

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Mémoire présenté en vue pour l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Microbiologie Générale.

Option: Biotechnologie des mycètes, fermentation et production de substances
fongiques.

Thème :

*Etude du potentiel de production des protéases par des souches
mycéliennes isolées des zones arides.*

Soutenue le: 25/06/2014

Présenté par :

GUENDOZ Fatima

BELIBEL Samah

Jury de soutenance :

Président : Mme MOSBAH F.

M.A.A. Université Constantine 1

Encadreur : Mme BOUCHERIT Z.

M.A.B. Université Constantine 1

Examineur : Melle LAHLAH F.

M.A.A. Université Constantine 1

Année Universitaire : 2013/2014

Remerciements

Nous exprimons tout d'abord, nos profonds remerciements et louanges à DIEU Tout Puissant, qui nous a guidé sur le droit chemin et nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Nous remercions très chaleureusement notre promotrice, Mme BOUCHERIT Z Maitre assistante à l' Université Constantine I pour ses orientation, son aide, sa rigueur scientifique et pour la confiance qu'elle nous accordé tout au long de cette étude.

Nous remercions également le: Mme MOSBAH FAWZIA pour son soutien pendant toutes nos années d'étude et pour avoir présidé le jury.

Nos vifs remerciements vont, également à Mme: Lahlah, examinatrice, d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer ce modeste travail.

Nos vifs remerciements vont, également, à tout le personnel du laboratoire de Biologie et Environnement, pour leur aide et surtout leur gentillesse.

Nous adressons nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. .

Sommaire

Introduction générale..... 1

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Les protéases

| | |
|---|---|
| 1. les enzymes..... | 2 |
| 2. Les enzymes protéolytiques | 2 |
| 2.1. Définition | 2 |
| 2.2. Sources..... | 2 |
| 2.2.1. Protéases d'origine végétale..... | 2 |
| 2.2.2. Protéases d'origine animale..... | 3 |
| 2.2.3. Protéases d'origine microbienne..... | 3 |
| 2.2.3.1. Protéases des moisissures | 3 |
| 2.2.3.2. Protéases des levures | 3 |
| 2.2.3.3. Protéases des bactéries..... | 3 |
| 3. Protéases halostables..... | 4 |
| 3.1. Définition..... | 4 |
| 3.2. Application industrielle..... | 4 |
| 3.2.1. Applications chimiques..... | 4 |
| 3.2.2. Application alimentaire..... | 4 |
| 3.2.3. Détergents | 4 |
| 3.2.4. 3.2.4. Traitement des eaux..... | 4 |

Chapitre 2 : Les moisissures

| | |
|---|----|
| 1. Généralités | 6 |
| 2. Classification | 6 |
| 2.1. Zygomycètes | 6 |
| 2.2. Ascomycètes | 6 |
| 2.3. Basidiomycètes..... | 7 |
| 2.4. Deutéromycètes | 7 |
| 3. Conditions de croissance | 7 |
| 3.1. Eléments nutritifs | 7 |
| 3.1.1. Source de carbone et d'énergie | 7 |
| 3.1.2. Source d'azote | 8 |
| 3.1.3. Eléments minéraux..... | 8 |
| 3.2. Facteurs physicochimiques | 8 |
| 3.2.1. Température | 8 |
| 3.2.2. Humidité | 8 |
| 3.2.3. pH | 8 |
| 3.2.4. Oxygène | 8 |
| 3.2.5. Lumière | 8 |
| 3.2.6. salinité | 8 |
| 4. Les organismes halophiles | 9 |
| 4.1. Définition | 9 |
| 4.2. Les moisissures halophiles | 10 |
| 4.3. Principaux groupes des moisissures halophiles..... | 10 |
| 4.4. Application biotechnologiques..... | 11 |

| | |
|---|-----------|
| 1. Matériel biologique..... | 12 |
| 1.1. Microorganismes | 12 |
| 1.2. Sélection des souches protéolytiques | 12 |
| 2. Méthodes de fermentation et de production | 12 |
| 2.1. Préparation du milieu de fermentation..... | 12 |
| 2.2. Ensemencement | 12 |
| 3. Suivi de la fermentation..... | 13 |
| 3.1. Récupération de l'extrait enzymatique | 13 |
| 3.2. Mesure des protéines totales | 13 |
| 3.3. Mesure de l'activité protéolytique | 13 |

Résultats et discussion

| | |
|---|-----------|
| 1. Mise en évidence de l'activité protéolytique | 14 |
| 2. Dosage des protéines totales et de l'activité enzymatique | 16 |

| | |
|------------------------|-----------|
| Conclusion..... | 22 |
|------------------------|-----------|

Références bibliographie

Annexe

RESUME

liste des tableaux

Tableau 1 : Catégories de moisissures selon la température de développement.

Tableau 2 : L activité enzymatique de l'extrait de la souche S₁.

Tableau 3 : L activité enzymatique de l'extrait de la souche S₈.

Tableau 4 : L activité enzymatique de l'extrait de la souche S₁₆.

Tableau 5 : L activité enzymatique de l'extrait de la souche S₁₉.

Liste des figures

Figure 1. Courbe étalon pour le dosage des protéines.

Figure 2. Courbe d'étalonnage pour le dosage de la tyrosine.

Figure 3 : Activité spécifique des souches sur caséine

Figure 4 : Activité spécifique des souches sur l'albumine

Figure 5 : Activité spécifique des souches sur l'ovalbumine

Figure 6 : Activité spécifique des souches sur l'hémoglobine.

Figure 7: l'activité spécifique des souches à pH=5.

Figure 8 : l'activité spécifique des souches à pH=7.

Figure 9: l'activité spécifique des souches à pH=9.

Liste d'abréviation

Rpm : Révolutions par minute.

Min: minute.

U : Unité.

µg : microgramme.

ml : milli litre.

M : Molaire.

N : Normalité.

al : Collaborateurs.

h : Heure

PDA: Potato Dextrose Agar.

introduction

Introduction

La microbiologie est qualifiée aujourd'hui de participant majeur dans plusieurs industries : pharmaceutiques, agroalimentaires et chimique (Demain, 2000). A cet effet, les moisissures disposent de possibilité d'applications biotechnologiques très étendues par leur capacité à conquérir des substrats naturels grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé dû à un patrimoine génétique particulier qui explique leur grande capacité d'adaptation (Bensmira, 2006). Cependant, l'industrie exige l'emploi d'enzymes halostables qui ont la capacité de supporter des concentrations en NaCl élevées. Pour répondre à cette exigence, l'isolement des moisissures de régions arides peut constituer une alternative intéressante permettant d'obtenir des souches productrices de ce type d'enzymes. En effet, plusieurs études ont été réalisées dans ce sens afin de sélectionner des souches révélant une potentialité intéressante (Bouchet *et al.*, 1999).

Dans cet objectif, on propose d'étudier la production des protéases par des moisissures locales isolées de milieu extrême Sebkha d'Ain Ezzmoul selon le protocole résumé ci-dessous.

- La sélection des souches protéolytiques sur milieu solide caséiné.
- La production des protéases par les souches sélectionnées sur milieu de fermentation liquide additionné de quatre substrats protéiques différents : la caséine, l'albumine, l'ovalbumine et l'hémoglobine à trois pH différents.
- Le dosage de l'activité protéasique exocellulaire et le dosage des protéines totales des extraits bruts.

Synthese bibliographique

Chapitre 1: Les protéases

1. les enzymes

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaire (Bergmeyer et *al.*, 1979; Pelmont, 1995; Drouin, 2005).

2. Les enzymes protéolytiques

2.1. Définition :

Les protéases ou les protéinases font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.X). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites extracellulairement comme intracellulairement (Kumar et *al.*, 2008).

2.2. Sources

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

2.2.1. Protéases d'origine végétale

Les protéases sont présentes chez toutes les espèces vivantes. Les végétaux ont, avant les microorganismes, été l'objet de recherche en vue d'isoler des enzymes protéolytiques, c'est le cas de la bromélaïne extraite de tige de l'ananas (*Ananas comosus*) (Rao et *al.*, 1998), la papaine en provenance du latex de fruit la papaye (*Carica papaya*). (Scriban, 1993 ; Pelmont,1995 ; Rao et *al.*, 1998) et la facine issue de la figue (*Ficus glabrata*) (Scriban.,1993).

2.2.2. Protéases d'origine animale

Seules les protéases sécrétées par l'estomac des ruminants présentent un intérêt Industriel comme la présure préparée à partir du quatrième estomac des veaux ainsi que les pepsines bovines et porcines. L'activité non spécifique des enzymes pancréatiques, trypsine et chymotrypsine, les rendent moins importantes que les enzymes gastriques (McKenzie, 1971 ; Alais, 1975 ; Scriban, 1999). Des études récentes permettent aussi l'identification des protéases chez les helminthes : *Schistosoma sp* ; *Fasciola sp* ; *Taenia sp* et *Haemonchus sp*, où elles apparaissent comme cibles potentielles majeures en thérapie et vaccination antiparasitaire (Trap et Boireau, 2000).

