

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 الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biochimie

قسم الكيمياء الحيوية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

les protéases d'origine levurienne produites par fermentation sur milieu solide.

Présenté par :

AMIOUR Ilhem

Le 30/06/2022

BENDJEDDOU Hayame

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mme BENNAMOUN L.

(M.C.B, Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Mr NOUADRI T.

(M.C.A, Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Examineur 2 : Mme DAKHMOUCHE S.

(M.C.A, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine 3).

**Année universitaire
2021 - 2022**

Remerciements

Avant tout, nous tenons en premier lieu, à remercier « Allah », le tout puissant, qui nous a accordés le courage et la patience pour élaborer ce modeste travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute nous gratitude.

Premièrement, Nous tenons à remercier Mme BENNAMOUN Leila directrice de ce mémoire , pour l'aide et les connaissances qu'elle a pu nous transmettre. Nous la remercions également pour sa présence et la qualité de ses conseils.

Nos remerciements vont également aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, Mr NOUADRI T. et

Mme DAKHMOUCHE S.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué à ce travail, même avec un simple conseil.



Dédicace

Je termine ma thèse de fin d'étude avec gratitude à tous ceux qui ont eu un impact sur mon succès.

A qui je dois ce que je suis et ce que je serais, qui ont tout donné et tout sacrifié pour mon bien et ma réussite. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de son sacrifices. au plus grand homme de l'univers, mon père

ALI.

*A qui m'as tout donné, sans rien demander, à la seule personne au monde qui sera toujours avec moi, à ma plus grande fierté et la belle femme de ma vie, ma mère **DJAMILA.***

*Un dédicace spéciale a celui qui m'a donner la force d'être toujours la meilleure, à la personne la plus merveilleux que Dieu a mis dans mon chemin, à celui qui brille toujours dans ma vie mon petit papa **KAMEL.***

A celui qui ont un impact profond, mes belles sœurs

ANOUAR, BOUTHEYNA, AYA TASNIME.

*Et sans oublier mon seul frère **MOUHANED.***

*A mon grand-père **IBRAHIM,** et ma grand-mère **EL ZOHRA** la miséricorde de dieu.*

*A mon amie avec qui m'a accompagné pendant les bons et les mauvais moments de cette année **HAYAME.***

A mes amis pour les souvenir des moments heureux que nous acons passés ensemble, avec mes vœux sincères de réussite, bonheur, santé et de prospérité. et à toute ma famille.

A-Ithem

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents que j'aime tant ..

*Ma mère **FARIDA** le pilier de ma vie ,Merci, pour tout, je ne serais jamais arrivée là, sans ton soutien, et tes sacrifices. Qu' allah te protège et te garde en bonne santé.*

*Mon père **MED EL HADI** qui n'a jamais cessé de me guider vers tous ce qui bon dans la vie ,en m'encourageant et en me soutenant.*

*C'est avec un grand plaisir que je dédie cet œuvre à mes frères **RACIM** et **HATHEM** pour leur appui moral et pour leur amour fraternelle à mon égard.*

*Je dédie cet accomplissement à mes copines **Wafa** et **DARINE** pour leurs encouragements permanents et leurs aides précieuses dans le besoin, pour leur gentillesse et leur soutien .*

*A mon binôme **ILHEM** qui m'a accompagné, et Avec qui j'ai passé ces dernières superbes années.*



B-Hayame

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1
Etude bibliographique	
Chapitre 01 : Les levures	
1-1-Généralités sur les levures	3
1-2-Morphologie	4
1-3-Reproduction	4
1-4-Classification	5
1-5- Levure Candida	6
1-5-1- Taxonomie de la levure Candida	7
1-5-2- Habitat	7
1-5-3- Conditions de croissance	8
• Source de carbone et d'énergie	9
• Source d'azote	9
• Oligoéléments et vitamines	9
• Température	9
• PH	10
• Respiration et fermentation	10
• Pression osmotique et l'activité d'eau	10
Chapitre 02 : Les enzymes protéolytiques	
1-Les protéases	11
1-1- Définition	11

1-2-Source des protéases	11
1-3-Classification et nomenclature	12
1-4-Applications des protéases	13
1-5-Mécanisme d'action des protéases	15
a. Protéase à serine	15
b. Cystéylprotéases	17
c. Aspartylprotéases	18
d. Métalloprotéases	20
1-6-Dosage de l'activité protéolytique	22
1-7-Facteurs influençant l'activité enzymatique	24
❖ Température	24
❖ pH	25
❖ Concentration en substrat et en enzyme	25
❖ Inhibiteurs enzymatiques	25
Chapitre 03 : Production des protéases par FMS	
1- Généralités sur la fermentation	27
1-1- FML	27
1-2- FMS	28
1-2-1-Avantages et inconvénients	29
1-2-2- Paramètres de contrôle de FMS	29
1-2-2-1- La température	29
1-2-2-2-Le support	30
1-2-2-3-L'humidité	30
1-2-2-4-L'aération	31

1-2-2-5-Le pH	31
2- Optimisation de la production des protéases	31
2-1-Optimisation par le génie génétique	32
2-1-Optimisation par les plans statistiques	32
• Plans d'expériences de Plackett et Burman	33
• Plans des Box – Behnken	34
• Plans de Box et Wilson	35
• One Factor At-a- Time (OFAT)	35
Chapitre 04: Matériel et méthodes	
 Déchets de tomates	36
1- But	36
2- Principe	36
3-Materiel et méthodes	36
~ Plan de Plackett et Burman	37
4- Résultat et discussion	38
4-1- Sélection des facteurs par plan de Plackett et Burman	38
4-2-Optimisation par méthodologie de surface de réponse (RMS)	39
4-3- Comparaison entre FMS et FML	40
5- Conclusion	41
 Déchets agricoles	42
1-But	42
2-Principe	42
3-Optimisation	42

4-Résultat	43
4-1 Criblage d'organisme producteur de protéase	43
4-2 Détachage	43
5- Discussion	44
6- Conclusion	45
 Optimisation de la production des protéases . Application de l'enzyme dans l'attendrissement de la viande.	45
1-But	45
2-Principe	46
3-Matériel et méthode	46
~ Utilisation de l'enzyme dans l'attendrissement de la viande	47
4-Resultat et discussion	47
~ Électrophorèse SDS-PAGE	49
~ Microscopie électronique à balayage (MEB)	49
5- Conclusion	50
 Déchets alimentaires (le pain)	51
1-But	51
2-Principe	51
3-Matériel et méthode	51
~ Fermentation fongique à l'état solide et optimisation des conditions	51
~ Récupération et dosage d'enzyme	52
~ Essai de protéase	52
4-Résultats et discussions	52
5-Conclusion	54

Conclusion générale	55
Résumé	56
Abstract	57
المخلص	58
Références bibliographiques	59

Liste des abréviations :

KDa: kilo Dalton

µm : Micro mètre

A_w : Activité d'eau

FMS : Fermentation en milieu solide

FML : Fermentation en milieu liquide

NH₄HO₃ : Nitrate d'ammonium

NaCl : Chlorure de sodium

ZnSO₄ .7H₂O: Sulfate de zinc heptahydraté

ELISA: Enzyme-linked immunoassay

MMP2: Matrix Metallopeptidase 2

TCA : Acide trichloroacétique

EIS : Electrochemical impedance spectroscopy

SDS-PADE : Sodium dodécylsulfate polyacrylamide gel électrophorèses

Rpm : Nombre de tours par minute

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

Liste des figures:

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Cellule de levure au microscope	3
Figure 2	Division des levures par bourgeonnement	5
Figure 3	Cellule de la levure Candida Sp	6
Figure 4	Protéases à sérines (EC 3.4.21)	15
Figure 5	Mécanisme réactionnel des protéases à sérine	16
Figure 6	Protéase à cystéine	17
Figure 7	Mécanisme de réaction schématique de la cystéine protéase	18
Figure 8	Aspartate Protéase	19
Figure 9	Représentation schématique du mécanisme catalytique de la protéase de l'acide aspartique	20
Figure 10	Structure des Métalloprotéases	20
Figure 11	Mécanisme réactionnel des Métalloprotéases	21
Figure 12	Facteurs influençant l'activité enzymatique	26
Figure 13	Milieu de culture de FML	27
Figure 14	Milieu de culture de FMS	28
Figure 15	Illustration graphique d'un plan factoriel composé de 3 facteurs plan de Box-Behnken	34
Figure 16	Box-Wilson expérimental design	35
Figure 17	(LHS)-One-factor-at-a-time-OFAT-for-three-variables	35
Figure 18	Évolution de la production de protéase neutre dans SSF (~) et SmF (&)	40
Figure 19	Manihot esculenta Crantz	46
Figure 20	Analyse électrophorétique d'une Protéine échelle standard	48
Figure 21	Micrographies SEM de bœuf dans un traitement témoin et b avec Manihot Protéase esculenta	49
Figure 22	Effet de la période d'incubation (h) sur la production de protéase (a) et d' α -amylase (b) par <i>R. oryzae</i>	53

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau 1	Classification de <i>Clavispora lusitaniae</i>	7
Tableau 2	Les conditions de croissances	8
Tableau 3	Classification et nomenclature des protéases	12
Tableau 4	Les différentes applications des protéases	13
Tableau 5	Méthodes de dosage de l'activité protéolytique	22
Tableau 6	Avantages et inconvénients de la FMS	29
Tableau 7	Plan de Plackett-Burman pour 12 essais et 11 facteurs	33
Tableau 8	Gamme de différentes variables étudiées dans le plan Plackett-Burman	37
Tableau 9	Sélection des facteurs par le plan de Plackett-Burman	38
Tableau 10	Comparaison de résultats entre les fermentations à l'état solide et immergées	40
Tableau 11	Caractérisation biochimique de <i>Bacillus halodurans</i> isolé des sédiments marins	43

Introduction générale

Les enzymes sont des catalyseurs de réactions chimiques avec une grande précision, du coup indispensable dans notre vie quotidienne, ainsi pour la survie de toutes les espèces vivantes. Au cours de ces dernières années le développement de la biotechnologie aboutit à changer radicalement les pratiques et les structures agricoles actuelles en augmentant les rendements, en rendant les plantes et les animaux résistant à certains parasites et maladies et à l'augmentation de la production de la plupart des enzymes. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (*Botton et al., 1999*). En revanche les levures sont considérées comme les micro-organismes les plus importants en biotechnologie, ayant des capacités de production enzymatique rapide et moins coûteuse.

