.5. Industrie des détergents

Les protéases présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergents pour leur capacité à favoriser l'élimination des taches protéiques vue leur avantage unique qui ne peut autrement être obtenue avec la technologie des détergents classiques (Gupta et al., 2002). Maintenant, elles sont ajoutées comme ingrédients clés, ce qui représente environ 25% des ventes totales dans le monde entier des enzymes.

Parmi les principales conditions préalables pour l'utilisation des protéases dans la production des détergents sont : l'action sur une large gamme des substrats, l'activité et la stabilité à des pH et à des températures élevés et en présence des agents oxydants additionnés.

Le premier détergent contenant l'enzyme bactérienne a été introduit sur le marché en 1956 sous le nom commercial Bio-40 (Mukherjee et al., 2008). Aujourd'hui, toutes les protéases des détergents actuellement commercialisés sont des protéases sérines (subtilisines et/ou des protéases alcalines) produites par *Bacillus* sp. (Chellappan et al., 2006; Guo et Ma, 2008).

Récemment, les protéases produites par un petit nombre de sources fongiques telles que *Penicillium* sp, *Aspergillus parasiticus*, *Condiobolus coronatus* et *Engyodontium album* ont été étudiées pour une telle application (**Rashbehari et al., 2003; Sandro et al., 2003; Chellappan et al., 2006**).

### 2.4.6. Industrie photographique

Les protéases alcalines et neutres jouent un rôle crucial dans le bio-traitement des films photographiques pour la récupération d'argent (**Sumantha et al., 2006**). Ce type de films contient entre 1,5 et 2% d'argent dans leur couche de gélatine, qui peut être utilisé comme une bonne source d'argent pour des fins variés. Traditionnellement, cet argent est récupéré par la combustion, ce qui provoque une pollution environnementale indésirable. En plus, la base du film en polyester ne peut pas être recouverte par cette méthode (**Gupta et al., 2002**).

De fait que l'argent est lié à la gélatine, il est possible de procéder à une extraction de la couche protéique par des traitements protéolytiques. L'hydrolyse enzymatique de la gélatine permet non seulement l'extraction d'argent, mais aussi le recyclage de la base du film (**Gupta et al., 2002**).

## Synthèse bibliographique

---

**Tableau III:** Exemples d'enzymes employées dans différents secteurs industriels (Zermane, 2008).

Secteur industriel	Enzyme	Application
Industrie des détergents	-Cellulase -Amylase -Protéase -Lipase	-Nettoyage, clarification des couleurs. -Enlèvement des taches d'amidon -Enlèvement des taches protéiques -Enlèvements des taches de graisses
Industrie des boissons	-Pectinase -Amylase	-Dépectinisation, -Clarification des jus, broyage. -Traitement des jus.
Produits laitiers	-Pectine méthylestérase -Protéase -Lipase	-Affermissement de produits à base de fruits. -Lait caillé. -Aromes des fromages
Industrie textile	-Cellulase -Pectate lyase	-Assouplissement du coton -Lessivage
Pâte à papier	-Cellulase -Xylanase	-Désencrage, améliorant de drainage, amélioration de la souplesse de la fibre. -Blanchissement de papier

*Chapitre II*  
*Matériels & Méthodes*



## 1. Matériel et méthodes

Ce présent travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie et de Biochimie, département des Sciences biologiques à l'université de Mohammed El Bachir El Ibarahimi de Bordj Bou Arreridj, sous la direction de l'encadreur Dr BETTACHE Azzeddine et le co-encadreur Dr.MESSIS Abdelaziz.

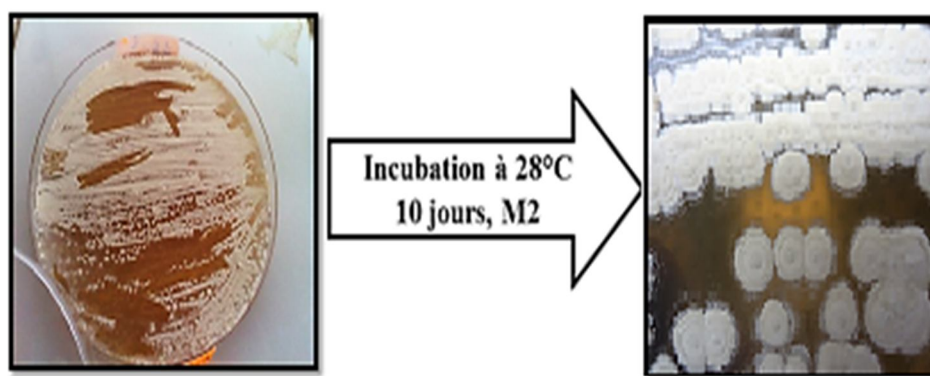
### 1.1. Matériel analytique

Le matériel analytique est présenté en annexe.

### 1.2. Matériel biologique

#### 1.2.1. Revivification de l'espèce *Streptomyces* sp. TKJ2

Elle est réalisée par un repiquage sur milieu M2 (Williams et Kester, 1964) à base de la caséine (annexe I) dans les conditions d'asepsie par touches, et incubées à 28°C pendant 10 jours.



**Figure 01** : Les étapes de revivification de l'espèce *Streptomyces* sp. TKJ2

#### 1.2.2. Préparation des pré-cultures

Des pré-cultures de 3mL de milieu M2 à base de caséine ont été préparées dans des tubes à essai. L'incubation a été effectuée à 28°C avec agitation manuelle pendant 3 jours.

Ces pré-cultures servent à ensemercer des erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de milieu de culture M2. Le milieu est incubé à 28°C avec agitation manuelle pendant 5 jours.