2.2.3. Protéases d'origine microbienne

L'incapacité des protéases végétales et animales à répondre aux exigences du monde industriel a conduit à un intérêt accru pour les protéases microbiennes (Mala et al., 1998). Ces dernières sont produites par une grande diversité de bactéries, les moisissures et les levures (Devi et al., 1998).

2.2.3.1. Protéases des moisissures

Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*....etc. Ce groupe d'enzymes dispose de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues et représentent 40 % du marché mondial des enzymes industrielles (Frazier, 1967 ; Ul-haq et al., 2003).

2.2.3.2. Protéases des levures

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

2.2.3.3. Protéases des bactéries

Il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et résiste bien à l'action des détergents. (Calk et al., 2000 ; Frazier, 1967). Les bactéries du lait et en

particulier *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* produisent des métalloprotéases utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage du fromages (Cousin et *al.*, 1982) ainsi que les protéases extracellulaires produite par *Streptococcus lactis* (Desmazeaud, 1978).

3. Protéases halostables

3.1. Définition

C'est également une grande famille de protéases, leur activité catalytique nécessite la présence des sels, sont des enzymes répandues chez le micro-organisme qui se trouvent dans les zones arides.

3.2. Application industrielle

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

3.2.1. Applications chimiques

Les détergents constituent l'application industrielle la plus importante des enzymes, les protéases représentent environ 60% du marché mondial où elles jouent un très grand rôle dans l'amélioration du pouvoir détergent d'une lessive ; elles sont capables de dissoudre les taches protéiques à basse température contrairement aux produits chimiques qui ne possèdent pas des propriétés équivalentes même à haute température (Garicia- Conesa et *al.*, 1999). Dans ce contexte, la subtilisine de *Bacillus* est l'une des enzymes les plus étudiées et les mieux connues, 80% de sa production étant dévolue à ce secteur. Plus de 50 de ces enzymes ont été identifiées et la séquence primaire de 40 d'entres elles est connue (Heslot, 1996 ; Garicia-Conesa et *al.*, 1999).

3.2.2. Application alimentaire

L'application des protéases à l'industrie alimentaire n'est pas récente. Pour la fabrication des fromages, seules les enzymes fongiques ont donné de bons résultats, souvent comparables à ceux obtenus avec la présure et la pepsine bovine et porcine.

Cependant, la majorité des préparations coagulantes provenant du règne végétal ont donné des résultats décevants car elles possèdent le plus souvent une activité protéolytique très élevée, qui se traduit par l'apparition d'inconvénients technologiques majeurs (Alais, 1975 ; Pepler et Perlman, 1979).

3.2.3. Détergents

À l'heure actuelle, l'industrie des détergents est la plus grande utilisatrice de protéases. Le marché des détergents est aujourd'hui un marché très large qui englobe les détergents pour usage domestique (détergents à lessive, détergents à vaisselle), les produits de nettoyage pour usage industriel et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le plus important marché au niveau des détergents est de loin celui des détergents à lessive (Rao et al., 1998). Les protéases jouent un rôle important dans l'efficacité des détergents. Dans les procédés de lavage, la chaleur, les conditions alcalines et la présence de surfactants et d'agents séquestrant vont suffire pour dissoudre ou disperser la plupart des saletés incrustées dans les tissus (Meunier, 1999).

Outre les protéases, les détergents peuvent contenir des lipases, des amylases et des cellulases. Néanmoins, les protéases sont les enzymes les plus utilisées dans les détergents.

La grande majorité sont des protéases sérines alcalines et halostables. En effet, les protéases doivent souvent agir à des pH et à des températures élevées, particulièrement dans le cas des détergents à lessive.

3.2.4. Traitement des eaux

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. En effet, les protéases peuvent traiter les rejets riches en protéines. Des essais effectués dans différentes industries alimentaires produisant des rejets riches en protéines ont donné des résultats très intéressants, qui permettent de constater le potentiel des protéases pour le traitement de ces déchets (Kumar et al., 2008).

Les protéases de restriction. Une application industrielle pour enzymes halostables est l'utilisation d'endonucléases de restriction pour des applications de biologie moléculaire.

Chapitre 2 : Moisissures.

1. Généralités :

Les moisissures peuvent être définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (Nicklin et *al.*, 2000). Certaines vivent en symbiose avec les végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux alors que certains sont des saprophytes se développant aux dépens des substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois, 1989 ; Leveau et Bouix, 1993). Les moisissures possèdent un appareil végétatif constitué par un thalle, le mycélium, dont les filaments s'appellent « hyphes ». Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, aux quels on accorde la dénomination globale de spores (Bourgeois, 1989).

2. Classification

La classification est basée sur la morphologie (structure du mycélium) et le mode de reproduction des moisissures (Davet, 1996). Ces derniers ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (Bourgeois, 1989).

2.1. Zygomycètes

Ces moisissures possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée endogènes (zygospores) (Guiraud, 1998). La famille la plus importante dans cette classe est celle des *Mucorales* qui comprennent un grand nombre de moisissures saprophytes mais aussi quelques espèces parasites des champignons, des animaux et des hommes et surtout des contaminants de nombreux produits alimentaires (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996).

2.2. Ascomycètes

Les Ascomycètes sont définis comme des champignons à thalle mycélien cloisonné dont le mode de reproduction est sexué avec des spores endogènes (ascospores). Cette classe regroupe de nombreux parasites des végétaux (Guiraud, 1998). Elles sont cependant plus

particulièrement nombreuses dans l'ordre des *Sphaeriales*, des *Microscuales* et des *Eurotiales*. Dont le genre le plus connu est *Endothia* et *Neurospora* (Bourgeois, 1998).

2.3. Basidiomycètes

Elles regroupent seulement certaines moisissures parasites. Elles sont caractérisées par un thalle à mycélium septé et une reproduction sexuée avec la formation de spores exogènes (basidiospores) c'est le cas de genre *Agaricus* et *Coprinus* (Botton et al., 1999).

2.4. Deutéromycètes

Egalement appelés champignons imparfaits, ils sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du thalle (Boiron, 1996). Cette classe regroupe les *Penicillium* et les *Aspergillus* et contient aussi un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium* et *Geotrichum* (Frazier, 1967; Punt et al., 2002).

3. Conditions de croissance

3.1. Eléments nutritifs

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu pour assurer leur croissance. Elles possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes. La digestion de ces derniers doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi (Davet, 1996).

3.1.1. Source de carbone et d'énergie

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin et al., 2000). Certaines d'entre elles produisent des lipases extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et acides gras qui peuvent être assimilés par beaucoup d'espèces fongiques, alors que seulement certaines espèces utilisent les acides organiques et l'éthanol (Boiron, 1996).

3.1.2. Source d'azote

La plupart des moisissures assimilent l'ammoniaque sous forme de sels (NH_4^+) alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (Punt et *al.*, 2000).

3.1.3. Eléments minéraux

La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (Uchicoba et *al.*, 2001). Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures (Boiron, 1996).

3.2. Facteurs physicochimiques :

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination.

3.2.1. Température

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois, 1989).

Les moisissures sont classées en quatre catégories selon la gamme de température à laquelle ils se développent (Tableau 1) (Boudih, 2011).

Tableau 1 : Catégories de moisissures selon la température de développement (Roquebert 1997).

| Types de champignons | Gamme de température | Température optimale |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| Mésophiles | 0 à 50°C | 15 à 30°C |
| Thermophiles | 20 à 50°C | 35 à 40°C |
| Thermotolérants | 0 à 50°C | 15 à 40°C |
| Psychrophiles | 0 à 20°C | 0 à 17°C |

En plus des catégories citées en tableau 1, il existe des moisissures qui se développent dans des conditions extrêmes. C'est le cas par exemple des thermorésistants pouvant se développer jusqu'à 80°C comme *Aspergillus fischeri* (Conner et Beuchat, 1987)

3.2.2. Humidité

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes (Davet, 1996). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (Bourgeois, 1989).

3.2.3. pH

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 – 8.0, bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acide. Cependant, les enzymes extracellulaires produites dans des milieux complexes peuvent avoir des optima de pH d'activité très différents (plus acides ou plus basiques) (Botton et al., 1999).

3.2.4. Oxygène

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeantes peuvent se développer en profondeur. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme (Bourgeois, 1989 ; Botton et al., 1999).

3.2.5. Lumière

Les radiations du spectre visible (380 – 720) n'ont en général pas d'action ni sur la croissance végétative des moisissures ni sur la germination de leurs spores mais peuvent agir sur la sporulation (Botton et al., 1999).

3.2.6. salinité

La présence de sel dans le milieu modifie certaines propriétés physicochimiques et détermine d'autres comme la conductivité et la pression osmotique.