Les protéases sont parmi les enzymes produites par les levures, et les plus employées en industrie, occupant ainsi 60% du marché global des enzymes.

L'extraction de ces enzymes fournit les catalyseurs pour la fabrication de produits chimiques dans diverses industries telles que: le textile, l'industrie pharmaceutique, l'industrie du papeterie et l'industrie alimentaire afin d'atténuer le problème de pollution de l'environnement (*Jani et al., 2012*). D'après *Kandasamy et al., 2016* et *Das et Prasad, 2010* les protéases d'origine microbienne sont des enzymes économiquement importantes car elles présentent un large éventail d'applications dans différentes industries.

La fermentation en phase solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des micro-organismes, en utilisant des substrats solides à faible taux d'humidité, et nécessite un substrat solide adapté parmi les matériaux agro-industriels (*Hamrouni et al., 2019*).

Ce processus est un outil potentiel pour la production de composés importants sur le plan industriel grâce à la bioconversion de déchets agricoles riches en nutriments en produits à valeur ajoutée (*Esakkiraj et al., 2011*).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'optimisation de la production des protéases par fermentation sur milieu solide à base de divers substrats riches en carbohydrates et en protéines à savoir: le son de blé , le son de riz , les déchets agricoles.

Un plan de travail est adopté pour explorer cet objectif est subdivisé en quatre parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique relatant des généralités sur les levures et leur importance dans la production des enzymes : protéases appliqués dans plusieurs secteurs industriels.

-La deuxième partie expérimental mettant au point le matériel et les méthodes utilisés pour la préparation des substrats de fermentation , la production des protéases par divers micro-organismes selon la culture en milieu solide à base de déchets: le son de blé , le son de riz , les déchets agricoles.Suivi par une application industrielle .

-Une comparaison basée sur les résultats des travaux antérieurs est entreprise dans la discussion générale .

-Le manuscrit est clôturé par une conclusion générale .

Etude bibliographique

Chapitre01

Les levures

1- Les levures

1-1- Généralités sur les levures

Une levure est un micro-organisme eucaryote unicellulaire qui appartient au domaine des champignons microscopiques (*Kurtzman et Fall, 2006*), non photosynthétique de forme ovoïde ou sphérique. Toutes les levures sont capables de convertir le sucre en alcool et en dioxyde de carbone. Elles ont besoin de nourriture, de chaleur et d'humidité pour prospérer. Comme la levure de boulanger (Figure 1), La température optimale pour son action est comprise entre 24 et 30°C et L'acidité optimale se situe entre un pH de 4,5 et 6.

Le ph du pain réalisé sur direct se situe vers 5,6 et 5,7 et Le sel et les sucres simples augmentent la pression osmotique, ils modifient sont l'activité. Le sel diminue progressivement l'activité de cette levure avec l'augmentation de sa concentration, Le sucre jusqu'à faible concentration (5%) active la fermentation, mais au-delà de 10% il la réduit, car la pression osmotique se trouve trop forte.

Les levures se développent, soit en surface, soit en profondeur des aliments (milieux solides ou liquides) (*Fao, 2007*).



Figure 1 : Cellule de levure de boulanger au microscope (*Michel ,2010*)

1-2-Morphologie

Les cellules sont de taille d'environ 20 µm en longueur et de 1 à 10 µm en largeur (*Gournier et al. 1994*).

La cellule Levurienne est une cellule typique d'eucaryote comprenant une paroi rigide, un noyau limité par une membrane nucléaire, un cytoplasme contenant divers organites et inclusions dont des mitochondries et une grande vacuole.

La paroi des Levures représente de 6 à 30 p. 100 du poids de la cellule, sa rigidité lui confère une forme propre.

Elle est constituée d'au moins trois couches dont la composition chimique diffère de celles des cellules végétales aussi bien que de celle des bactéries.

Elle est sphérique, ovoïde, globuleuse, cylindrique, ellipsoïde, allongée, apiculée, ogivale, triangulaire ou en forme de bouteille (*Walker, 2009 ; Kutzman et al. 2011*).

Les levures présentent une structure plus complexe que celle des bactéries notamment par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de Golgi et de plus d'un chromosome (*saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes) (*Labrecque, 2003*).

1-3-Reproduction

Les levures ont un mode de multiplication bien spécial. Elles se reproduisent aussi bien par un cycle asexué (végétatif) que par un cycle sexué (sporulation) en fonction des conditions favorables ou défavorables du milieu (*Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997*). Pour la plupart des levures, la reproduction asexuée est la forme majeure de multiplication (*Bonaly, 1991*). Elle s'effectue par bourgeonnement ou par fission (scissiparité) à partir d'une cellule mère.

Les ascomycètes qui se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose.

Les basidiomycètes qui réalisent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.

Les deutéromycètes regroupent l'ensemble des levures ne présentant pas de mode connu de reproduction sexuée.

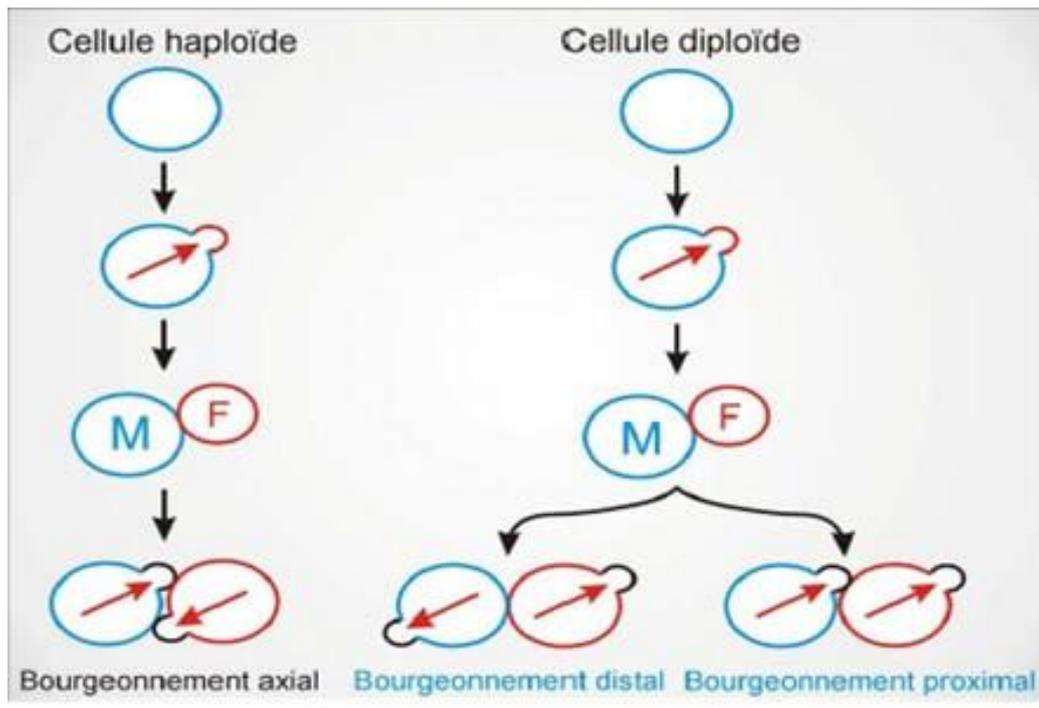


Figure 2: Division des levures par bourgeoisement

(Leclerc et al., 1995)

1-4-Classification

La taxonomie est la caractérisation et la distinction des taxons (espèces) basées sur l'observation des caractères précis. C'est reconnaître les individus qui ressemblent au point de former un ensemble homogène par des caractères communs et différent d'autre ensembles d'individus par d'autre caractères. (Kiffer et Morelet, 1997).

En particulier de nouveaux critères taxonomiques comme la composition en base de l'ADN, la structure de la paroi, le type de coenzyme sont pris en compte pour permettre des études plus importantes.

Selon le mode de reproduction on peut classer les levures en 3 classes :

1-4-1-Les Ascomycota (Ascomycètes)

Les Ascomycètes se reproduisent par un processus sexué forment le groupe d'eumycète qui contient le plus grand nombre d'espèces, Leurs méiospores sont produites à l'intérieur d'un sac ou asque (d'où leur nom d'ascospores).

1-4-2-Les Basidiomycota

Les basidiomycètes présentent une reproduction sexuée, regroupent environ un tiers des espèces de champignons supérieurs. Ils sont caractérisés par le fait que les méiospores sont externes appelé les basidiospores.

1-4-3- Les Deutéromycètes

Un ensemble de levures regroupant les formes asexuées des Dicyariomycota, ne se multipliant que par reproduction végétative. Ce sont des Ascomycètes au stade anamorphe (asexué); quelques-uns sont des basidiomycètes (*Tortora et al., 2007*).

1-5- Levure Candida

Candida lusitaniae Levure hétérothallique de forme variable ronde à allongée, non pigmentée, caractérisé par un mode de reproduction posé sur le bourgeonnement multilatéral.