## Matériel et méthode

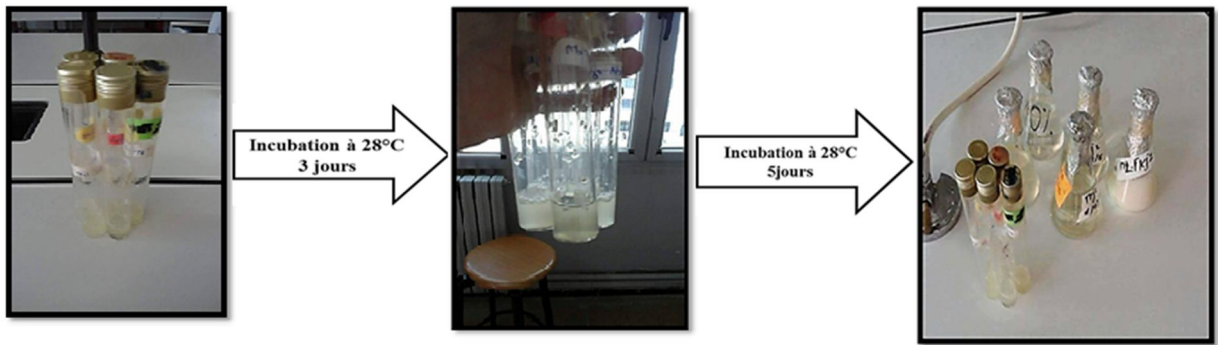


Figure 02 : Préparation des pré-cultures.

### 1.2.3. Extraction des enzymes

Après 10 jours d'incubation sur milieu liquide à base de caséine, le surnageant a été obtenu par centrifugation à 8000 rpm pendant 10 min.

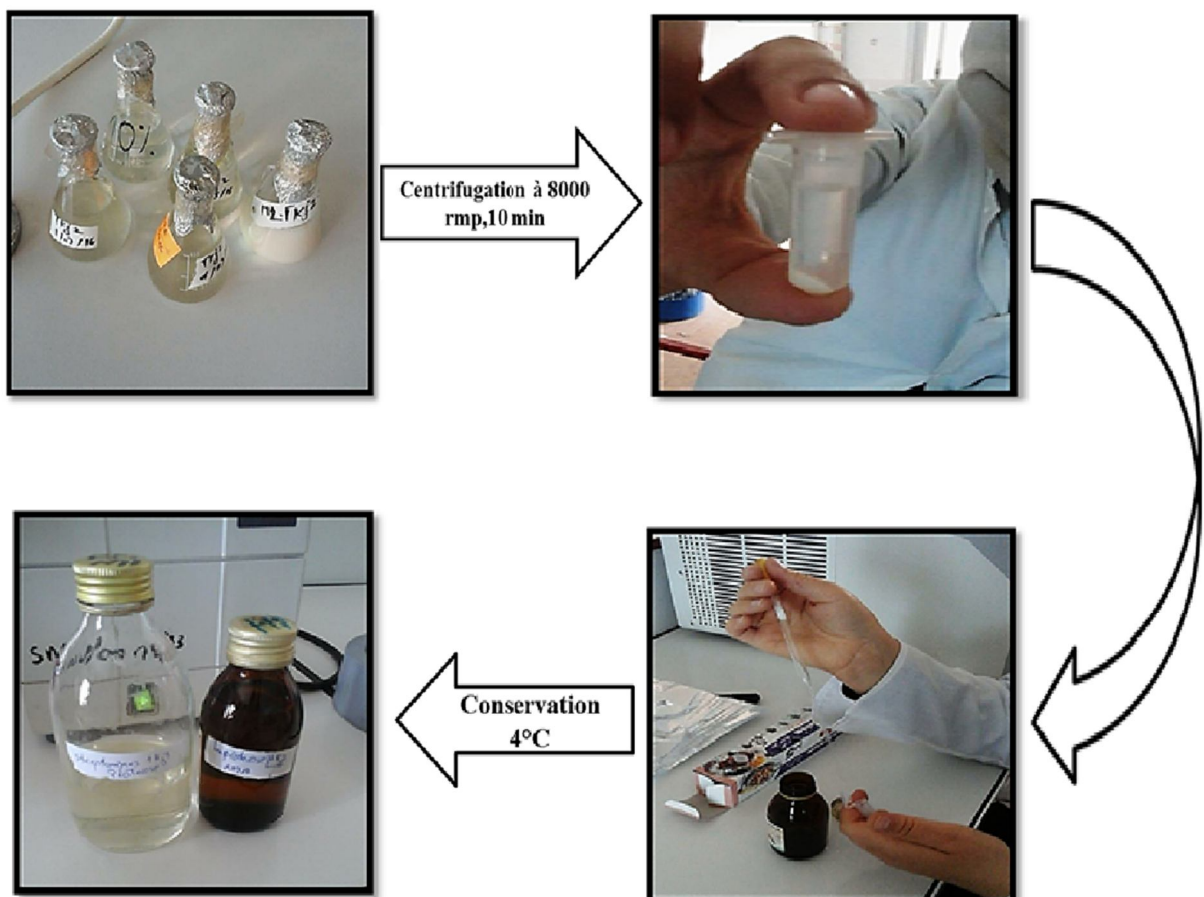


Figure 03 : Extraction des enzymes.

## 1.3. Dosage de l'activité enzymatique

Trois tubes contenant 0.5 ml d'enzymes (filtrat de culture) ont été préparés avec 0.5 ml de caséine 1% dans tampon phosphate 0.2M, pH7 (annexe III).

L'incubation du milieu réactionnel a été réalisée à 50°C pendant 5 heures et 30min, parallèlement le témoin a été préparé dans les mêmes conditions en absence d'enzyme.

La réaction enzymatique a été arrêtée par l'addition de 0.5ml de TCA à 10% (annexe III), La concentration des acides aminés a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm (Jaouadi *et al.*, 2008).

### 1.3.1. Effet de pH

Le pH optimum de l'activité enzymatique est déterminé par la mesure de la concentration des protéines de mélange réactionnel à des pH du tampon variant de 5 à 8, La concentration des acides aminés a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm (Jaouadi *et al.*, 2008).