La résistance des espèces halophiles à une concentration élevée en sel s'explique par leur capacité d'équilibrer la pression osmotique du milieu intracellulaire par rapport à celle du milieu extracellulaire.

4. Les moisissures halophiles

4.1. Définition

Ce sont des moisissures nécessitant la présence de sol(NaCl) dans le milieu pour leur croissance (Edgerton et brimlescome, 1981) Elles peuvent être classées selon le degré de leur besoins en sel (Shiladitya et *al.*, 2012 ; Pitt et Hocking ,2009)

- **Non halophiles** : ne tolèrent pas de 0.2 m de NaCl.
- **Halotolérants** : tolèrent de 0.2à0.85 M de NaCl (2-5%).
- **Halophiles** : modères supportent des concentrations en NaCl allant de 0,85 jusqu'a 3,5 M (5-20%).
- **Halophiles extrêmes** : croissent dans l intervalle de 3,4 a5, 1M (20-30%) (Tourriche ; 2013).

4.2. Principaux groupes des moisissures halophiles

Environnements extrêmes ont longtemps été considérées comme des zones hypersalines caractérisés par des concentrations extrêmes de NaCl élevée, des nombreuses nouvelles espèces fongique et des espèces déjà connus seulement comme contaminants alimentaires ont été découverts dans les zones hyper saline (Gunde-Cimerman et *al.*, 2009).

- **Les ascomycètes** dont les ordres les plus importants sont
 1. Capnodiales.
 2. Dothideales.
 3. Eurothiales.
- **Les basidiomycètes** avec leurs 3 principaux ordres
 1. Trichosporales.
 2. Sporidiales.
 3. Wallemiale (Boucherit, 2011).

4. 4. Application biotechnologiques

Certaines moisissures halophiles peuvent produire des composés de valeur qui sont également produits par des moisissures non halophiles. Elles peuvent présenter des avantages distinctifs pour le développement des processus biotechnologiques de production (Oren, 2002).

Plusieurs enzymes extraites de moisissures halophiles peuvent être exploitées chaque fois que les transformations enzymatiques requièrent des conditions de sel variées. C'est le cas de l'espèce marine *Halocyphina villosa* qui produit des enzymes de dégradation de la lignine.

Plusieurs autres enzymes dérivés des moisissures halophiles tels que les ADNases, les lipases, les amylases, les protéases sont déjà utilisées commercialement (Antonio *et al.*, 2011).

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Microorganismes

Les moisissures dont le nombre total est de 24 souches provenant du laboratoire Biologie et Environnement ont été isolées à partir du sol de la Sebkha de Ain Ezzmoul. Wilaya d'Oum el bouaghi.

1.2. Sélection des souches protéolytiques

Les souches mycéliennes sont ensemencées sur gélose à 15 % de caséine, 5 % NaCl (Annexe 1) par repiquage au centre. L'incubation a lieu à 25° C pendant 7 j. A partir du troisième jour et jusqu'au septième, des mesures du diamètre de croissance de chaque colonie et le diamètre de sa zone d'hydrolyse sont effectuées.

2. Méthodes de fermentation et de production

Les moisissures les plus performantes sont utilisées pour la production des protéases en milieu liquide.

2.1. Préparation du milieu de fermentation

Le milieu synthétique Czapek modifié permet de déterminer la souche la plus protéolytique parmi les quatre souches sélectionnées. Le milieu de production de l'enzyme est constitué du substrat de fermentation (une des protéines suivantes Albumine, Ovalbumine, Hémoglobine ou Caséine) dans trois pH différents 4, 7 et 11 ajustés par addition des tampons phosphates (Annexe 2). Les milieux sont versés dans des Erlen-Meyers (250 ml) à raison de 50 ml par chacun puis stérilisés à 110° C pendant 15 min.

2.2. Ensemencement

Les milieux préparés sont ensemencés par des disques de spores obtenus sur milieux PDA. Les flacons Erlen-Meyer sont incubés à 25° C pendant 8 j sous agitation à 200 rpm. (Boukhalifa, 2013).

3. Suivi de la fermentation

3.1. Récupération de l'extrait enzymatique

La filtration sur papier Whatman n°1 permet la récupération du filtrat constituant l'extrait enzymatique exocellulaire. Ce dernier subit une mesure de pH pour être ajuster à la valeur initiale.

3.2. Mesure des protéines totales

La méthode utilisée est celle de Lowry (1965) dont la principale réaction est la réduction de la tyrosine et le tryptophane entrant dans la composition de la protéine à doser (Annexe 3). La concentration de protéines est déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage de BSA (Annexe 4).

3.3. Mesure de l'activité protéolytique

L'activité est déterminée par utilisation de la caséine comme substrat dans les conditions adoptées par Mechakra et *al.* (1999) (Annexe 5). Les résultats sont exprimés en μg de tyrosine libérés par 1 ml d'extrait enzymatique pendant 1 h de digestion (U) par rapport à une courbe d'étalonnage de la tyrosine (Annexe6).

1. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Les résultats après l'ensemencement sur caséine gélosé à 15% comme milieu sélectif ont donné 13 souches (56.16 %) présentant des zones d'hydrolyse de dimensions différentes à partir des 24 souches initiales (Figure 1 et Figure 2)

Après la comparaison entre le diamètre de croissance et la zone d'hydrolyse (Figure 3) on a choisi quatre souches exoprotéolytiques les plus performantes S₁, S₈, S₁₆ et S₁₉ pour la suite du travail.

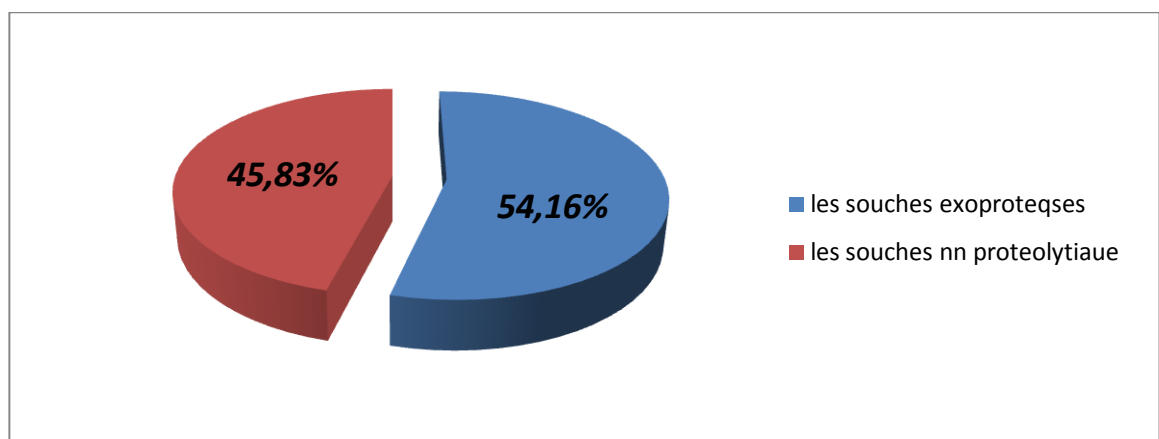


Figure 1 : Les proportions des souches protéolytiques

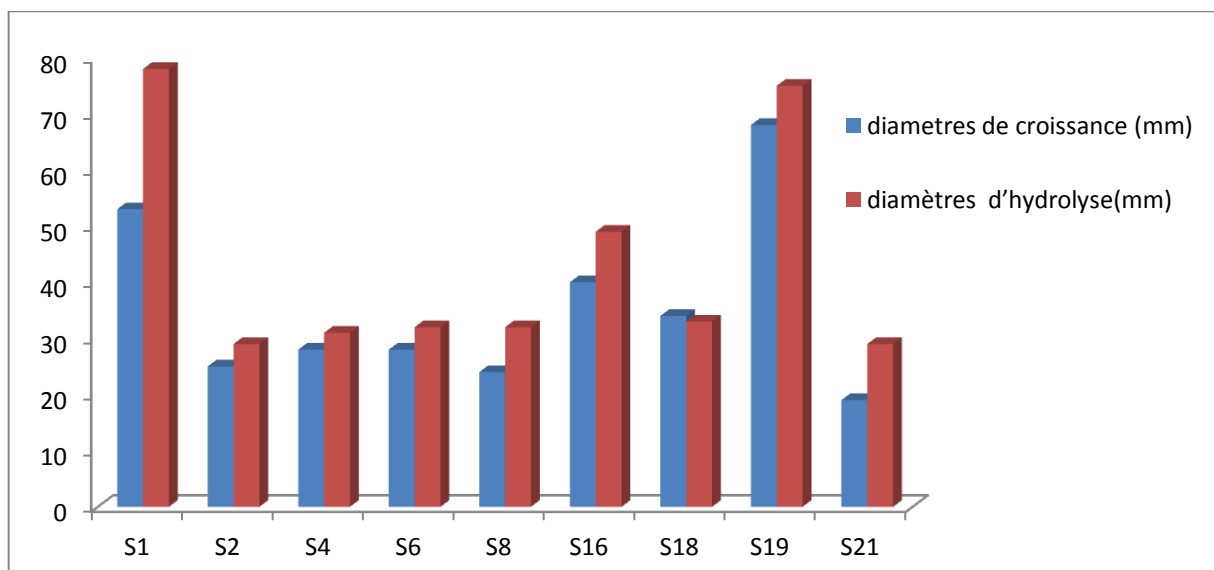


Figure 2 : Les diamètres des zones de croissance et d'hydrolyse de chaque souche.