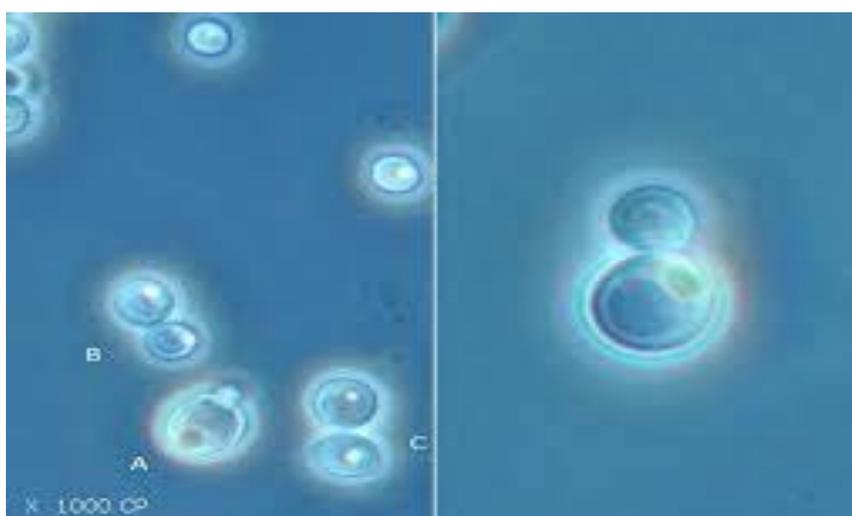


Figure 3 : Cellule de la levure *Candida* Sp

(Mikroskopia.com, 2013)

1-5-1-Taxonomie de la levure *Candida Sp*

Kurtzman (2011) décrit la classification de *Clavispora lusitaniae* suivante :

Tableau1 : Classification de *Clavispora lusitaniae* (Kurtzman,. 2011)

Règne	Champignon
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Saccharomycotina
classe	Saccharomycetes
Ordre	Saccharomycétales
Famille	Metschnikowiaceae
Genre	<i>Clavispora</i>
Espèce	<i>lusitaniae</i>

1-5-2-Habitat

- Les infections chez l'homme résultent le plus souvent d'une autocontamination par le foyer digestif.
- La levure *Candida* est isolée à partir d'une large gamme de substrats dans le sol, l'air et dans les végétaux, Les levures des produits alimentaires Elle trouve dans le tube digestif et les voies génitales de l'homme, des mammifères et des oiseaux, et aussi retrouvée dans l'environnement à moins d'une contamination par l'homme ou l'animal (Lachance, 2011).

1-5-3- Conditions de croissance

Les Levures, comme tous les Champignons, sont hétérotrophes et exigent donc du carbone organique. Certaines se contentent de glucose, d'autres demandent en outre vitamines, amino-acides... Leurs besoins azotés sont généralement couverts par des sels d'ammonium, mais d'autres substances peuvent être utilisées : acides aminés, urée..., ou même les nitrates (cas de *Hansenula*). Les Levures peuvent, selon les espèces, tirer profit de divers glucides, mais elles sont rarement capables d'attaquer des polysides (inuline, amidon).

- **Source de carbone et d'énergie**
- **Source d'azote**
- **Oligoéléments et vitamines**
- **Température**
- **pH**
- **Respiration et fermentation**
- **Pression osmotique et l'activité d'eau (A_w)**

Tableau 2 : Les Conditions de croissances

Condition	
Source de carbone et d'énergie	Les levures ont besoin de sources carbonées et de précurseurs pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés comme les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques... (<i>Brou, 2018 ; Soong et al., 2019</i>)
Source d'azote	Les levures sont capables d'assimiler des sources d'azotes : Les sources organiques influence la croissance et l'activité fermentaire des levures (<i>Morge et al., 2017</i>)

	<p>Des sources inorganiques pour la biosynthèse de constituants cellulaires (<i>Gobert, 2019</i>)</p>
Oligoéléments et vitamines	<p>Sont présents en très faibles quantités ils sont importants pour le métabolisme des levures.</p> <p>Les éléments minéraux sont des constituants des métalloenzymes intervenant dans les voies métaboliques.</p> <p>Les vitamines agissent sur la multiplication et l'activité cellulaire (<i>Brou, 2018</i>).</p>
Température	<p>La température influence les réactions biologiques. La température de culture des levures se situe entre 35 et 45°C pour leur assurer une croissance adéquate.</p> <p>Les levures thermophiles ont besoin d'une température élevée pour vivre qui peut aller jusqu'à 95°C (<i>Vazquez et al, 2019 ; Liszkowska et Berłowska, 2021</i>).</p> <p>Les levures mésophiles (<i>Buzzini et al, 2018</i>), tandis que les levures psychrophiles ont une température maximale de croissance entre 5°C et 20°C.</p>
pH	<p>Le pH a également une influence sur le développement des levures qui ont tendance à coloniser des environnements acides et par leurs activités métaboliques acidifiant encore plus le milieu.</p> <p>Les levures tolèrent une large gamme de pH allant de 2,4 à 8,6. Leur croissance optimale se fait à des pH allant de 4 à 6,5 (<i>Chniti, 2017</i>)</p>
Respiration et fermentation	<p>Il est important de noter que ces processus sont principalement réglés par des facteurs environnementaux (<i>Ata et al., 2018</i>). toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène aérobie strict (<i>Moreira,2019</i>) D'autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant un métabolisme soit fermentaire soit respiratoire. (<i>syn. Pichia pastoris</i>) (<i>Ata et al., 2018</i>)</p>

**Pression osmotique
et l'activité d'eau
(Aw)**

Varie d'une souche à une autre. La plupart des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Certaines tolèrent correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60 mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes, car elles sont capables de synthétiser des osmoprotecteurs (bétaine et glycérol) (*Houdaya, 2015 ; Dali et Hamame, 2016*).

Chapitre 02

Les enzymes protéolytiques

1-Les protéases

Les protéases sont d'importants biocatalyseurs industriels qui constituent le plus grand groupe d'enzymes agissant comme protéinases, peptidases et amidases avec une large gamme d'applications industrielles.

Par ailleurs, la part du marché mondial prise par les enzymes est de 28% pour les glucanases 13% pour l'alpha-amylase dont 59% pour les protéases.

1-1- Définition

Les protéases peptidases, protéinases ou enzymes protéolytiques. 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*, . 2008b).

Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux (*Pelmont, 1995*). Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulateurs plus spécifiques (*Kumar et al*, . 2008a).

1-2-Source des protéases (les origines des protéases)

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

Protéases animales

Les protéases d'origine animale les plus familières sont la chymotrypsine, la trypsine pancréatique, l'élastase, la pepsine, la rennine (*Monteiro, 2015*)

Protéases de plantes (végétale)

Papaine, bromélaïne, kératinases et ficine sont certaines des protéases les plus connues.

Protéases microbiennes

La communauté microbienne est privilégiée par rapport aux animaux et aux plantes pour la production de protéases à grande échelle, en raison de leur croissance rapide et de la simplicité de leur cycle de vie pour la génération de nouvelles enzymes recombinantes avec des propriétés modifiées. Les protéases microbiennes représentent les 2/3 de la production commerciale de protéases et jouent un rôle capital dans les détergents, l'industrie pharmaceutique, l'industrie agricole et du cuir.

1-3-Classification et nomenclature

Les protéases sont classées selon la gamme du PH dans laquelle leur activité est optimale, en protéases acides, neutres et alcalines (*Kumar et al., 2008b*).

Tableau 03: Classification et nomenclature des protéases

(*Rao et al., 1998*)

Type de protéase	Classes	Sous classes
Exopeptidases	Aminopeptidases	Peptidyle peptidases
		Dipeptidyle peptidases
		Tripeptidyle peptidases
	Carboxypeptidases	Sérine carboxypeptidases
		Metallocoarboxypeptidases
		Cystéine carboxypeptidases
Endopeptidases	Protéases sérines (EC 3.4.21.X)	
	Protéases cystéines ou protéases thiols (EC 3.4.22.X)	
	Protéases aspartiques ou protéases acides (EC 3.4.23.X)	
	Métalloprotéases (EC 3.4.24.X) (<i>Kumar et al, 2008b</i>)	

1-4-Applications des protéases

Tableau 04: Les différentes applications des protéases

Applications	Principe
1 / Applications alimentaires	<ul style="list-style-type: none">• Fromageries (les protéases elles sont utiles pour la coagulation des protéines du lait ; Les protéases fongiques acides, alcalines et neutres ont également été utilisées en industrie laitière (<i>Aguilar et al., 2008</i>)).• Boulangeries (ont également été utilisées en industrie laitière qu'il contient dans la farine de blé utilisé en boulangerie (<i>Aguilar et al., 2008</i>). des protéases d'origine bactérienne sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte.• Produits à base de soja (Des protéases neutres et alcalines sont utilisées pour préparer la sauce de soja Le traitement des protéines du soja par la protéase alcaline à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats de protéines solubles qui sont utilisés comme additifs protéiniques dans l'alimentation. (<i>Lakba et Soucha, 2015</i>)).• Synthèse de l'aspartam (les protéases elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse, parfois une préparation de thermolysine est utilisée pour la synthèse de l'aspartam à partir de l'acide L'aspartique et de la Lphénylalanine méthyle ester Il est produit industriellement par Toya Soda (Japon) (<i>Leisola et al., 2001, Belmessikh, 2011, Zemmouri et Zemmouri, 2017</i>)).

<p>2 / Industrie des détergents</p>	<ul style="list-style-type: none">• 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 élevées et en présence des agents oxydants additionnés (<i>Chellappan et al., 2006 ; Mukherjee et al., 2008</i>).• Aujourd'hui, toutes les protéases des détergents actuellement commercialisés sont des protéases à sérines produites par <i>Bacillus sp</i> (<i>Sine, 2010 ; Singh et al., 2016</i>).
<p>3/Domaine pharmaceutique et médicale</p>	<ul style="list-style-type: none">• Exemple : des protéases d'<i>Aspergillus oryzae</i> sont utilisées comme aide digestif chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. L'asparaginase provenant d'<i>E. coli</i> est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie (<i>Gupta et al., 2002, Belmesikh, 2011</i>).
<p>4 /Tanneries</p>	<ul style="list-style-type: none">• Les protéases sont utilisées pour leur capacité à libérer les poils et la laine des peaux. Cette opération se fait à des pH élevés, et nécessite donc des protéases alcalines, comme celles produites par <i>Bacillus licheniformis</i>. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques.
<p>5 /Traitement des eaux usées industrielles</p>	<ul style="list-style-type: none">• Les protéases considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. Les enzymes protéolytiques de <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Bacillus amyliquefaciens</i>, <i>Streptomyces sp</i> et de différentes souches d'<i>Aspergillus</i> sont actuellement utilisées dans ce domaine (<i>Gupta et al., 2002 ; Hernandez et al., 2006</i>).

6/Autres applications

- La protéase neutre peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Ils sont employés aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (Loudjani et Belmerabet, 2016).