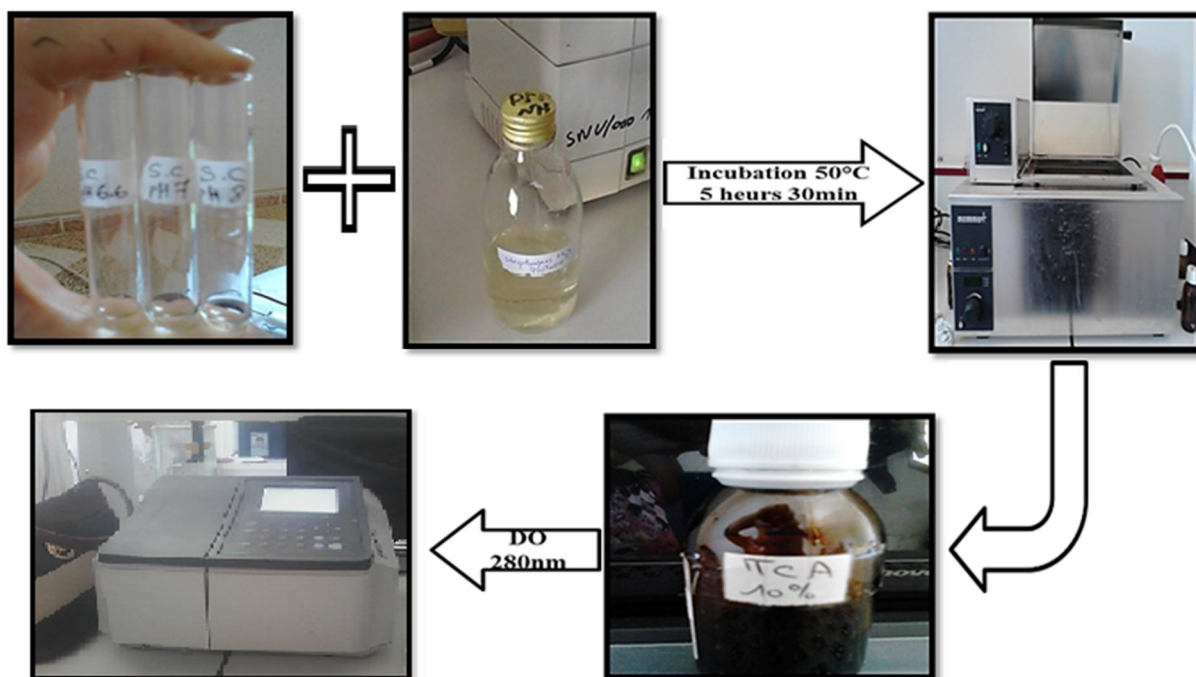


Figure 04 : Effet de pH.

# Matériel et méthode

## 1.3.2. Effet de température sur l'activité enzymatique

La détermination de la température optimale d'activité enzymatique est déterminée par la mesure de la concentration des protéines de mélange réactionnel incubé à des températures variant de 30 à 70°C, La concentration des acides aminés a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm (Jaouadi *et al.*, 2008).

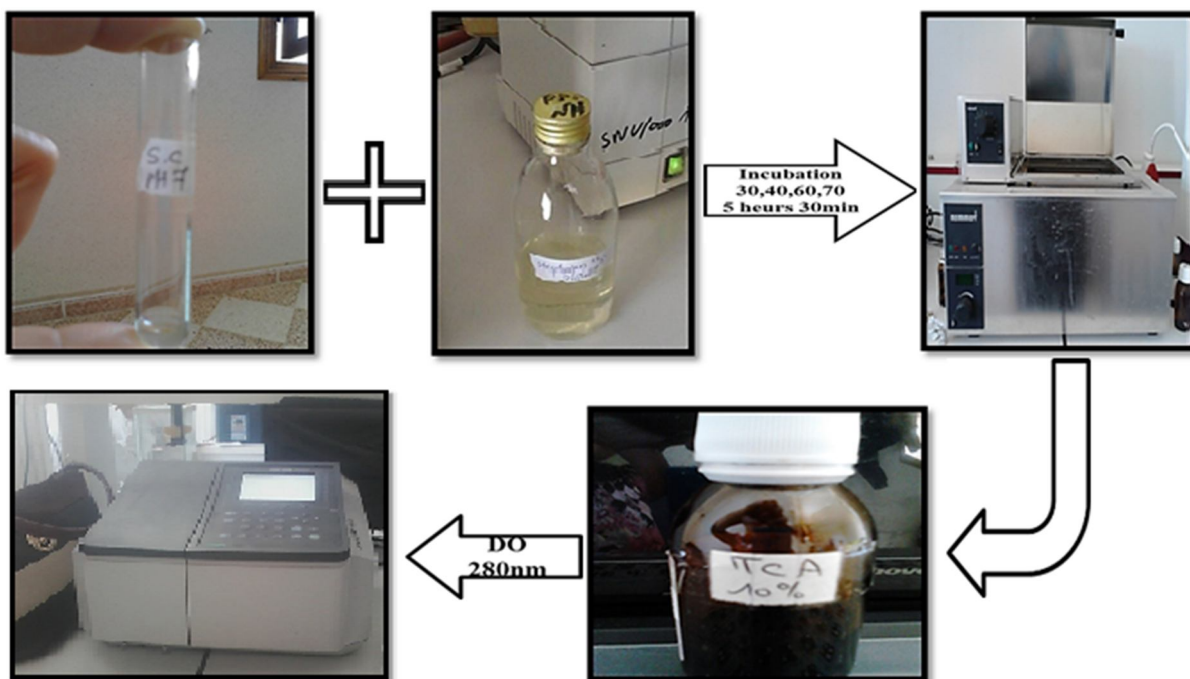


Figure 05 : Effet de température.

## 1.3.3. Effet des ions

Les ions métalliques : NaCl, SDS, CaCl<sub>2</sub>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, KCl, Fe<sup>2+</sup> sont testés à une concentration de 5 mM. Les ions sont additionnés à la solution caséine 1 % (annexe III) ; l'incubation du milieu réactionnel a été réalisée à 60°C pendant 5 heures et 30min, La concentration des acides aminés a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm (Jaouadi *et al.*, 2008).