Tableau 2 : L activité enzymatique de l'extrait de la souche S₁

| S₁ | Caséine | | | Albumine | | | Ovalbumine | | | Hémoglobine | | |
|-------------------------------|----------------|-------------|-------------|-----------------|--------------|-------------|-------------------|-------------|-------------|--------------------|--------------|-------------|
| | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> |
| L'activité enzymatique (U) | 206,5 | 40,4 | 106,9 | 260,64 | 190,88 | 279,47 | 64,35 | 73,47 | 7 | 43,88 | 316,71 | 152,88 |
| Les protéines totales (µg/ml) | 45,4 | 39,5 | 38,5 | 16,5 | 25 | 46,5 | 4,5 | 30,5 | 29,88 | 1,5 | 28,5 | 39 |
| L'activité spécifique (U/µg) | 4,55 | 1,02 | 2,77 | 15,79 | 11,56 | 6,01 | 14,3 | 2,40 | 0,23 | 29,25 | 11,11 | 3,92 |

Tableau 3 : L activité enzymatique de l'extrait de la souche S₈

| S₈ | Caséine | | | Albumine | | | Ovalbumine | | | Hémoglobine | | |
|-------------------------------|----------------|-------------|-------------|-----------------|--------------|--------------|-------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|
| | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> | <i>pH=5</i> |
| L'activité enzymatique (U) | 214,88 | 129,11 | 300 | 52,85 | 135 | 117,7 | 536,23 | 86 | 26,5 | 24 | 84,5 | 129,65 |
| Les protéines totales (µg/ml) | 7 | 85,5 | 57 | 87,5 | 3,64 | 6,50 | 9,5 | 4 | 46,5 | 2,05 | 11,5 | 347 |
| L'activité spécifique (U/µg) | 26,86 | 1,51 | 6,77 | 0,60 | 37,32 | 18,10 | 56,44 | 21,5 | 0,56 | 11,70 | 7,34 | 0,37 |

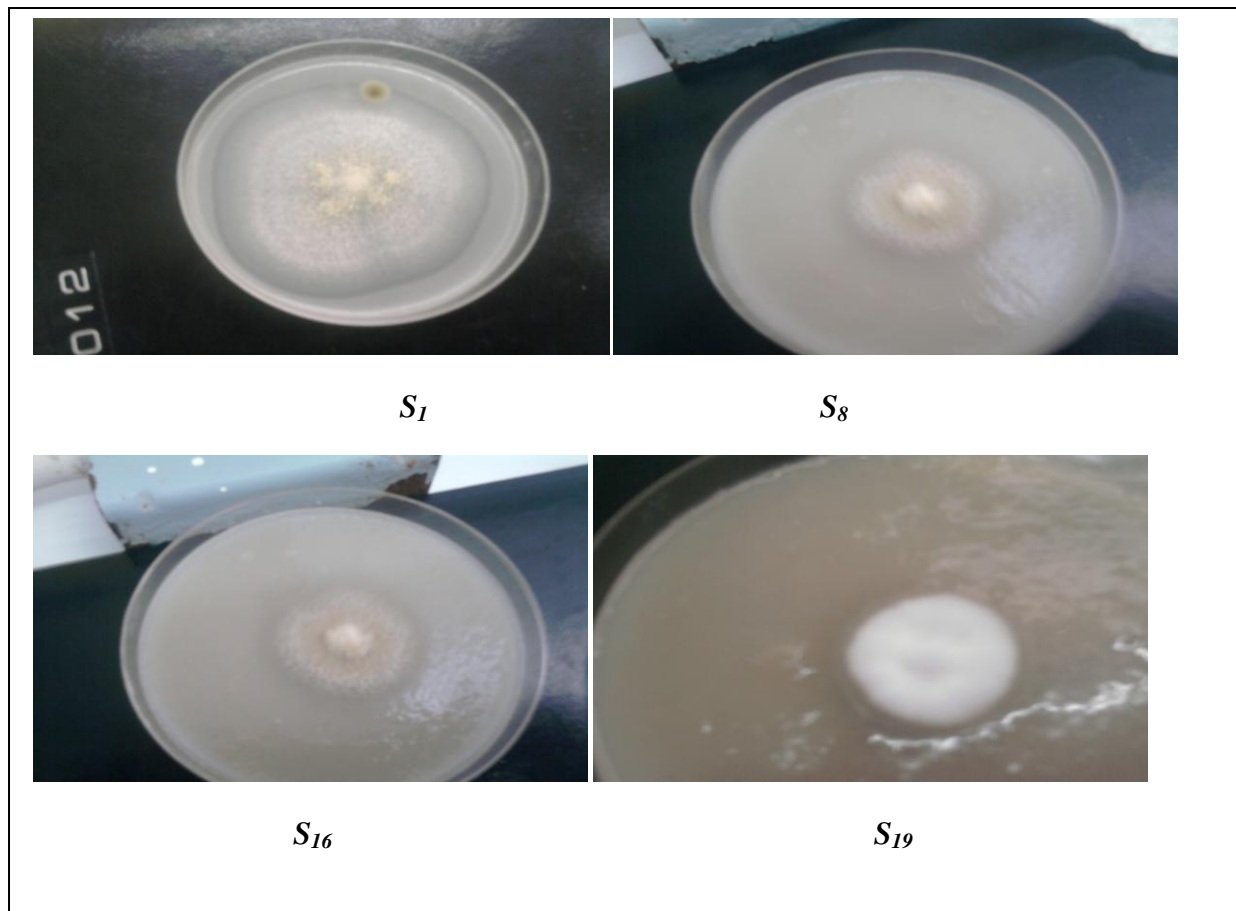


Figure 3 : les souches obtenues après ensemencement sur caséine 15%

Ces résultats sont différents de ceux rapportés par DENDOUGA (2006) qui a trouvée 37,5 % des souches exoprotéolytique issues de la *Sebkha d'El-Mghair (Biskra)* et concordent avec les résultats de BOUCHERIT (2011) avec 52,17 % de souches exoprotéolytique isolées à partir de la *Sebkha de Ain-Ezzmoul (Oum el bouagui)*.

2. Dosage des protéines totales et de l'activité enzymatique :

Les résultats des différents dosages de l'extrait exocellulaire sur les différents milieux de fermentation sont réunis dans les tableaux et les figure suivantes (Tableaux 2,3,4 et 5 ; Figures 3 ,4,5,6,7,8,9,10 et 11).

Tableau 4 : L activité enzymatique de l'extrait de la souche S₁₆

| S₁₆ | Caséine | | | Albumine | | | Ovalbumine | | | Hémoglobine | | |
|-------------------------------|----------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|
| | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> | <i>pH=5</i> |
| L'activité enzymatique (U) | 179,67 | 115,50 | 46,34 | 315,5 | 232 | 248,66 | 252 | 200 | 536,11 | 2 | 86 | 460 |
| Les protéines totales (µg/ml) | 4,81 | 47,295 | 59,75 | 16,1 | 70,5 | 75,05 | 6,15 | 63,82 | 70,11 | 20,5 | 32,15 | 74,75 |
| L'activité spécifique (U/µg) | 13,92 | 1,04 | 0,06 | 3,16 | 3,29 | 3,31 | 40,97 | 3,13 | 7,64 | 0,09 | 2,67 | 6,15 |

Tableau 5 : L activité enzymatique de l'extrait de la souche S₁₉

| S₁₉ | Caséine | | | Albumine | | | Ovalbumine | | | Hémoglobine | | |
|-------------------------------|----------------|-------------|-------------|-----------------|--------------|-------------|-------------------|--------------|-------------|--------------------|--------------|--------------|
| | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=5</i> | <i>pH=7</i> | <i>pH=9</i> | <i>pH=5</i> |
| L'activité enzymatique (U) | 315,5 | 112 | 315,5 | 182 | 316,5 | 285,5 | 290,5 | 6,5 | 471 | 125 | 620,3 | 177 |
| Les protéines totales (µg/ml) | 4,05 | 42,05 | 37,7 | 34 | 8,58 | 46,47 | 8,58 | 0,11 | 61,7 | 5,88 | 6,64 | 16,47 |
| L'activité spécifique (U/µg) | 77,9 | 2,66 | 8,36 | 5,35 | 36,88 | 6,15 | 33,85 | 59,09 | 6,75 | 21,25 | 93,41 | 10,74 |