1-5-Mécanisme d'action des protéases

a. Protéases à sérines

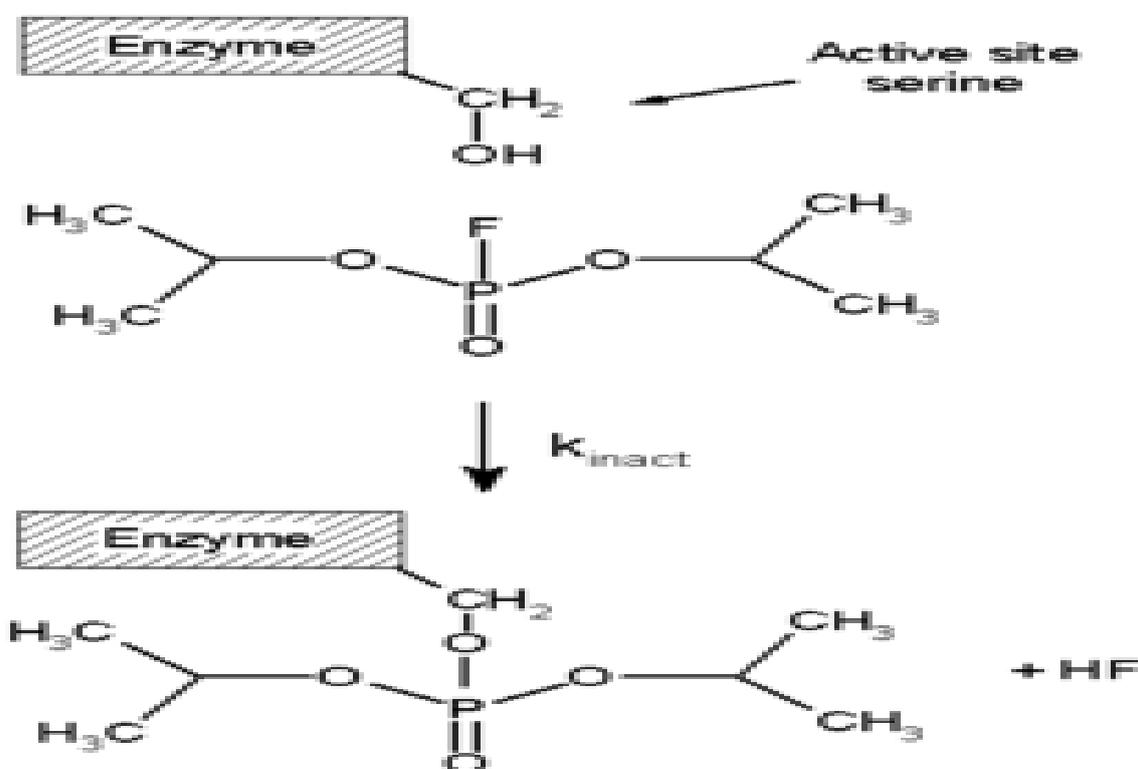


Figure 04 : Protéases à sérines (EC 3.4.21)

Les protéases à sérine jouissent d'une grande diversité dans la nature, se produisant non seulement dans l'ensemble du règne des organismes cellulaires, mais également présentes dans de nombreux génomes viraux, Parmi les enzymes protéolytiques connues, un tiers d'entre elles sont des protéases à sérine.

Le groupement OH de la sérine attaque le groupement carbonyle et l'azote de l'histidine accepte le OH de la sérine. Une association enzyme-substrat intermédiaire tétraédrique se forme. Puis, l'enzyme est acylée et le premier produit d'hydrolyse est libéré. Dans une réaction finale l'enzyme est décalée et l'extrémité C-terminale est libérée (Lopez, 2008).

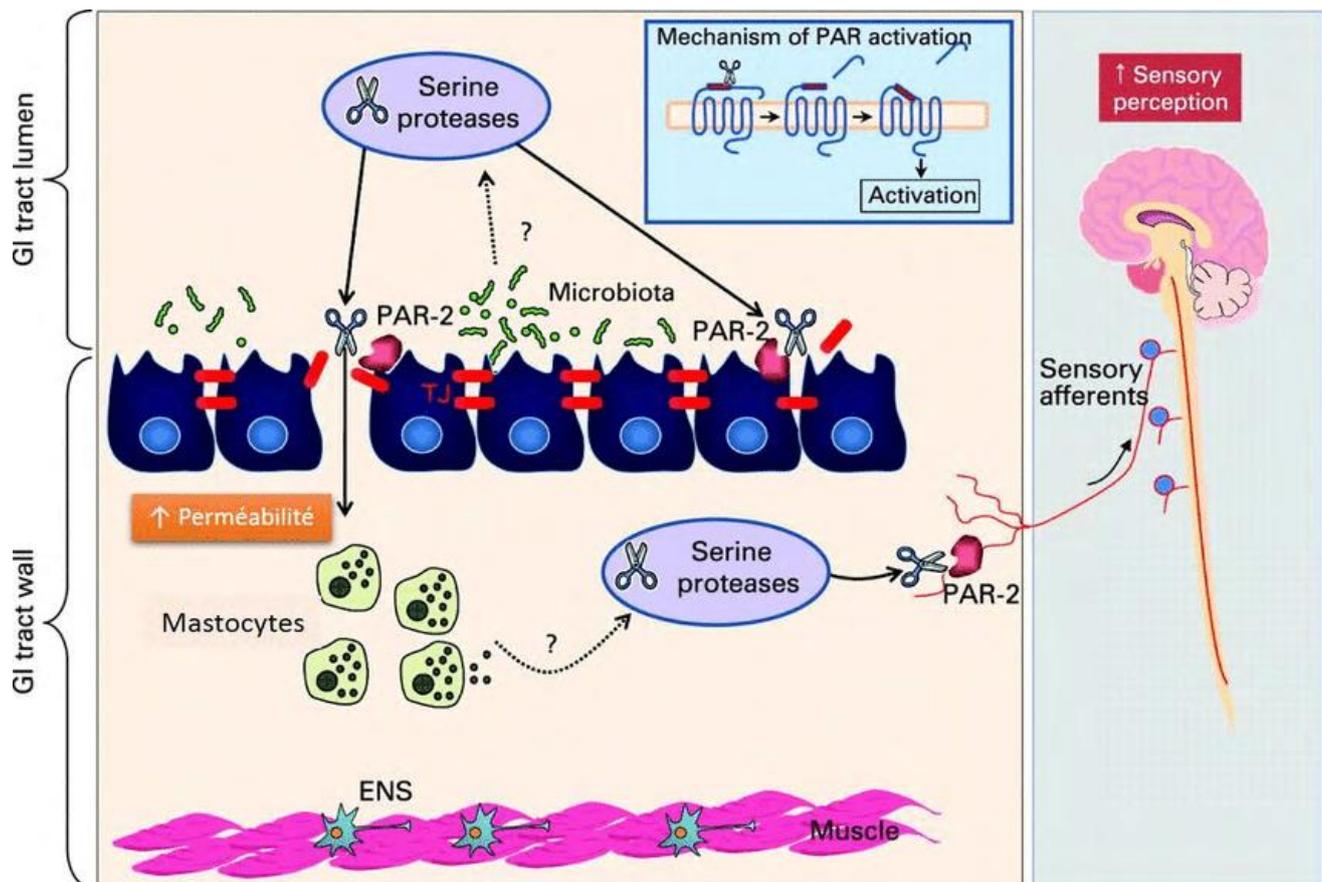


Figure 05: Mécanisme réactionnel des protéases à sérine

(Barbara and Cremon., 2008)

b. Cystéylprotéases

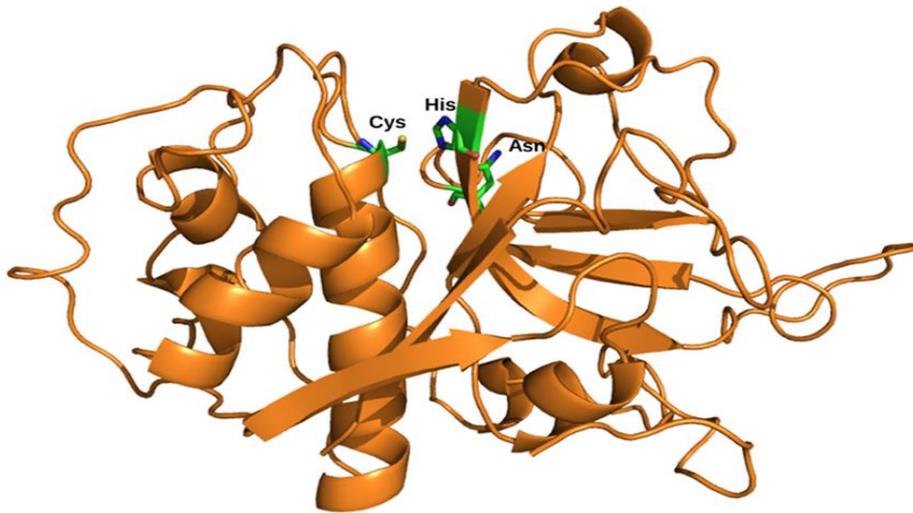


Figure 06: Protéase à cystéine (*Rajnikant, 2016*)

Le site actif de cette classe de protéases est constitué de résidus cystéine, pas du mécanisme catalytique et pas consiste en une attaque nucléophile du soufre anionique de la cystéine sur le groupe carbonyle du substrat.

L'histidine dans la protéase est restaurée sous sa forme deprotonisé et un intermédiaire thioester lie l'extrémité carboxyterminale du substrat à la cystéine. La liaison thioester est hydrolysée pour générer un acide carboxy-terminal et l'enzyme est restaurée (*Lopez, 2008*).