## Matériel et méthode

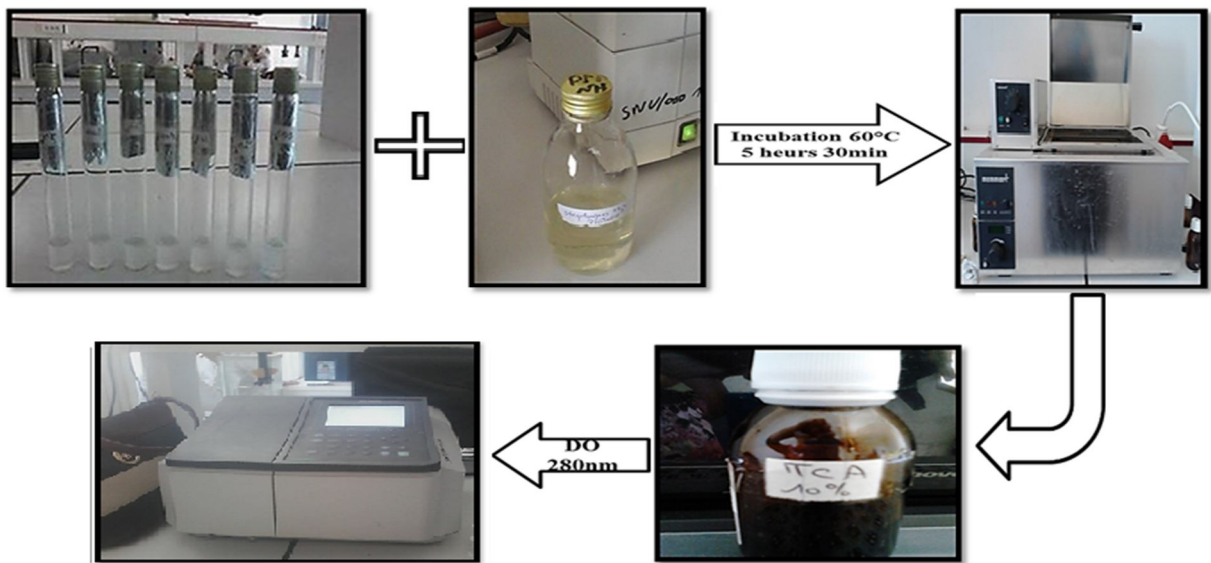
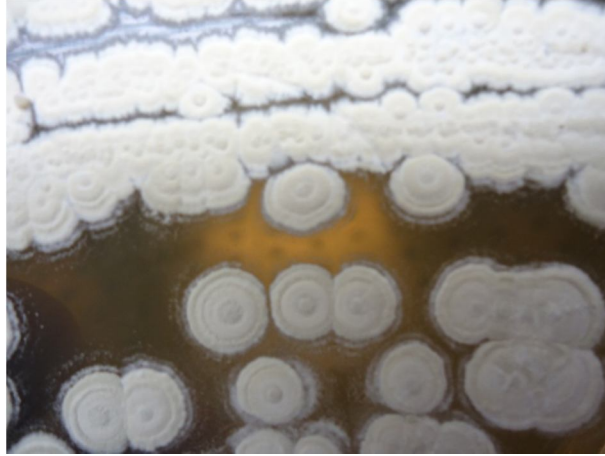


Figure 06 : Effet des ions.

*Chapitre III*  
*Résultats &*  
*Discussion*

### 1. Revivification de la souche TKJ2

Les colonies de la souche *Streptomyces* sp. TKJ2 sont sèches, colorées, adhérant au milieu gélosé et présentant un mycélium aérien et un mycélium végétative (**Figure 01**).



**Figure 07:** Aspect des colonies de l'isolat « TKJ2 » sur le milieu M2 après incubation de 7 jours à 28°C.

### 2. Caractérisation des protéases produites

Les protéases sont des enzymes essentielle dans les différentes applications industrielle, biotechnologique, médicale et dans les domaines de recherche (**Coral et al., 2003; Sandhya et al., 2005**). Elles sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (**Gupta et al., 2002; Sandhya et al., 2005**).

Le présent travail, s'inscrit dans le cadre de la caractérisation des protéases produite par la souche *Streptomyces* sp. TKJ2, les paramètres étudiés sont : le pH, la température, ainsi que les ions métalliques.

#### 2.1. Effet de pH sur l'activité enzymatique

Le résultat des concentrations protéiques est présenté dans le tableau II, et cela à partir d'une courbe d'étalonnage (Annexe IV).

## Résultats et discussions

Tableau IV : Densité optique des activités enzymatiques en fonction du pH

Solutions	Solution caséine pH5.2	Solution caséine pH6.6	Solution caséine pH7	Solution caséine pH8
DO Témoin	0.515	0.541	0.762	2.880
DO Teste	0.639	0.971	1.367	2.939

- D'après la courbe d'étalonnage on obtient les résultats suivants :

Formule:  $Y = 1.0175 X - 0.0711$

$$X(\text{pH } 5.2) = \frac{Y-0.0711}{1.0175} = \frac{0.124-0.0711}{1.0175} = 0.054 \text{ mg/ml d'acides aminées}$$

$$X(\text{pH } 6.6) = \frac{Y-0.0711}{1.0175} = \frac{0.43-0.0711}{1.0175} = 0.360 \text{ mg/ml d'acides aminées}$$

$$X(\text{pH } 7) = \frac{Y-0.0711}{1.0175} = \frac{0.605-0.0711}{1.0175} = 0.535 \text{ mg/ml d'acides aminées}$$

$$X(\text{pH } 8) = \frac{Y-0.0711}{1.0175} = \frac{0.059-0.0711}{1.0175} = -0.010 \text{ mg/ml d'acides aminées}$$

L'activité enzymatique maximale est de 0.526 mg/ml à pH7 après 5 h 30 min d'incubation.

Pour les pH 6.6 et 5.2 on a trouvé des concentrations en acide aminée qui sont respectivement de 0.360 mg/ml et 0.054mg/ml.

Pour le pH 8 aucune activité enzymatique n'a été trouvée.

Le résultat a montré que le pH optimal d'activité de la souche *Streptomyces sp.*TKJ2 se situe à pH 7, ce résultat est très proche du pH optimal de la protéase neutre produite par plusieurs actinomycètes le même que celui rapporté par (Vishwanatha et al., 2009). Ce résultat est très proche du pH optimal de la protéase neutre produite par plusieurs moisissures. En effet, les protéases neutres d'*Aspergillus oryzae* présentent des pH optimums de 7 (Sekine, 1972; Benkahoul, 2002; Sumantha et al., 2005) ; et entre 6,0 et 7,0 pour les travaux réalisés par Battaglino et al., (1991) et de 7,2 pour les protéases caractérisé par Boukhalifa (2003).