Resultats et discussion

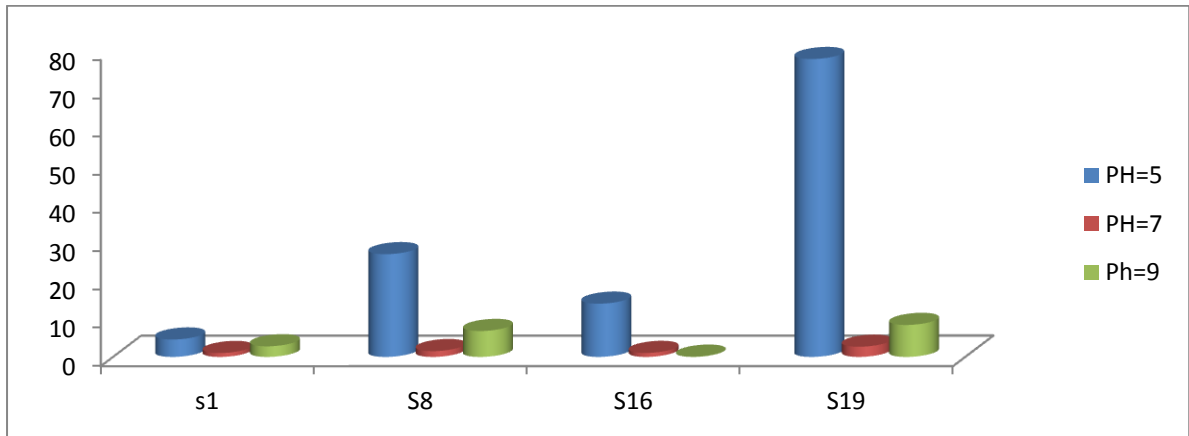


Figure 3 : Activité spécifique des souches sur caséine

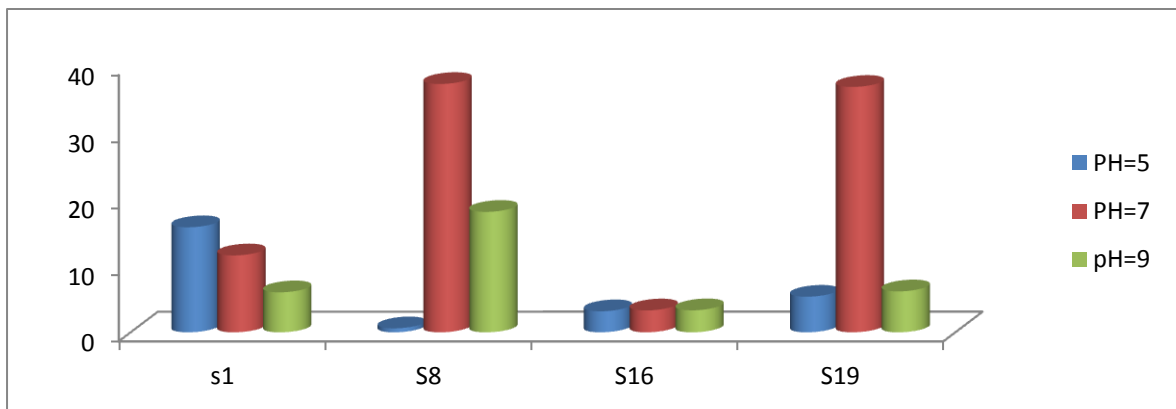


Figure4 : Activité spécifique des souches sur l'albumine

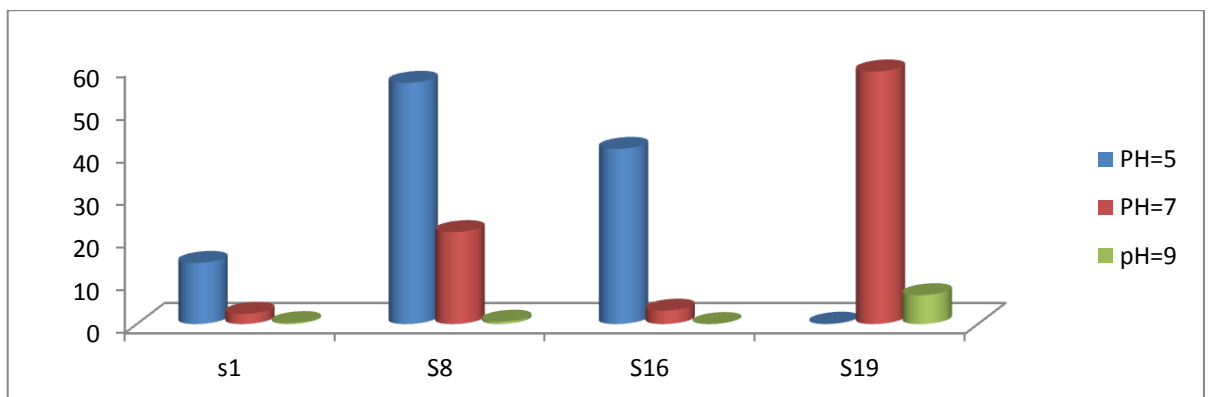


Figure5 : Activité spécifique des souches sur l'ovalbumine

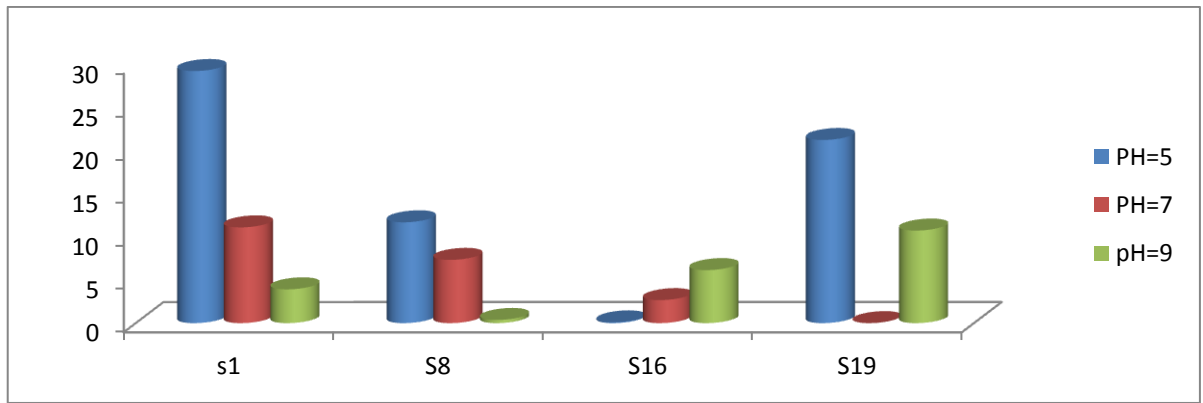


Figure 6 : Activité spécifique des souches sur l'hémoglobine.

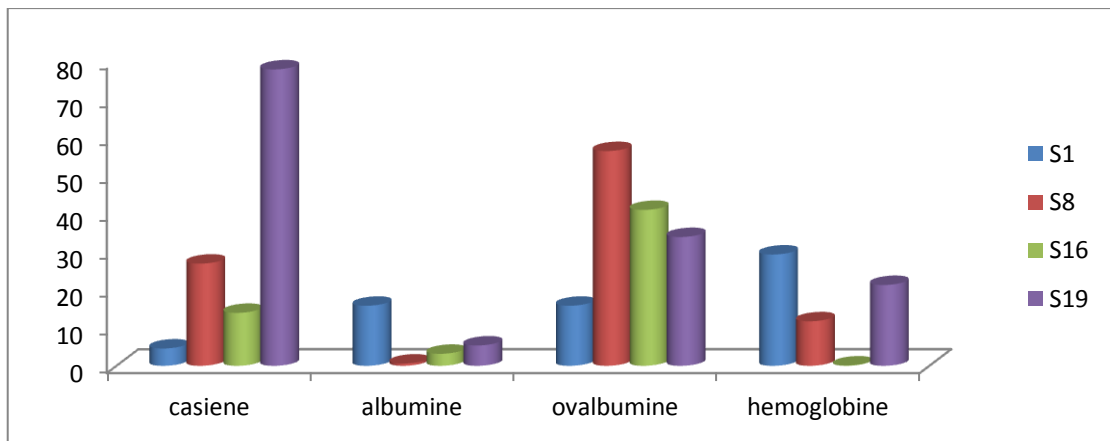


Figure 7: l'activité spécifique des souches à pH=5.