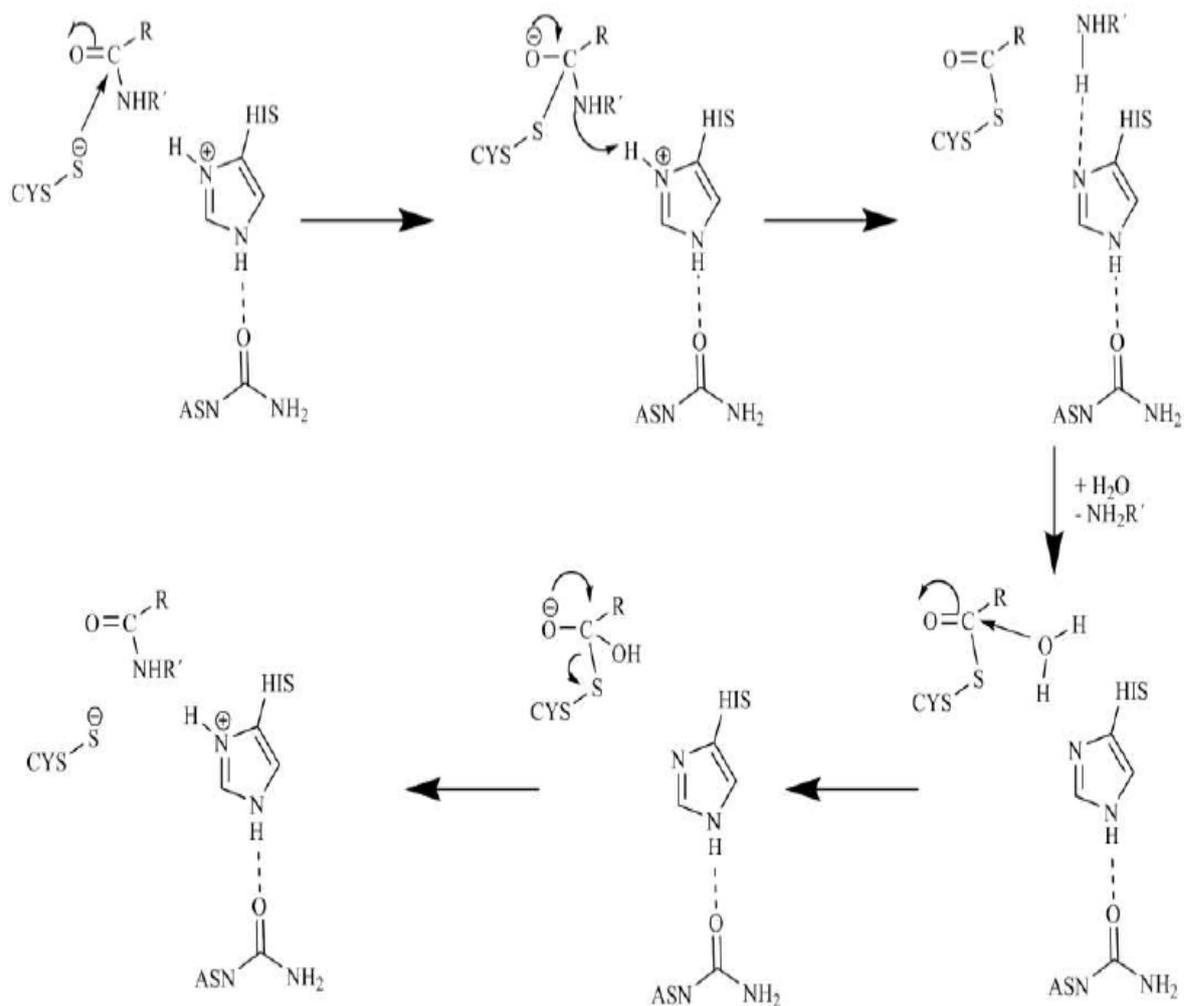


Figure 07: Mécanisme de réaction schématique de la cystéine protéase

c. Aspartylprotéases

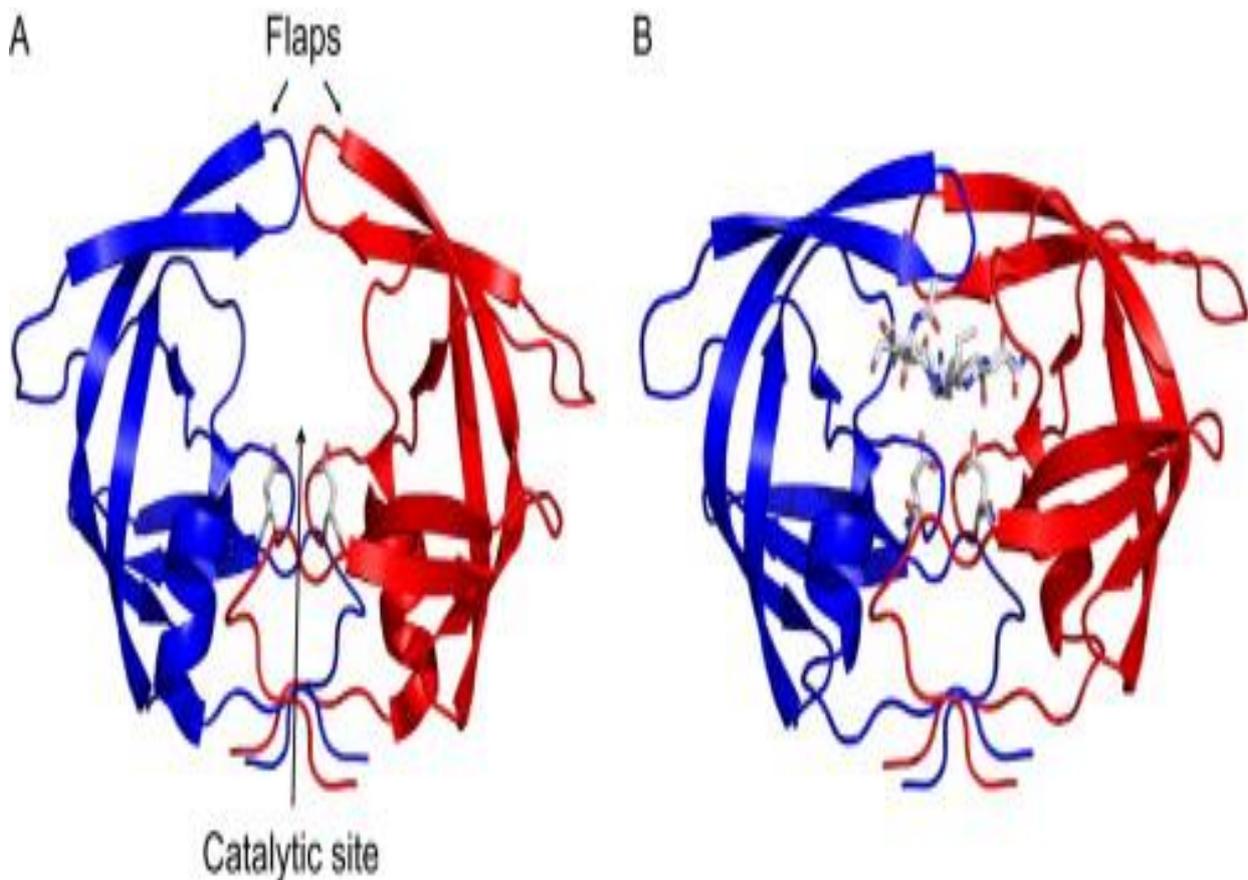


Figure 08: Aspartate Protéase (*Park et al., 2007*)

Une peptidase qui utilise un résidu d'aspartate pour catalyser les réactions affectant leur substrat peptidique. Ces protéases sont bilobées ayant un site catalytique central, qui est composé d'une paire d'aspartates. Ces protéases fonctionnent sur un pH acide et ont montré leur apparition chez les animaux, les plantes et les micro-organismes.

Le mécanisme d'action des Aspartylprotéases est généralement de type acide-base, basé sur la coordination d'une molécule d'eau entre les deux aspartates du site actif.

Un aspartate active la molécule d'eau par soustraction d'un proton. Cette activation de la molécule d'eau permet une modification du carbone carbonyle du substrat dans la liaison à cliver générant un oxyanion intermédiaire. C'est le réarrangement de cet oxyanion qui permet le clivage (*Lopez, 2008*).

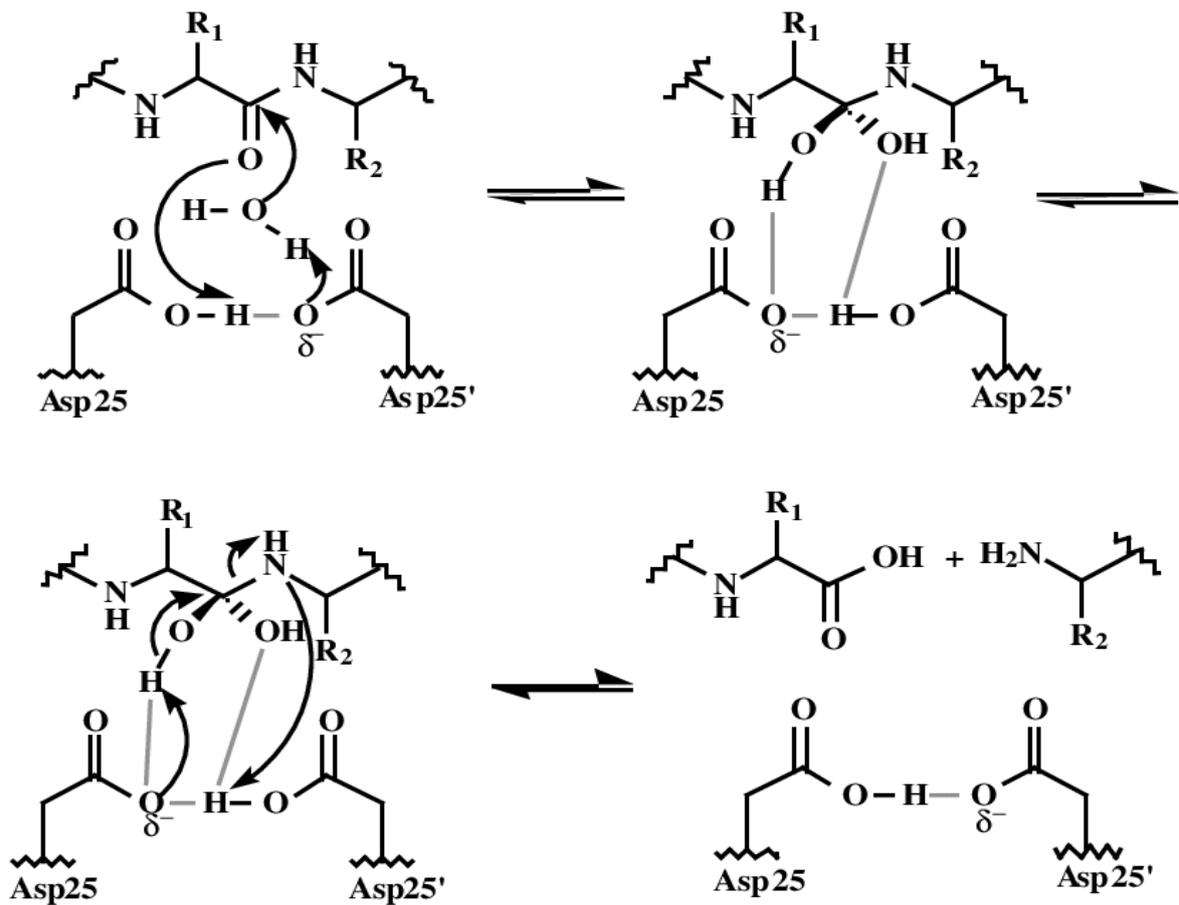


Figure 9 : Représentation schématique du mécanisme catalytique de la protéase de l'acide aspartique