## Résultats et discussions

---

Chaque enzyme possède un pH optimal auquel la vitesse de la réaction catalysée est maximale. Des légères variations du pH autour de cette valeur entraînent une diminution de l'activité enzymatique, en raison des modifications de l'ionisation des groupements compris dans le site actif de l'enzyme. Des déviations plus importantes du pH, conduisent à dénaturer l'enzyme en modifiant l'ionisation des acides aminés et en rompant les interactions non covalentes maintenant sa structure tridimensionnelle (Hames et al., 2006).

### 3.2. Effet de température sur l'activité enzymatique

Les résultats de l'effet de la température sont présentés dans le tableau III.

**Tableau V** : Densité optique des activités enzymatiques en fonction de la température

Température°C	30	40	50	60	70
DO Témoin	0.501	0.563	0.762	0.503	1.321
DO Teste	0.407	0.550	1.367	1.797	1.238

- D'après la courbe d'étalonnage on obtient les résultats suivants :

**Formule:**  $Y = 1.0175 X - 0.0711$

$$X(50^{\circ}\text{C}) = \frac{Y - 0.0711}{1.0175} = \frac{0.605 - 0.0711}{1.0175} = 0.535 \text{ mg/ml d'acides aminés}$$

$$X(60^{\circ}\text{C}) = \frac{Y - 0.0711}{1.0175} = \frac{1.294 - 0.0711}{1.0175} = 1.224 \text{ mg/ml d'acides aminés}$$

L'activité enzymatique maximale est de 1.224mg/ml à la température de 60°C après 5 h 30 min d'incubation.

Pour la température d'incubation 50°C, la concentration en protéines est de 0.535 mg/ml.

Pour les températures d'incubation 30°C, 40°C et 70°C aucune activité proteasique n'a été trouvée.

L'effet maximal de la température sur l'activité enzymatique est de 60°C, quelques protéases fongiques présentent des optimum de température de 60°C (Singh et al., 1994; Chellappan et al., 2006). Au-delà, l'enzyme perd son activité ; elle est inactivée

## Résultats et discussions

---

complètement à 80°C, indiquant une dénaturation de l'enzyme par modification de la structure tertiaire (Scriban, 1993).

### 3.3. Effet des ions métalliques et les réactifs chimiques

L'effet des ions métalliques sont présentés dans le tableau VI

**Tableau VI** : les résultats de la lecture spectrophotométrique pour les ions métalliques et les réactifs chimiques

Ions métalliques	Nacl	SDS	Cacl <sub>2</sub>	Kcl	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>
DO Témoin	0.752	0.559	0.845	0.812	0.763	0.794	0.860
DO Teste	1.335	2.020	2.189	1.443	1.676	1.721	1.566

- D'après la courbe d'étalonnage on obtient les résultats suivants :

**Formule:**  $Y = 1.0175 X - 0.0711$

$$X(\text{Solution caséine} + \text{Nacl}) = \frac{Y - 0.0711}{1.0175} = \frac{0.583 - 0.0711}{1.0175} = 0.513 \times 5 = 2.565 \text{ mg/ml d'acides aminés}$$

$$X(\text{Solution caséine} + \text{SDS}) = \frac{Y - 0.0711}{1.0175} = \frac{1.461 - 0.0711}{1.0175} = 1.391 \times 5 = 6.955 \text{ mg/ml d'acides aminés}$$

$$X(\text{Solution caséine} + \text{Cacl}_2) = \frac{Y - 0.0711}{1.0175} = \frac{1.344 - 0.0711}{1.0175} = 1.274 \times 5 = 6.37 \text{ mg/ml d'acides aminés}$$

$$X(\text{Solution caséine} + \text{Kcl}) = \frac{Y - 0.0711}{1.0175} = \frac{0.631 - 0.0711}{1.0175} = 0.561 \times 5 = 2.805 \text{ mg/ml d'acides aminés}$$

$$X(\text{Solution caséine} + \text{Mg}^{2+}) = \frac{Y - 0.0711}{1.0175} = \frac{0.913 - 0.0711}{1.0175} = 0.843 \times 5 = 4.215 \text{ mg/ml d'acides aminés}$$

$$X(\text{Solution caséine} + \text{Mn}^{2+}) = \frac{Y - 0.0711}{1.0175} = \frac{0.927 - 0.0711}{1.0175} = 0.857 \times 5 = 4.285 \text{ mg/ml d'acides aminés}$$

## Résultats et discussions

$X(\text{Solution caséine} + \text{Fe}^{2+}) = \frac{Y-0.0711}{1.0175} = \frac{0.706-0.0711}{1.0175} = 0.636 \times 5 = 3.18 \text{mg/ml d'acides aminés.}$

**Tableau VIII :** Effet des ions métalliques et réactifs chimiques sur l'activité enzymatiques

Ions métalliques	Activité relative(%)
Aucun	100
Nacl	209.55
SDS	568.21
Cacl <sub>2</sub>	520.42
Kcl	229.16
Mg <sup>2+</sup>	344.36
Mn <sup>2+</sup>	350.08
Fe <sup>2+</sup>	259.80

Les résultats montrent que l'ion Cacl<sub>2</sub>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Nacl stimule fortement l'activité enzymatique avec une activité relative qui sont respectivement de 520.42%, 350.08%, 344.36%, 259.8%, 229.16%.

L'effet des ions métalliques et les réactifs chimiques sont très importante pour les applications industrielles car ils sont connus pour leurs effets sur la production et l'activité des enzymes (**Rani et al., 2004; Kotchoni et al., 2006**). Les ions métalliques agissent comme des cofacteurs ou inhibiteurs des enzymes (**Jabbar et al., 2008**).

Les ions métalliques peuvent influencer fortement l'activité enzymatique, en effet les résultats expérimentaux indiquent que l'activité enzymatique de la souche *Streptomyces*sp.TKJ2est fortement stimulée par les ions Cacl<sub>2</sub>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> (**Begum et Absar, 2009; Yin et al., 2010**).Des activités plus élevéeen présence d'ions Mn<sup>2+</sup>sont observées dans d'autres études pour les endoglucanases de *Anabaena laxa*(**Gupta et al., 2012**) et de *Daldinia schscholzii* (**Karnchanatat et al., 2008**).