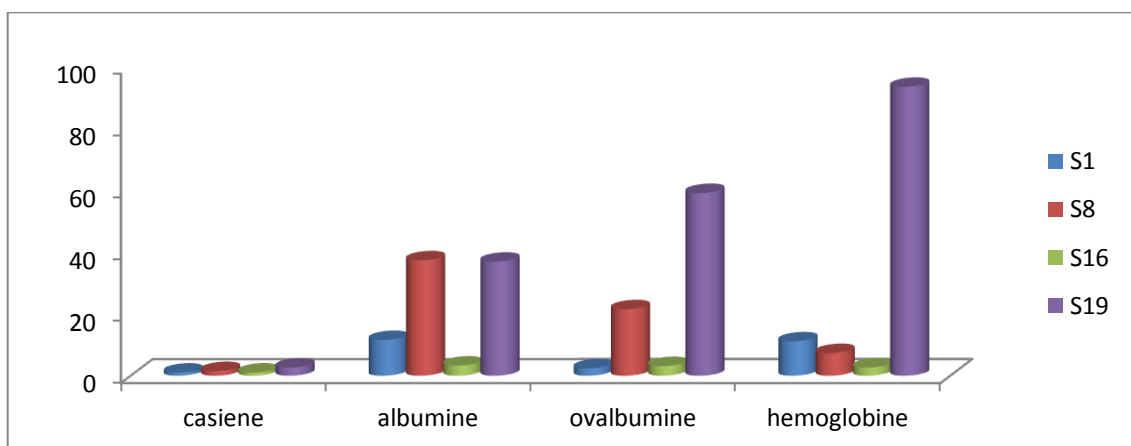


Figure 8 : l'activité spécifique des souches à pH=7.

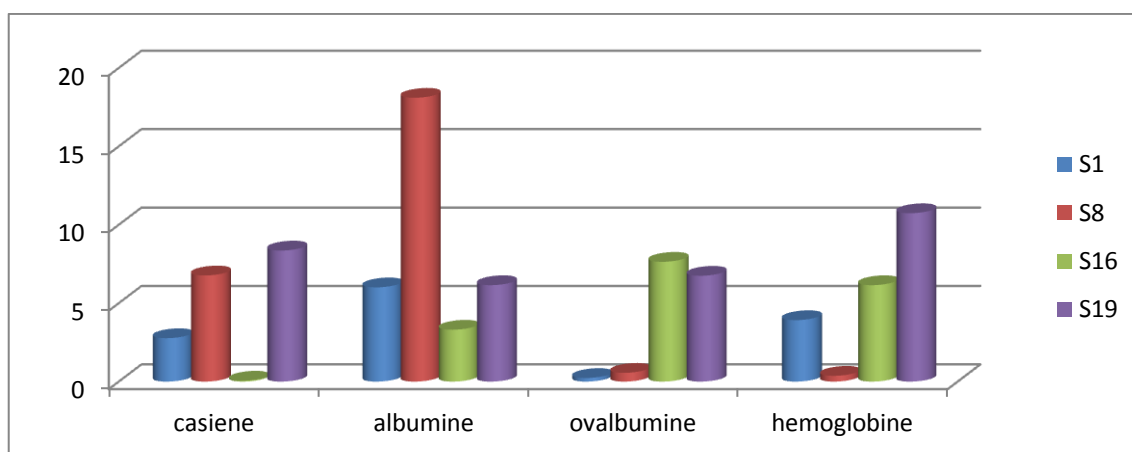


Figure 9 : l'activité spécifique des souches à pH=9.

L'analyse des résultats et la comparaison des activités exoprotéolytiques sur les différents substrats caséine, albumine, ovalbumine et hémoglobine indique que les quatre espèces n'ont pas d'activité importante sur la caséine sauf pour la souche S₁₉ à pH=5 qui a donné une activité spécifique de 77,9 U/μg (Figure 3). Par contre sur l'ovalbumine (Figure 5) on remarque que les souches S₈, S₁₆, S₁₉ possèdent une activité protéasique allant de 21,50 à 59,09 U/μg alors que la souche S₁ ne dégrade pas ce substrat.

Les figures 4 et 6 montrent que la souche S₁₆ a une très faible activité sur l'albumine et l'hémoglobine ce qui n'est pas le cas des trois souches restantes qui possèdent une activité plus ou moins importante [6,15-37,32] ; [7,34 – 29,25] U/μg sur les deux substrats respectivement. De ce fait on conclut que la souche S₁₉ a une grande affinité pour les quatre substrats testés alors que la S₈ n'a pas d'affinité que pour l'albumine et l'ovalbumine. Les souches S₁ et S₁₆ ont des affinités pour un seul substrat pour chacune d'elles respectivement l'hémoglobine et l'ovalbumine.

Les résultats obtenus sur le milieu de fermentation aux trois pH différents 5, 7 et 9 ont révélés qu'à pH acide (figure 7) toutes les souches produisent une protéase dégradant l'ovalbumine alors que ce n'est pas le cas de l'albumine. Les souches S₁₉ et S₈ n'ont pas d'activité que sur la caséine respectivement (77,90 U/μg) et (2,86 U/μg) bien que l'hémoglobine n'est dégradé que par la souche S₁ (29,25 U/μg). La figure 8 montre que la dégradation de l'albumine et l'ovalbumine se fait uniquement par deux souches S₈ (37,32 ; 21,50 U/μg) et S₁₉ (36,88 ; 59,09 U/μg) alors que celle

de l'hémoglobine est réalisée par une seule souche S_{19} (93,41 U/ μ g). La caséine et le seul substrat qui n'a pas été dégradé par aucune souche à pH neutre tandis qu'à pH alcalin (Figure 9) l'hémoglobine et l'ovalbumine sont dégradés par les souches S_{19} (10,47 U/ μ g) et S_{16} (7,64 U/ μ g). La souche S_8 produit une protéase basique avec une activité de 18,10 U/ μ g sur l'albumine et 6,77 U/ μ g sur la caséine. Ce dernier est dégradé par la S_{19} avec une activité de 10,74 U/ μ g. De ce fait on trouve que toutes les souches S_1 , S_8 , S_{16} et S_{19} produisent des protéases acides et alcalines alors que les protéases neutres ne sont produites que par les deux souches S_8 et S_{19} .

Ces résultats montrent que les quatre souches produisent des enzymes exoprotéolytiques différentes par leur affinité aux substrats et leur pH d'activité.

Les souches S_{19} et S_8 produisent des protéases neutres et alcalines avec une grande affinité pour le même substrat à chaque une des souches respectivement l'hémoglobine et l'albumine ; et des protéases acides dont l'affinité est pour la caséine pour la S_{19} et pour l'ovalbumine pour la S_8 .

La souche S_{16} produit des protéases acides et alcalines avec une grande affinité pour le même substrat, l'ovalbumine, sans production de protéase active à pH neutre ce qui est le cas de la souche S_1 qui ne produit que des protéases acides et alcalines mais avec une affinité pour la dégradation d'hémoglobine et d'albumine respectivement.

conclusion

Conclusion

L'objectif de notre travail consiste à isoler des souches fongiques à partir d'une région climatiquement aride (Sebkha) et à étudier le potentiel de production des protéases par ces souches.

Les résultats après l'ensemencement sur caséine à 15% comme milieu sélectif ont donnés 13 souches (56.16 %) présentant des zones d'hydrolyse de dimensions différentes à partir des 24 souches initiales. La mesure de l'activité spécifique après la fermentation sur différents substrats (Caséine, Albumine, Ovalbumine et Hémoglobine) à 3 pH différents (4, 7 et 9) par les quatre souches sélectionnées (S₁, S₈, S₁₆ et S₁₉) a permis l'obtention des résultats suivants

Les protéases acides produites par la S₈ et S₁₆ ont une affinité pour l'ovalbumine et celles produites par la S₁₉ et S₁ ont une affinité pour la caséine et l'hémoglobine respectivement.

Les souches S₁ et S₁₆ ne produisent pas de protéases neutres alors que les souches S₁₉ et S₈ ont une protéase active à pH 7 avec une affinité pour respectivement l'hémoglobine et l'albumine.

Les protéases alcalines des souches S₁ et S₈ ont une affinité pour l'albumine ; la S₁₆ pour l'ovalbumine et S₁₉ pour l'hémoglobine.

Les moisissures sélectionnées produisent différents types de protéases actives à différents pH avec des affinités aux substrats multiples ce qui augmente leur importance à l'échelle industrielle et biotechnologique

Au terme de ce travail il est intéressant de proposer certaines études complémentaires

- Une purification aux extraits bruts de fermentation obtenus.
- Etude des propriétés de l'enzyme purifiée.
- Chercher une éventuelle application industrielle de ces enzymes

Reference bibliographie

Référence bibliographique

AUBERGER B ;LENOIV J ;BERGERE J.L. (1967). cité par Dendouga w .2006.

BENSMIRA S. (2006). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (Sol et Sebkha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel. Mémoire de magister. Université Mentouri. Constantine.

BOUCHET P.H., Giraud J.L., and VIHARD J. (1999). Les champignons mycologie fondamentale et appliquée. Masson (ed). p : 5-10.

BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GUY PH., LARPENT J.P., VEAU P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Masson. Paris. 35-276.

BOIRON P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. P:13-69.