d. Métalloprotéases

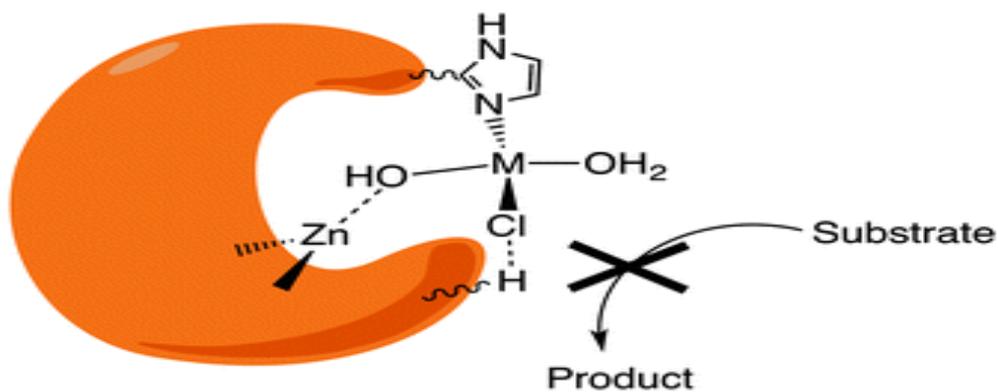


Figure 10: Structure des Métalloprotéases (*Issue 8, 2014*).

Les Métalloprotéases sont principalement des endopeptidases contenant du zinc. Ces enzymes ont un pH optimal allant de 5 à 9, et sont sensibles aux agents chélateurs de métaux tels que l'EDTA mais sont insensibles aux inhibiteurs de la cystéine ou au sulfhydryle (Theron *et al.*, 2014).

Le mécanisme d'action des Métalloprotéases se fait en trois étapes :

- ✓ L'histidine est rendu plus basique grâce à l'acide aspartique (protéase a serine). L'histidine active une molécule d'eau qui attaque la liaison peptidique.
- ✓ Le zinc stabilise l'état intermédiaire SP3 et négatif (stabilisation de l'oxyanion). La partie C terminale se dissocie et le proton de l'histidine est transféré vers l'azote de la liaison peptidique.
- ✓ L'azote N-terminale est basique, le groupe carboxylique C-terminale est acide. Comme la réaction est rapide, il y a échange de protons entre ses deux groupes.

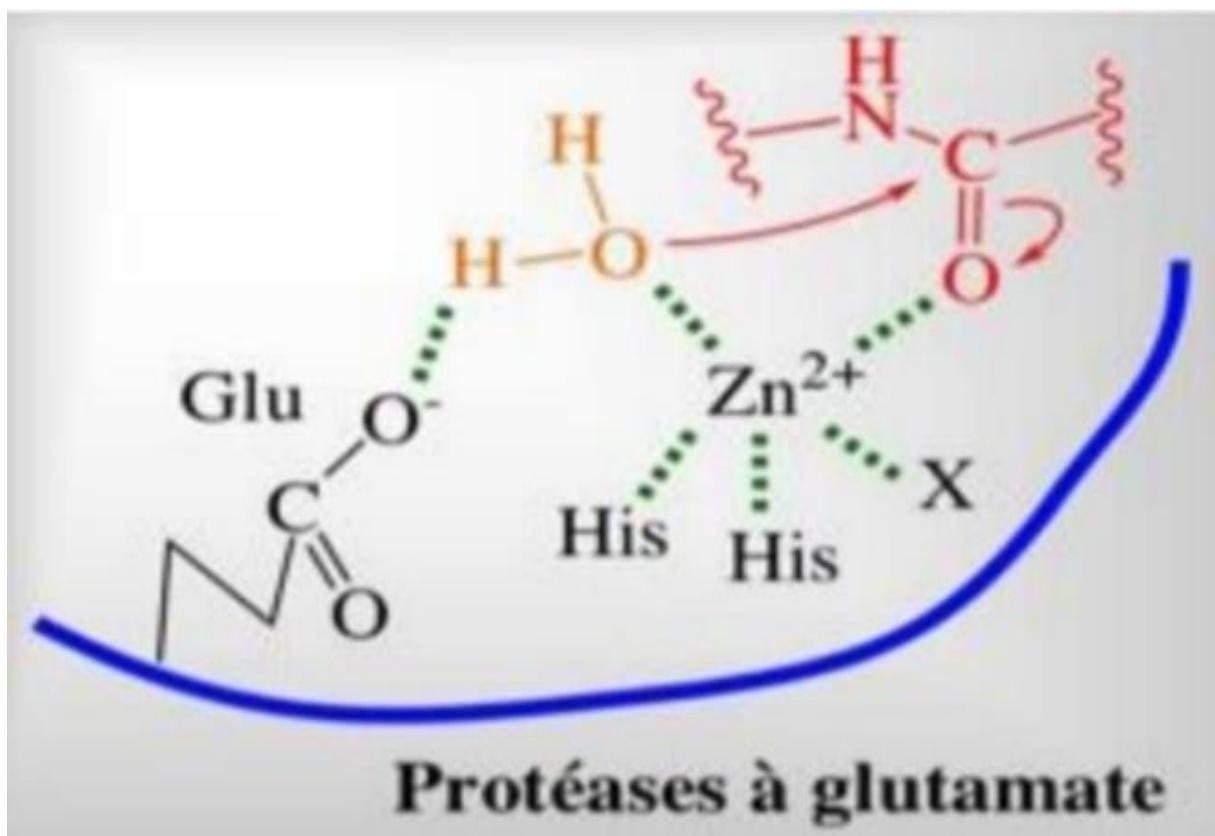


Figure 11 : Mécanisme réactionnel des Métalloprotéases

(Chabriere, 2010).

1-6- Dosage de l'activité protéolytique :

Tableau05 : Méthodes de dosage de l'activité protéolytique

Méthodes	principe de méthode	Référence
Développements récents dans les dosages d'activité de protéase et les capteurs.	<ul style="list-style-type: none">- Les dosages de protéases hétérogènes nécessitent l'immobilisation de substrats de protéase sur des surfaces solides. Ces surfaces permettent protéases dans la phase aqueuse pour interagir avec les substrats immobilisés et un grand nombre de substrats peuvent être immobilisé sur la même plate-forme pour la détection multiplex applications.- Ceci est possible en tant que signaux optiques ou de fluorescence à des emplacements discrets peuvent être identifiés et associés à une protéase spécifique. Une considération importante pour le test hétérogène est le choix de plates-formes solides pour le signal lectures. Par exemple, les capteurs électrochimiques nécessitent surfaces conductrices comme les métaux, tandis que les capteurs colorimétriques nécessitent généralement des plates-formes optiquement transparentes comme le verre. Ainsi, une conception soignée des substrats peptidiques est nécessaire pour s'assurer que des groupes fonctionnels sont présents pour l'immobilisation covalente de peptides sur ces surfaces.	<i>(I.L.H. Ong et Yang, Analyst, 2017)</i>

<p>Une nouvelle méthode pour doser la protéase basée sur le mauvais repliement de l'amyloïde: application au diagnostic du cancer de la prostate à l'aide d'un panel de biomarqueurs de protéases.</p>	<p>-Essai d'activité de protéase La procédure de dosage décrite ci-dessous a d'abord été vérifiée en utilisant EIS enregistrant la modification par étapes de l'électrode pendant la procédure de dosage. La matriptase est ici employée comme cible modèle.</p> <p>Tout d'abord, des échantillons standard ou de sérum contenant de la protéase ont été incubés avec l'électrode à 37°C. Un rinçage soigneux de l'électrode avec de l'eau bi distillée et une incubation avec 5 % de Tween-20 ont été effectués pour exclure une absorption non spécifique. Ensuite, l'électrode clivée a été incubée avec 300 µM d'amyloïde-bêta, 100 µM de peroxy-nitrite, dans du PBS 10 mM (pH 5, 0) pendant 75 min à température ambiante pour le mauvais repliement de l'amyloïde-bêta. Après cela, l'électrode a de nouveau été soigneusement rincée avec de l'eau bi distillée, puis plongée dans du Tween-20 à 5 % pendant 30 min. L'électrode était enfin prête pour la mesure.</p>	<p>(Hao et al, 2014)</p>
<p>Une nouvelle méthode de dosage de l'activité de la protéase basée sur une protéine auto-inhibée modifiée utilisant un immun dosage enzymatique.</p>	<p>-Dosage de l'activité de la protéase : MMP2 (Matrix Metallopeptidase 2) a été dilué à 100µg/ml et activé dans le MMP2 tampon d'activation. Capteur MMP2 a été incubé avec différentes concentrations de la forme active, et les réactions ont été arrêtées en ajoutant l'inhibiteur de MMP2 III. Caspase-3 était une forme active et a donc été utilisée sans prétraitement supplémentaire.</p> <p>Capteur Caspase-3 (finale conc. 20µM) a été incubé avec différentes concentrations, et les</p>	<p>(Hyun et Tae, 2013)</p>

	<p>réactions ont été arrêtées en ajoutant inhibiteur de caspase-3 I à 200 nM.</p> <p>- Les mélanges réactionnels ont été dilués 10 fois dans une solution de dilution pour ELISA ou analysés en utilisant SDS-PAGE. Pour examiner l'effet du sérum sur la méthode de dosage de la protéase, le sérum de souris (<i>Abcam, Royaume-Uni</i>) a été inactivé par incubation à 60°C pendant 1 h. Le sérum était centrifugé à 15 000 rpm pendant 30 m pour éliminer les insolubles composants, puis le surnageant a été immédiatement congelé. Le sérum de souris inactivé a été dilué 10 fois dans un tampon de dosage de protéase avec une quantité connue de protéase (MMP2 ou caspase-3), et les mélanges réactionnels ont été analysés par ELISA.</p>	
--	---	--

1-7-Facteurs influençant l'activité enzymatique

Un changement dans les conditions environnementales, tel que la température, le pH et la présence d'inhibiteurs enzymatiques, peut influencer l'activité enzymatique ce qui représente l'efficacité de l'enzyme. De plus, la concentration en substrat et en enzymes influence également l'activité enzymatique.