Les ions calcium modulent les activités d'un large éventail de systèmes biochimiques. Cela s'explique par les nombreuses liaisons qui s'établissent entre les systèmes enzymatiques

## *Résultats et discussions*

---

et les ions, ce qui conduit à l'amélioration de la stabilité des liaisons peptidiques en créant un environnement protecteur contre les facteurs extérieurs (**Sharma et al., 1998**).

# *Conclusion*

### Conclusion générale

Les protéases occupent la position la plus pertinente parmi les enzymes industrielles en raison de leurs nombreuses applications. Leur part sur le marché mondial des enzymes industrielles est estimé en 2018 à 7,1 milliards de dollars.

L'objectif de ce travail est la recherche de nouvelles protéases et la caractérisation de protéases d'origine bactérienne ayant un intérêt industrielle. Pour cela, l'activité protéolytique a été extraite d'espèce *Stréptomyces sp TKJ2*, ont montré une richesse en protéases, ce qui explique leur utilisation dans la fabrication de détergents.

Les conditions optimales de l'activité enzymatique des protéases ont été déterminées sur la solution de caséine à 1%; elles correspondent aux paramètres suivants : température de 60°C, pH 7 (protéase neutre).

L'activité enzymatique est augmentée par  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{NaCl}$  avec une activité relative de 520.42%.

Ce travail a montré la richesse de la souche *Stréptomyces sp TKJ2*. Il nécessite une poursuite afin de mieux caractériser leurs protéases, et ainsi déterminer ses propriétés industrielles, biotechnologiques, pharmaceutiques ou autres.

*Références*  
*Bibliographiques*

# Références bibliographiques

---

## Références bibliographiques

**Agrawal D., Patidar P., Banerjee T. and Patil S. (2005).** Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 40: 1131-1136.

**Anderson A.S. and Wellington E.M.H. 2001.** The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 797–814.

**Aguilar C. N., Gerardo G.-S., PLilia A., Raul R.-H., José M.-H. and Juan C.-E. (2008).** Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4 (4): 354-366.

**Barnali R. B., Ajit B. K. and Manas D. (2008).** Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB100 grown on fish scale. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:449–455.

**Battaglino R. A., Huergo M., Pilosof A. M. R., Bartholomai G.B. (1991).** Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35 : 292–296.

**Begum M. F and Absar N (2009).** Purification and characterization of intracellular cellulase from *Aspergillus oryzae* ITCC-4857.01. *Microbiol.* **37(2)**: 121–127.

**Belitz H.-D., Grosch W. and Schieberle P. (2009).** Food chemistry. 4ème Ed Springer Verlag Berlin, P.1070.

**Benedykt W. and Katarzyana P. (2008).** Regulation of bacterial protease activity. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 13: 212-229.

**Benkahoul M. (2002).** Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur déchets d'oranges. Optimisation du milieu de cultures, purification partielle et étude des propriétés physico-chimiques de l'enzyme. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université Mentouri Constantine.

**Bérdy J. 2005.** Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58(1): 1–26.

**Boukhalfa H. (2003).** Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* cultivée sur milieu à base de déchets de tomates. Optimisation de milieu de culture et étude des



## Références bibliographiques

---

caractéristiques de l'extrait enzymatique. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université Mentouri Constantine.

**Channe P. S. and Shewale J. G. (1998).** Influence of culture condition on the formation of milk-clotting protease by *Aspergillus niger* MC4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 11-15.

**Chellappan S., Jasmin C., Soorej Basheer M., Elyas K. K., Sarita Bhat G. and Chandrnasekaran M. (2006).** Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41: 956-961.

**Chitte R.R., Nalawade V.K. and Dey S. 1999.** Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 131-136.

**Coral G., Arikan B., Ünalı M. N. and Güvenmez H. (2003).** Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of Microbiology*, 53 (4): 491-498.

**Demain A.L. and Solomon N.A.1985.** Biology of industrial microorganisms. Edition: The Benjamin/ Commings Publishing Company, London, p. 291–357.

**George S., Raju V., Krishnan M.R.V., Subramanian T.V. and Jayaraman K. (1995)** Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. *Process. Biochem.*, 30: 457-46.

**Guerra N. P. and Pastrana L. (2003).** Enhancement of nisin production by *Lactococcus lactis* in periodically re-alkalized cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38: 157-167.

**Guo J.-P. and Ma Y. (2008).** High level expression, purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 58: 301-308.

**Gupta A., Roy I., Khare S. K. and Gupta M. N. (2005).** Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Journal of Chromatography*, 1069: 155-161.

## Références bibliographiques

---

- Gupta R., Beg Q. K. and Lorenz P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 15-32.
- Hames B. D., Hooper N. M et Houghton J. D. (2006).** L'essentiel en biochimie. Ed BERTI Editions, paris. p. 413.
- Hernández M. S., Marilú R., Nelson P. G. and Renato P. R. (2006).** Amylase production by *Asprgillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, 73: 93-100.
- Kocabiyik S. and Özel H. (2007).** An extracellular-pepstatin insensitive acid protease produced by *Thermoplasma volcanium*. *Bioresource Technology*, 98: 112-117.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. 1994.** Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 2340–2343.
- Jabbar A., Rashid M.H., Javed M.R., PerveenR., Malana M.A (2008).** Kinetics and Thermodynamics of a novel endoglucanase (CMCase) from *Gymnoascus citrine* Produced under solid-state condition. *J.Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**:515–524.
- Koka R. and Weimer B. C. (2000).** Investigation of the ability of a purified protease from *Pseudomonas fluorescens* R098 to hydrolyze bitter peptides from cheese. *Industrial Dairy Journal*, 10: 75-79.
- Horikichi K., 1999:** Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 735-750.
- Katsifas E.A., Giannoutsou E.P. and Karagouni A.D. 1999.** Diversity of streptomycetes among specific greek terrestrial ecosystems. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 48–51.
- Kotchoni S.O., Gachomo E.W., Omafuvbe B.O., Shonukan O.O (2006).** Purification and biochemical characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from a catabolite repression insensitive mutant of *Bacillus pumilus*. *Int. J. Agri. Biol.* **8 (2)**: 286–292.
- Kumar D. and Bhalla T. C. (2005).** Microbial proteases in peptide synthetics: approaches and applications. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 68: 726-736.
- Lacey J., 1997:** Actinomycetes in composts. *Ann. Agr. Env. Med* **4**, 113-121.