BOUCHERIT ZEYNEB. (2011). Production études des propriétés de la protéase acides d un moisissures isolée de sebkha Ain Azzmoul. Mémoire de magister. Université Mentouri .Constantine.

BOIRON P. (1989). Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P: 29-36, 80.

COLWELL R.R.& GRIGOROVA. R. (1989). Methods in microbiology. (Ed) St E dimundsbert press limited. Great Britain. P : 133-138.

DAVET R.(1996). La Communauté Fongique : Son organisation et rôle dans l'écosystème. Marcel Dekker , Inc., New York.

DEMAIN A.L.(2000). Microbiol Biotechnology (feature). Trends in biotechnology. 18(1), p: 26-31.

DURAND G & MONSON P. (1982).Les enzymes : Production et utilisations industrielles. Bordaq. Paris. P36-153.

FRAZIER W.C. (1967). Food microbiology. Academic presse. London.3-429.

GARCIA-CONESA M.T., KROON P.A., RALPH J., MELLON F.A., COLQUHOUN I.J., SAULNIER L., THIBAUT J.F. & WILLIAMSON. G. (1999). Acinnamoyl esterase from *Aspergillus niger* can break plant cell wall cross-links without release of three diferulic acids. *Eur. J. Biochem.* P : 266:644-652.

GUIRAND J.P. (1998). Microbiologie alimentation. Dunod. Paris. P: 7-330.

GUPTA. (2002). Bacterialalkaline protease molecular approaches and industrial application. *Appl. microbiol. biotechnol.* P. 44:363-366.

HARTLEY B.S. (1960). Proteolytic enzymes. *Annu Rev Biochem.* P : 29 : 45–72.

HESLOT H. (1996). L'ingénierie des protéines et ses applications. Lavoisier. Paris. P : 160-495.

KUMER G., NAGESH N .(2008).purification of extracellular acid protease and analisys of fermentation methabolites by *synergistes sp.* utilizing proteinaceous solid wast from tanneries.*bioresource technologie.*P:99 ,2364-2372.

KUDRYA A& SIMONENKO I.A. (1994).alkaline serine protease and lectin isolation from the culture fluid of *bacillus* .*applied microbiology and biotechnology.* P: 41:1263-1270.

LEVEAU J.Y., BOUIX M. (1993). Les moisissures. p : 112-163. In : Florent J. (ed), *Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel.* Edition Tec et Doc-Lavoisier Apria.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. & RANDALL R. J. (1965). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* P .193 (1) : 265-275.

MEUNIER N. (1999) .Evaluation du potentiel des productions des protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise.INRS-eau.Université du Québec. Canada.

MECHAKRA A., AUBERGER B., REMEUF F. & LENOIR J. (1999). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci.Aliments*. 19 (6) : 663-675.

NICKLIN J., GRAEME-COOK K., PAGET T., KILLINGTON R . (2000) . L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. p : 210-216.

PEPLER H. J. & PERLMAN D. (1979). Microbial technology. Academic press. San Francisco. P:42-60.

POLAINA J., MACCABE A.P. (2007). Industrial enzyme structure, function and applications. Springer. Netherlands.

RAO M.B.,TANKSALE A.M.,GHATGA M.S. (1998) . Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol . Mol. Biol .* P: 62.

SCRIPON R. (1999).biotechnologie. 5^{ème} édition . Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P : 39. 351-356.

TERROUCHE K, ZAKRI B.(2013).identification des moisissures isolées à partir d un sol salé de Sebkha d Ain Azzmoul. Mémoire de master en microbiologie .université Mentouri. Constantine.

TRAP C. & BOIREAU P. (2000). Les protéases chez les helminthes. *Vet. Res.* P. 31 : 461-471.

Les annexes

Annexes

Annexe 1 : GÉLOSE CASÉINÉE

| | |
|--------------------|---------|
| Caséine | 100 g |
| Agar..... | 20 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |
| NaCl | 5 % |

-Stériliser par autoclavage à 115° C/ 10 min.

Annexe 2: CZAPEK MODÉFIE

| | |
|---------------------|---------|
| Glucose | 10 g |
| KCl | 0.5 g |
| MgSO4 7H2O..... | 0.5 g |
| FeSO4_7H2O | 0,01 g |
| K2HPO4 | 1g |
| Les proteines | 10 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

-Stériliser par autoclavage 110° C/ 10 min. pH finale 6,7.

Annexe 3: POTATO DEXTROSE AGAR (PDA)

| | |
|----------------------|---------------------------|
| Pomme de terre | 250 g |
| Glucose | 20 g |
| Agar | 15 g |
| Eau distillée..... | compléter jusqu'à 1000 ml |
| NaCl..... | 5 % |

- Laver la pomme de terre non pelée.
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min.
- D'autre part faire fondre l'agar et NaCl dans 500 ml d'eau distillée.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Compléter le volume à 1000 ml.
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

Annexe 4: DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES.

➤ Mode opératoire :

- **préparation des Solution**

- Solution A : 2 % Na_2CO_3 dans NaOH
- Solution B : 2 % Tartrate double du Sodium et Potassium.
- Solution C : 1 % $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$.
- Solution M: 20 ml A + 1 ml B + 1 ml C.
- Solution E : 1/10^e Folin-Ciocalteux.
- Solution mère : 500 $\mu\text{g/l}$ BSA.

- **Préparation du courbe étalon:**

| | | | | | | | |
|--|---|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------------------|
| Dilution ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | 0 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 | 1 ml de l'échantillon à doser. |
| Solution mère (ml) | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1 | |
| 1 Eau distillée (ml) | 1 | 0.8 | 0.6 | 0.4 | 0.2 | 0 | |
| Solution M (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| Agitation | | | | | | | |
| <i>Incubation à température ambiante pendant 15 min.</i> | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|---|---|
| Solution E (ml) | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Agitation | | | | | | | |
| Incubation à - l'obscurité ; - température ambiante ; pendant 45 min | | | | | | | |
| Lecture de l'absorbance à 750 nm. | | | | | | | |

Annexe 5 : COURBE D'ÉTALONNAGE POUR LE DOSAGE DES PROTÉINES

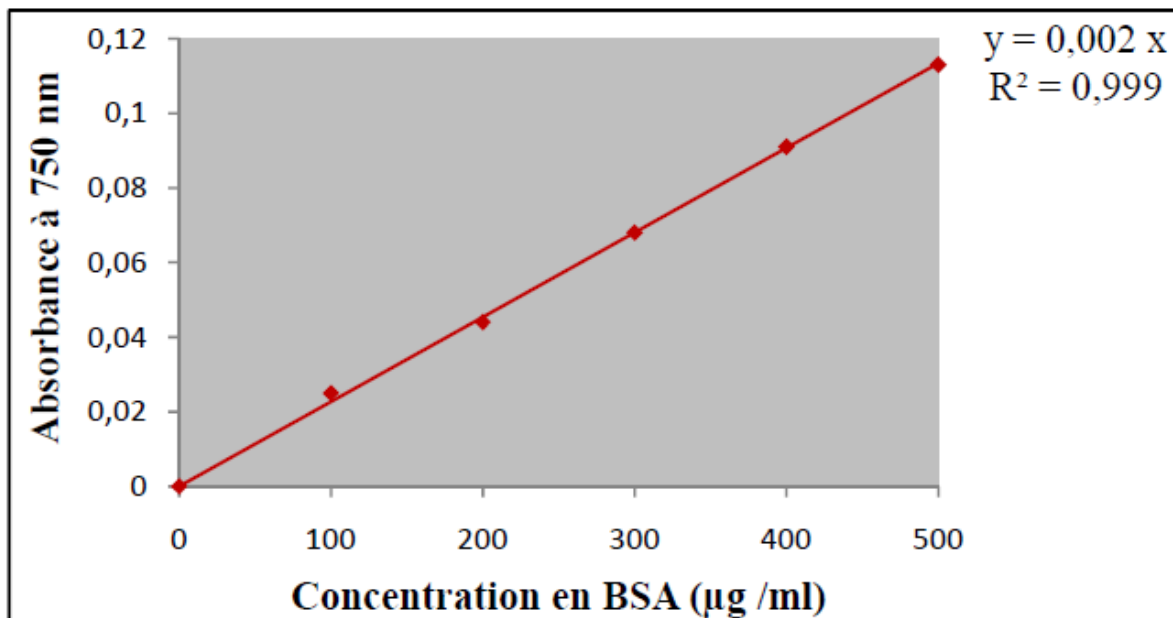


Figure 1. Courbe étalon pour le dosage des protéines.

Annexe 6: DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.

➤ Mode opératoire:

• Préparation Solutions utilisées:

- Caséine 2,5 % dans Citrate de Sodium (0,02 M).
- Solution mère 100 µg /ml de Tyrosine.
- TCA 4 %.
- Na₂CO₃ 15 % dans NaOH (0,1 N).
- Folin-Ciocalteux 1/10.