❖ Température

Une augmentation de la température augmente la vitesse de déplacement des molécules qui, par conséquent, augmentera le nombre de collisions faite entre les substrats et les enzymes, chaleur nuit à l'activité enzymatique en brisant les liaisons entre les acides aminés de l'enzyme comme les ponts hydrogène et les liaisons ioniques qui maintiennent la conformation de l'enzyme.

Une réduction de la température ralentit l'agitation moléculaire et, par conséquent, la possibilité de rencontre entre l'enzyme et son substrat, La vitesse enzymatique diminue, car les enzymes se lient rarement au substrat. Les enzymes possèdent une température pour laquelle elles sont les plus efficaces (*Bluteau, 2021*).

Les enzymes n'ont pas toutes la même température optimale, mais la plupart d'entre elles qui agissent dans le corps humain ont une température optimale de 37,5°C (*Nagwa 2022*).

❖ pH

Dépendamment du pH du milieu, la forme cationique, chargée positivement, ou la forme anionique, chargée négativement, des acides aminés sera favorisée. Cela influence les interactions entre les acides aminés de charge opposée ce qui peut entraîner des changements de la forme de l'enzyme dans la structure tertiaire et quaternaire. L'enzyme n'est plus en mesure d'accueillir le substrat au site actif. Ainsi, un pH inférieur ou supérieur à celui optimal conduit à une activité enzymatique moindre. (*Bluteau, 2021*).

Bien que de nombreuses enzymes dans le corps humain aient un pH optimal de 7, les enzymes n'ont pas toutes le même pH optimal (*Nagwa 2022*).

❖ Concentration en substrat et en enzyme

L'augmentation de la concentration en substrat amène une augmentation de la vitesse de la réaction jusqu'à ce qu'il y ait une saturation.

Une fois que tous les sites actifs de l'enzyme sont utilisés, augmenter la concentration en substrat n'aura plus d'effet positif sur la vitesse de réaction puisqu'il n'y a plus de sites actifs de libres pour les substrats supplémentaires, Dans cette situation, l'augmentation de la concentration d'enzymes permettrait d'avoir plus de sites actifs disponibles à accueillir des substrats.

❖ Inhibiteurs enzymatiques

Il existe des inhibiteurs compétitifs qui prennent une forme similaire au substrat et s'installe au site actif. L'enzyme ne peut pas compléter de réaction et l'activité

enzymatique est réduite. Il existe des inhibiteurs non compétitifs qui déforment le site actif en étant lié ailleurs sur l'enzyme, donc l'efficacité est moindre (Bluteau, 2021).

Si ces effets inhibiteurs se produisent à grande échelle sur de nombreuses enzymes impliquées dans une réaction, cela peut réduire considérablement la vitesse des réactions enzymatiques. Par conséquent, une augmentation de la concentration d'inhibiteurs enzymatiques diminuera également la vitesse de réaction.

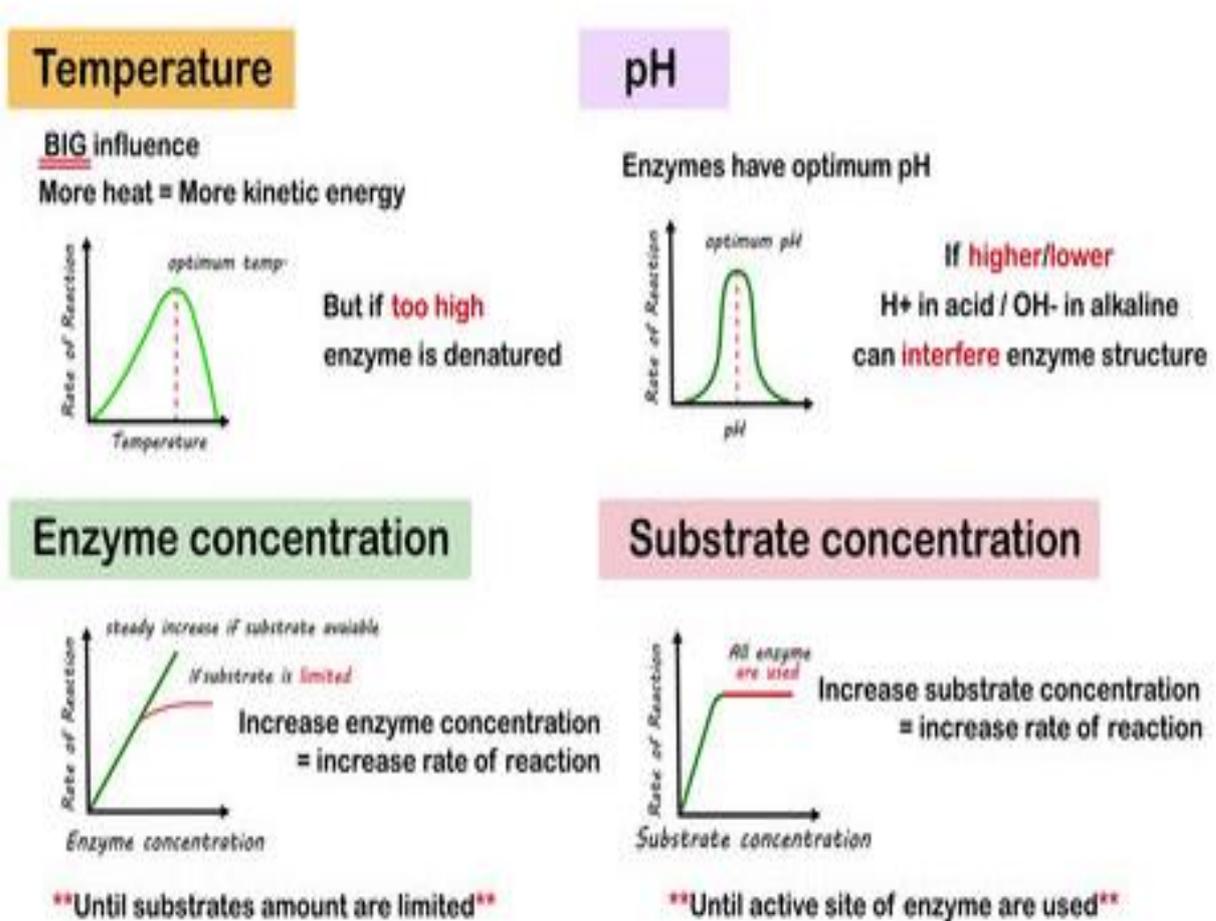


Figure 12 : Facteurs influencant l'activité enzymatique

(Bluteau, 2021)

CHAPITRE 03

La production des protéase

1- Fermentation

A nature de la fermentation, solide ou liquide (submergée), influe divers aspects de la croissance des microorganismes ainsi que la production des substances d'intérêt (*Sumantha et al., 2005*)

1-1- Fermentation en milieu liquide (FML)

La fermentation en milieu liquide est particulièrement bien adaptée aux cultures des micro-organismes unicellulaires, comme les bactéries et les levures. (*Technique - l'ingenieurs.fr*).

Ce type de fermentation a été traditionnellement utilisé pour la production industrielle des enzymes, en raison de la facilité de contrôle des différents paramètres comme le pH, la température, l'aération, l'oxygène dissous et l'humidité (*Singhania et al., 2009*).



Figure 13: Milieu de culture de FML

1-2- Fermentation en milieu solide (FMS)

La fermentation en milieu ou en phase solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes.

D'un point de vue fondamental, la fermentation en milieu solide est définie comme une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou presque d'eau libre. Les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules. Le développement des champignons filamenteux en fermentation solide se fait par extension et ramification des filaments formant le mycelium (*Rahardjo et al., 2006*).



Figure 14: Milieu de culture de FMS

Les premières applications non alimentaires ont été pour la production d'enzymes essentiellement pour la production des enzymes hydrolysant les polymères végétaux.

La production des différents métabolites est beaucoup plus importante dans les procédés en FMS comparée à celle des cultures submergées (*Thomas et al., 2013*).

1-2-1-Avantages et inconvénients

La fermentation en milieu solide présente une multitude d'avantages par rapport à la fermentation en milieu liquide (*Pandey et Soccol, 2000, Djama et Abdelilah, 2018*) Et présente également de nombreux inconvénients :

Tableau 06: Avantages et inconvénients de la FMS

Les avantages	Les inconvénients
<ul style="list-style-type: none">~ une productivité volumique 10 à 100 fois plus importante que la fermentation en milieu liquide (<i>Le Blog de Vitagora 2017</i>)~ Le support est simple, facilement disponible et peu coûteux~ Les substrats nécessitent moins de prétraitement que les milieux liquides.~ L'aération forcée est souvent plus facile. Équipement de fermentation simple.~ Productivité volumétrique élevée.~ Matériels utilisés moins complexes d'où réduction des coûts.~ Absence d'un contrôle rigoureux des paramètres de la fermentation.~ Réduction de l'énergie requise.	<ul style="list-style-type: none">~ Un faible taux d'humidité peut limiter la croissance des micro-organismes.~ Difficultés à surveiller les paramètres du processus.~ Choix limité des microorganismes utilisables en raison du faible taux d'humidité.~ Transfert limité de chaleur et de masse, ce qui impose une certaine porosité du substrat.~ Difficulté de régulation de certains paramètres tels que le pH.