## Références bibliographiques

---

- Lopes A., Coelho R. R., Meirelles M. N. I., Branquinha M. H. & Vermelho A. B., 1999 :** Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*. Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* **94**, 763-770.
- Mason M.J., Ishizawa K., Silkstone G., Nicholls P. and Wilson M.T. 2001.** Extracellular heme peroxidases in actinomycetes: a case of mistaken identity. *Appl. Env. Microbiol.* **67**(10): 4512–4519.
- Mei C. and Jiang X. (2005).** A novel surfactant and oxidation-stable alkaline protease from *Vibrio metschnikovii* DL33-51. *Process Biochemistry*, **40**: 2167-2172.
- Merheb Carolina W., Cabral H., Gomes E. and Da-Silva R. (2007).** Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, **104**: 127-131.
- Mukherjee A. K., Adhikari H. and Rai S. K. (2008).** Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrical* grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*, **39**: 353-361.
- Neelakantan S., Nohanty A. K. and Kaushik J. K. (1999).** Production and use of microbial enzymes for dairy processing. *Current Sciences*, **77**: 143-148.
- Ogino H., Tsuchiyama S., Yasuda M. and Doukyu N. (2010).** Enhancement of the aspartame precursor synthetic activity of an organic solvent-stable protease. *Protein Engineering Design & Selection*, doi:10.1093/protein/gzp086.
- Petinate S.D.G., Martin R.M., Coelho R.R.R., Meirelles M.N.L., Branquinha M.H. and Vermelho A.B. 1999.** Influence of growth medium in proteinase and pigment production by *Streptomyces cyaneus*. *Mémoire de l'institut Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **91**(6): 755–760.
- Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. and Deshpande V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62** (3): 597-653.
- Rani D.S and Thirumade S.N.K (2004).** Production of cellulase by *Clostridium papyrosolvans* CFR-703. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 629 – 632.

## Références bibliographiques

---

**Rashbehari T., Binita S. and Rintu B. (2003).** Purification and characterization of a protease from solid-state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*, 38: 1553-1558.

**Rawlings N. D., Barrett A. J. and Woessner J. F. (1998).** Handbook of proteolytic enzymes, Ed Academic press, P. 1665.

**Reed G. (1975) Enzymes in Food Processing, 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press, Orlando.**

**Reddy L. V., Wee Y.-J., Yun J.-S. and Ryu H.-W. (2008).** Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus sp.* RKY3 through Plackett Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology*, 99: 2242-2249.

**Reddy T.V.K., Mahmood S., Mohammed Idris M. and Ciesielski S. 2010.** *Streptomyces osmaniensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1755–1759.

**Rivas R., Sanchez M., Trujillo M.E., Zurdo-Pineiro J.L., Mateos P.F., Martinez-Molina E. and Valazquez E. 2003.** *Xylanimonas cellulosityca* gen. nov., sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from a decayed tree (*Ulmus nigra*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 99–103.

**Roukas T. (1999).** Pullulan production from brewery wastes by *Aureobasidium pullulans*. *World Journal and Biotechnology*, 15: 447-450.

**Saci A., 2012 :** Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Thèse de magister ; Université Mentouri Constantine, 10.

**Sandhya C., Sumantha A., Pandey A. (2004).** Proteases. In: *Enzyme Technology*, A. Pandey, C. Webb, C.R. Soccol, C. Larroche (Eds.), *Asiatech Publishers Inc.*, New Delhi, (India) pp. 312–325.

**Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G. and Pandey A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40: 2689-2694.

## Références bibliographiques

---

**Sandro G., Ashok P., Clarice A. O., Saul N. R. and Carlos R. S. (2003).** Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 246-251.

**Sanglier J.J. et Trujillo M. 1997.** Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souche. *Bult. Soc. Fr. Microbiol.* 12(3): 269–276.

**Sarrouh B., Santos T. M., Miyoshi A., Dias R. & Azevedo V . (2012).** Upto- date insight on industrial enzymes applications and global market. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, S4:002.

**Sekine H. (1972).** Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae*. Some enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.*, 36 :207-216.

**Singh A., Ghosh V. K., Ghosh P. (1994).** Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters Appl. Microbiol.*, 18 : 177-180.

**Stackebrandt E. and Schumann P. 2006.** Introduction to the taxonomy of actinobacteria. *Prokaryotes*, 3: 2 97 321.

**Sterner R. & Liebl W., 2001:** Thermophilic adaptation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36, 39-106.

**Sumantha A., Larroche C. and Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food- grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2): 211-220.

**Sumantha A., Sandhya C., Szakacs G. and Pandey A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 40. 2689-2694.

**Vishwanatha K. S., Appu Rao A. G. and Singh S. A. (2009).** Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114: 402-407.

**Wang R., Law Sing R. C. and Webb C. (2005).** Protease production and condition by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry*, 40: 217-227.

## Références bibliographiques

---

**Wang S. L., Yang C.-H., Liang T.-W. and Yen Y.-H. (2008).** Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001. *Bioresource Technology*, 99: 3700-3707.

**Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M.E., Ludwig, W. and Suzuki K.-I., (Eds.). 2012.** Bergey's manual of systematic bacteriology. The Actinobacteria, Part A. Volume 5, 2nd edition, Springer New York, Dordrecht Heidelberg London.

**Wilkesman J. and Kurz L. (2009).** Protease Analysis by Zymography: A review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnology*, 3: 175-184.

**Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H, Sneath P.H.A. and Sachin M.J. 1983.** Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1743–1813.

**Williams S.T., Wellington E.M.H., Goodfellow M., Alderson G., Sachin M. and Sneath P.H.A. 1981.** The genus *Streptomyces*-a taxonomic enigma. *Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A Suppl.* 11: 45–57.

**Williams S.T., Goodfellow M. and Alderson G. 1989.** Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici, 1943, 339AL. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 4, p. 2452–2492.

**Xiao J., Wang Y., Luo Y., Xie S.-J., Ruan J.-S. and Xu J. 2009.** *Streptomyces avicenniae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a rhizosphere of the mangrove plant *Avicennia maritima*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2624–2628.

**Yang J. K., Shih I. L., Tzeng Y. M. and Wang S. L. (2000).** Production and purification of a protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 406-413.