➤ Protocole

• Courbe d'étalonnage :

La gamme-étalon est établie à partir d'une solution mère de tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 100 µg /ml selon le même protocole décrit précédemment pour le dosage de l'activité. Cependant, l'extrait enzymatique est remplacé par la solution de tyrosine comme l'indique le tableau suivant :

| | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Dilution (µg/ml) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Solution mère (ml) | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1 |
| Eau distillée (ml) | 1 | 0.8 | 0.6 | 0.4 | 0.2 | 0 |
| Na ₂ CO ₃ (ml) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Eau distillée (ml) | 6.5 | 6.5 | 6.5 | 6.5 | 6.5 | 6.5 |
| Agitation | | | | | | |
| Repos à température ambiante pendant 10 min. | | | | | | |
| Solution E (ml) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

| |
|--|
| <p>Incubation à - l'obscurité -température ambiante ; pendant 5 h.</p> |
| <p>Lecture de l'absorbance à 750 nm.</p> |

➤ **Activité enzymatique** : Réalisé en 2 étapes

❖ **Étape 1** : Réaction enzymatique.

| |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 2,5 ml Caséine 2,5% dissoute dans le Citrate de Sodium 0,02M. • 0,5 ml tampon NH_2PO_4 (0,02M pH 4). • 1 ml extrait enzymatique. |
| <p>Agitation.</p> |
| <p>Incubation 40° C/ 1 h.</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> • 5 ml TCA |
| <p>Repos 15 – 20 min à température ambiante.</p> |
| <p>Filtration.</p> |

❖ **Étape 2** : Dosage colorimétrique (Anson, 1938).

| |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 1 ml filtrat. • 2 ml Na_2CO_3 à 15 % dans NaOH (0,1N). • 6,5 ml eau distillée • 0,5 ml Folin -Ciocalteux. |
| <p>Agitation</p> |
| <p>Repos 15 min à température ambiante</p> |
| <p>Agitation.</p> |

Incubation 5 h à température ambiante et l'obscurité.

Lecture de l'absorbance à 750 nm au spectrophotomètre

Annexe7: COURBE D'ÉTALONNAGE POUR DOSAGE DE LA TYROSINE.

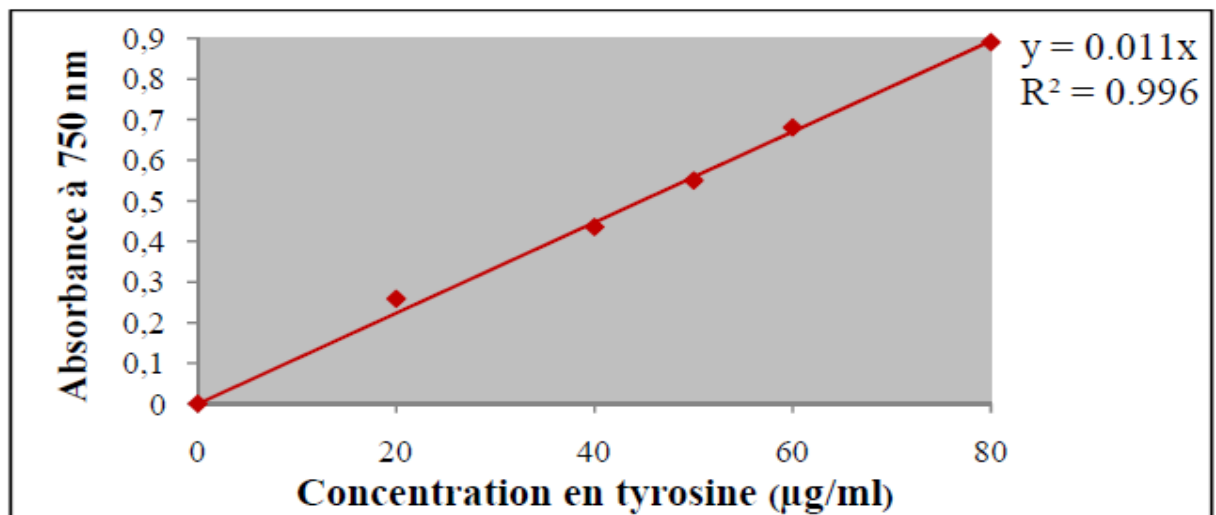


Figure 2. Courbe d'étalonnage pour le dosage de la tyrosine.

Resumé

Résumé

Dans cet objectif, nous nous proposons d'étudier la production des protéases par des moisissures locales isolées de milieux extrêmes Sebkh d Ain azmoul-Ain mlila.

Les résultats après l'ensemencement sur caséine à 15% comme milieu sélectif ont donnés 13 souches (56.16 %) présentant des zones d'hydrolyse de dimensions différentes à partir des 24 souches initiales. La mesure de l'activité spécifique après la fermentation sur le milieu synthétique Czapek modifié constitué du substrat de fermentation (une des protéines suivantes Albumine, Ovalbumine, Hémoglobine ou Caséine) à 3 pH différents (4, 7 et 9) par les quatre souches sélectionnées (S₁, S₈, S₁₆ et S₁₉) a permis l'obtention des résultats suivants

Les souches S₁₉ et S₈ produisent des protéases neutres et alcalines avec une grande affinité pour le même substrat à chaque une des souches respectivement l'hémoglobine et l'albumine ; et des protéases acides dont l'affinité est pour la caséine pour la S₁₉ et pour l'ovalbumine pour la S₈.

La souche S₁₆ produit des protéases acides et alcalines avec une grande affinité pour le même substrat, l'ovalbumine, sans production de protéase active à pH neutre ce qui est le cas de la souche S₁ qui ne produit que des protéases acides et alcalines mais avec une affinité pour la dégradation d'hémoglobine et d'albumine respectivement.

Mots clés

Potentiel, milieux extrêmes, souches mycélienne, protéase, Sebkh.

Summary

The aim of this work is about the production of proteases by local fungi isolated from extreme environments Sabkha of Ain azzmoul - Ain Milila.

The results after seeding on 15% casein as the selective medium were given 13 strains (56.16%) with hydrolysis of different sizes areas from 24 initial strains. The measurement of specific activity after fermentation on the synthetic modified Czapek medium consisting of the fermentation substrate (one of the following proteins albumin, ovalbumin, casein or hemoglobin) in 3 different pH (4, 7 and 9) by the four selected strains (S₁, S₈, S₁₆ and S₁₉) has the following outcomes

The strains S₁₉ and S₈ produce neutral and alkaline proteases with a high affinity for the same substrate to each of the cate strains respectively hemoglobin and albumin; and acid proteases whose affinity for casein for S₁₉ and ovalbumin for the S₈.

The strain S₁₆ produces acidic and alkaline proteases with a high affinity for the same substrate, ovalbumin, without producing neutral pH active protease which is the case of the S₁ strain which produces only acidic and alkaline proteases, but with affinity for the degradation of hemoglobin and albumin, respectively.

Keywords:

Potentia, extreme environments; mycelial strains, protease, Sabkha and fermentation.

ملخص

أسفرت الدراسة الإنتاجية لإنزيم البروتياز من طرف فطريات معزولة من بيئات قاسية سبخة عين ازمول –عين مليلة ولاية أم البواقي – بعد معاينتها على وسط مغذي جيلوز كازيني 15% باعتباره وسط انتقائي أن هناك 13 سلالة فطرية من 24 سلالة أولية لها القدرة على إنتاج إنزيمات البروتياز وذلك من خلال ظهور مناطق تحليلية مختلفة الأحجام .

بعد قيامنا بالتخمير على وسط مغذي يحتوي على واحد من بين البروتينات التالية الكازين ,الألبومين ,الهيموغلوبين ,الوفاليمين في ثلاث درجات حموضة مختلفة (4,7و9) وذلك لأربع سلالات مختارة من 13 سلالة فطرية تحصلنا على النتائج التالية

السلالات s19 و s8 تقوم بإنتاج إنزيم البروتياز في درجة حموضة معتدلة وقلوية مع انسجامها إلى نفس المركب البروتيني والتي هي على الترتيب الهيموغلوبين و الألبومين لكلا السلالتين ,كما تنتج السلالة s19 بروتياز في وسط حامضي و الذي يجذب بدوره إلى المركب البروتيني الكازين و نفس الشيء فيما يخص السلالة s8 ولكن مع انجذاب هذه الأخيرة إلى الوفاليمين.

السلالة s16تقوم بإفراز البروتياز في وسط حامضي و قلوي مع انجذابها إلى نفس المركب البروتيني الكازين وعدم قدرتها على إنتاج أي بروتياز في وسط معتدل وهو نفس الشيء فيما يخص السلالة s1 حيث تقوم هذه الأخيرة بإنتاج إنزيم البروتياز في الوسطين القلوي و الحامضي التي تقوم بهدم بروتين الهيموغلوبين و الألبومين على التوالي

الكلمات المفتاحية

البيئات القاسية , السلالات الفطرية , إنزيم البروتياز , السبخة,التخمر ,المقدرة الإنتاجية.