**Zaitlin B., Watson S.B., Ridal J., Satchwill T. and Parkinson D. 2003.** Actinomycetes in lake Ontario: habitats and geosmin and MIB production. *Peer-Review J.* 95(2): 113–118.

**Zaraï Jaouadi N., Rekik H., Badis A., Trabelsi S., Belhoul M., Benkiar Yahiaoui A., Ben Aicha H., Toumi A., Bejar S. & Jaouadi B., 2013 :** Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities. *PLoS One* 10, 767-22.

## *Références bibliographiques*

---

**Zermane F., 2008** : Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques, et des composés organiques de la synthèse. Thèse de magister ; Université Mentouri Constantine, 49.

**Zhao X.-Q., Li W.-J., Jiao W.-C., Li Y., Yuan W.-J., Zhang Y.-Q., Klenk H.-P., Suh J.-W. and Bai F.-W. 2009.** *Streptomyces xinghaiensis* sp. nov., isolated from marine sediment. Int. J.Syst. Evol. Microbiol. 59: 2870–2874.

# *Annexe I*

---

## **Matériel**

1. Etuve (Incubateur)
2. Autoclave
3. Centrifugeuses réfrigérées
4. Bain Marie
5. Spectrophotomètre UV/VIS 820 nm
6. Agitateurs magnétiques
7. Balance
8. Balance de précision
9. pH mètre



## *Annexe II*

---

### **Composition des milieux de cultures (g/L)**

#### **a) Milieu M2 « William's et Kester 1964 »:**

-Amidon soluble.....	10g
-KNO <sub>3</sub> .....	02g
-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	02g
-Nacl .....	02g
-Caséine .....	0.3g
-MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O) .....	0.05g
-CaCO <sub>3</sub> .....	0.02g
-Fe SO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O) .....	0.01g
-Agar.....	18g
-Eau distillé .....	1000 ml

pH du milieu 7.2

L'autoclavage a été effectué à 120°C pendant 20 min. Le milieu a été coulé dans les boites de Pétri à raison de 15ml/boite qui seront utilisées pour le repiquage de la souche.

#### **b) Milieu liquide à base de caséine:**

-Lait écrémé.....	10g
-Eau distillé.....	90ml

Après l'autoclavage pendant 15min à 110°C, 10 ml de ce milieu ont été ajouté à 100 ml du milieu M2 contenant l'agar, le même milieu a été également préparé mais sans agar (milieu liquide) dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100ml du milieu de culture.

## Annexe III

---

### Préparation des solutions

#### a) TCA à 10%

-Trichloroacétique .....10g

-Eau distillé .....100ml

#### b) Solution de caséine à 1%:

-Caséine .....0.5g

-Tampon phosphate .....50ml

#### c) Tampon phosphate (0.2M; pH7)

✓ Solution 1 : X = 0,2 M de solution de phosphate de sodium monobasique (27.8g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dans 1000 ml de l'eau distillée).

✓ Solution 2 : Y = 0.2 M de solution de phosphate de sodium dibasique (53.65g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ou 71.7g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  dans 1000 ml de l'eau distillée).

X ml de la solution 1 + Y ml de la solution 2 diluées dans un volume totale de 200 ml.

#### d) Tampon Citrate de Sodium (0,1M; pH 5,2)

✓ Solution A: acide citrique 21,01 g/l (0,1M), ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

✓ Solution B: le dissodique 35,6 g/l (0,2M), ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

Pour avoir une solution tampon à pH 5,2 mélanger: 46,9 ml de la solution A et (100 - 46,9) ml de la solution B.

#### e) Tampon phosphate (0.2M; pH 6.6)

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  (4.5mg  $\longrightarrow$  100 ml)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2.76 mg  $\longrightarrow$  100 ml)

#### e) Tampon phosphate-citrate (pH 8)

Préparer une solution d'acide citrique à 0.5M (1.10 ml) et une solution de phosphate de sodium disodique à 0.5M (soit 77.80ml).

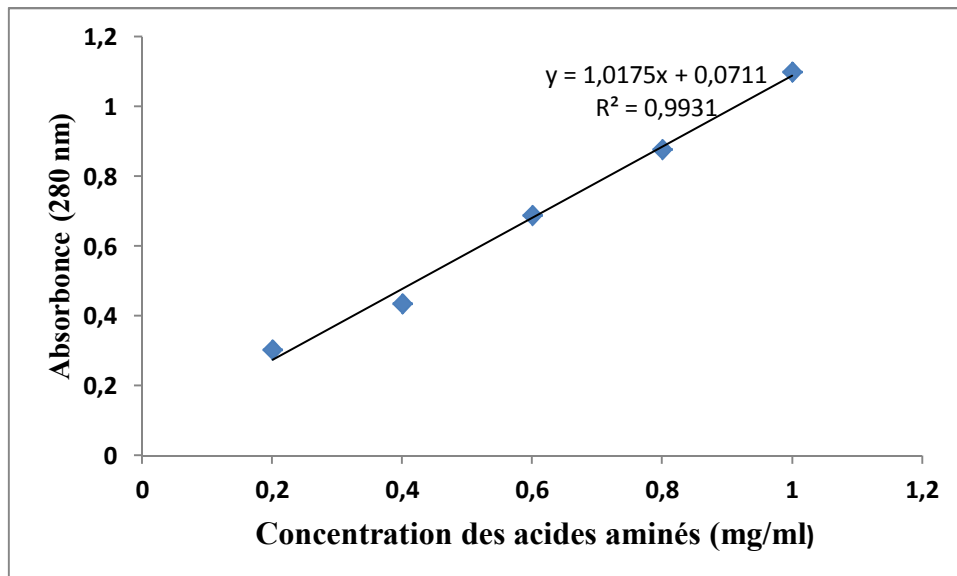
Mélanger et diluer dans 200 ml.

### Courbe d'étalonnage pour les acides aminés

La valine, méthionine, glycine, tryptophane ont été utilisés comme standards, une série de dilution décimale a été préparée (Tableau I).

**Tableau I:** La gamme d'étalonnage pour les acides aminés.

N° de tube	1	2	3	4	5
Solution d'acides aminés « ml »	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Tampon phosphate « ml »	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Les DO	0.304	0.436	0.689	0.879	0.879



**Figure 2 :** Courbe d'étalonnage des acides aminés.