1-2-2- Paramètres de contrôle de FMS

1-2-2-1 La Température

La température est l'un des facteurs les plus difficiles à réguler en fermentation en milieu solide. Une mauvaise dissipation de la chaleur peut entraîner des gradients de température au sein du milieu de culture durant la fermentation et peut provoquer des déviations métaboliques, l'assèchement du milieu, la dégradation des produits sécrétés,

une diminution de la disponibilité des nutriments ou encore l'arrêt de la phase végétative au profit de la phase reproductive du champignon filamenteux (production de conidies).

Le contrôle de ce paramètre se fait généralement avec des thermo senseurs, des thermistances/thermistors ou des sondes métaboliques Pt par une mesure dans la couche solide et dans l'air entrant/sortant.(*Duchiron,,2013*).

1-2-2-2 Le Support

Le support est l'un des paramètres les plus importants en fermentation en milieu solide. Il doit être choisit avec attention en fonction de plusieurs facteurs comme la taille des particules, la porosité, la composition biochimique.

Ils sont classés en deux catégories, les supports inertes et organiques, et se présentent sous trois formes :

- Sous la forme de matériaux organiques naturels (amylacés ou lignocellulosiques). Ce sont généralement des sources de polymères insolubles, complexes et hétérogènes (bagasse, pulpes de betterave, paille, bois, son de blé, manioc,...). Ils servent à la fois de substrat (source de carbone) et de support.
- Sous la forme de matériaux synthétiques (mousse de polyuréthane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif.
- Sous la forme de matériaux minéraux (granulés d'argile, perlite, pouzzolane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif. (*Durand et Alani, 1988*).

1-2-2-3 L'humidité

En FMS, l'eau est présente sous deux formes : sous la forme d'eau complexée à l'intérieur de la matrice solide, et sous la forme d'une couche mince qui peut être absorbée à la surface des particules ou contenue dans les régions capillaires

La quantité d'eau à ajouter est en fonction de la capacité de rétention d'eau du substrat solide et de la nature du microorganisme. Cette teneur en eau doit être suffisante pour le métabolisme des champignons tout en gardant la matrice solide (pas d'écoulement d'eau) et sans affecter la porosité du substrat et par conséquent réduire les échanges gazeux (*Gervai et Bensoussan, 1994 ; Djama et Abdelilah, 2018*).

1-2-2-4 L'aération

L'aération est un facteur important en fermentation en milieu solide puisqu'elle va permettre :

- ~ l'oxygénation (surtout pour les organismes aérobies comme les champignons filamenteux).
- ~ la dissipation de la chaleur métabolique, et la régulation de la température du milieu et l'élimination des produits du métabolisme (CO₂, vapeur d'eau, composés volatils).
(*Raimbault, 1980*)

Au cours des FMS, l'aération des cultures se fait par injection d'air comprimé stérile à travers les fermenteurs à aération forcée. Son débit est fonction de la nature du microorganisme mis en jeu et de la porosité du substrat.

1-2-2-5 Le pH

Le pH est l'un des facteurs les plus difficiles à contrôler en FMS, en effet, au cours de la culture, l'activité métabolique des souches va modifier le pH du milieu soit en l'acidifiant, par la production d'acides ou par l'absorption d'ions ammonium, soit en l'alcalinisant, par la libération d'ammoniac provenant de la dégradation de protéines, d'urée ou d'autres amines (*Manpreet et al., 2005*).

Cependant, l'utilisation des tampons permet de résoudre ce problème ; par ailleurs, *Raimbault (1980)* et *Roussos (1985)* ont démontré qu'un mélange de sulfate d'ammonium et d'urée confère au milieu un pouvoir tampon et permet donc de maintenir le pH à des valeurs favorables à la croissance des microorganismes (*Djama et Abdelilah, 2018*).

2-Optimisation de la production des protéases

Le processus d'optimisation est un sujet d'importance centrale pour la production industrielle des enzymes. Dans le cas de la surproduction d'enzymes, les manipulations des milieux représentent la meilleure alternative aux manipulations génétiques (*Reddy et al., 2008*).

Les progrès dans la manipulation génétique des micro-organismes ouvrent de nouvelles possibilités pour l'introduction de changements prédéfinis résultant en la

production de protéases sur mesure avec de nouvelles et pour répondre aux exigences de la multitude d'applications de protéases avec des propriétés souhaitables.

2-1- Optimisation par le génie génétique

L'objectif du clonage des gènes des protéases bactériennes a été principalement la surproduction d'enzyme pour diverses applications commerciales dans les secteurs alimentaires, des détergents et des produits pharmaceutiques, La modification génétique directe (biotechnologie) englobe les méthodes les plus précises pour optimiser les microorganismes en vue de la production d'enzymes. Ces méthodes sont utilisées pour obtenir des organismes producteurs à haut rendement.

La virulence de plusieurs bactéries est liée à la sécrétion de plusieurs protéases extracellulaires. Le clonage des gènes de ces microbes a été étudié pour comprendre la base de leur pathogénicité et de développer des traitements correspondants_ Les protéases jouent un rôle important dans la physiologie cellulaire. Représente les gènes de protéases alcalines clonés dans différents microorganismes.

La biotechnologie donne également les outils pour transférer une séquence génétique d'un végétal, d'un animal ou d'un microorganisme à partir de laquelle la production à l'échelle commerciale n'est pas adéquate vers un microorganisme qui a un historique sécuritaire de production d'enzymes à des fins alimentaires.

Le progrès soutenu du génie génétique moderne repose sur un certain nombre de découvertes techniques importantes : le clonage, le clonage des gènes et le séquençage de l'ADN. (*Lesser, David Nash, 2009*).

2-1-Optimisation par les plans statistiques

Les modèles statistiques pour optimiser les composants et les conditions des milieux de cultures sont de plus en plus utilisés dans la biotechnologie actuelle grâce à son applicabilité facilitée par l'informatique (*Reddy et al., 2008*).

Il existe différent plans d'expériences utilisées pour la production de métabolites notamment les enzymes (*Hamma et Saoudi, 2016*).

~ Plans d'expériences de Plackett et Burman

Sont des conceptions expérimentales présentées en 1946 par Robin L. Plackett et J. P. Burman alors qu'ils travaillaient au ministère britannique de l'approvisionnement. Leur objectif était de trouver des modèles expérimentaux pour étudier la dépendance d'une certaine quantité mesurée sur un certain nombre de variables indépendantes (facteurs), chacun prenant n niveaux, de manière à minimiser la variance des estimations de ces dépendances en utilisant un nombre limité d'expériences. Les interactions entre les facteurs ont été considérées comme négligeables. Un plan factoriel complet satisferait à ce critère, mais l'idée était de trouver des plans plus petits.

Le plan d'expériences de Plackett et Burman est constitué de matrices carrées dites matrices d'Hadamard ne contenant que des éléments égaux à +1 ou -1, construites par permutation circulaire à partir d'un générateur de base.

Le plan de Plackett et Burman est un plan factoriel fractionné, et l'effet principal d'une telle conception peut être simplement calculé comme la différence entre la moyenne des mesures.

Effectuées au niveau haut (+1) du facteur et la moyenne des mesures effectuées au niveau bas (-1). Cela permet la détermination de l'effet de chaque facteur. Un grand contraste coefficient positif ou négatif indique qu'un facteur a un grand impact sur la réponse ; tandis qu'un coefficient proche de zéro signifie qu'un facteur a peu ou n'a pas d'effet (*Levin et al., 2005*).

Tableau 07: Plan de Plackett-Burman pour 12 essais et 11 facteurs à deux niveaux
Pour deux Xi quelconques, chaque combinaison (—, —, +, —, ++) apparaît trois - c'est-à-dire le même nombre de fois.

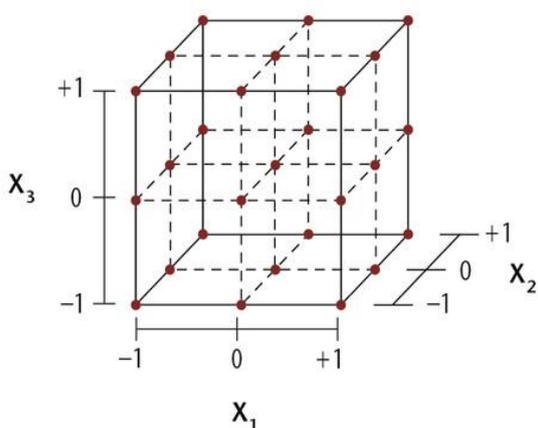
Run	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
3	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
4	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
5	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
6	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-
7	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
8	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
9	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
10	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
11	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
12	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-

~ **Plans des Box – Behnken**

C'est un plan qui peut comporter jusqu'à douze essais, auxquels on peut ajouter des points au centre. Les points expérimentaux du plan Box-Behnken sont représentés au milieu des arêtes de chacun des côtés d'un cube.

Ces plans ne possèdent pas de générateurs de plan simple (ils sont construits en combinant des plans factoriels à deux niveaux avec des plans incomplets de blocs), et possèdent des interactions confondues complexes.

Plan factoriel complet 3^K



Plan de Box-Behnken

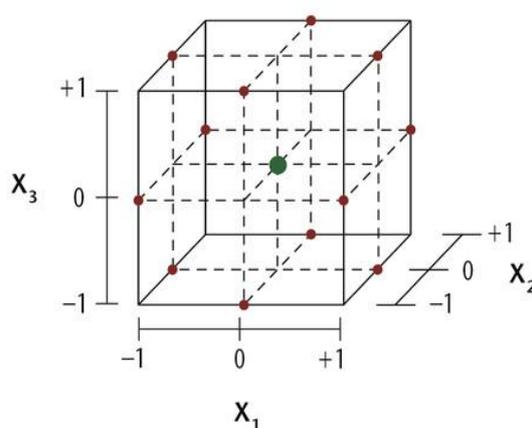


Figure 15: Illustration graphique d'un plan factoriel composé de 3 facteurs plan de Box-Behnken (louis et al., 2018)

~ **Plans de Box et Wilson**

Ce plan d'expérience a été introduit par Box et Wilson (1951), les points de l'expérience sont générés sur une sphère centrée autour d'un point central. Le nombre de niveaux des différents facteurs est minimisé. Le calcul du point central est répété à plusieurs reprises de façon à maximiser la précision de la prédiction autour du point supposé optimal.

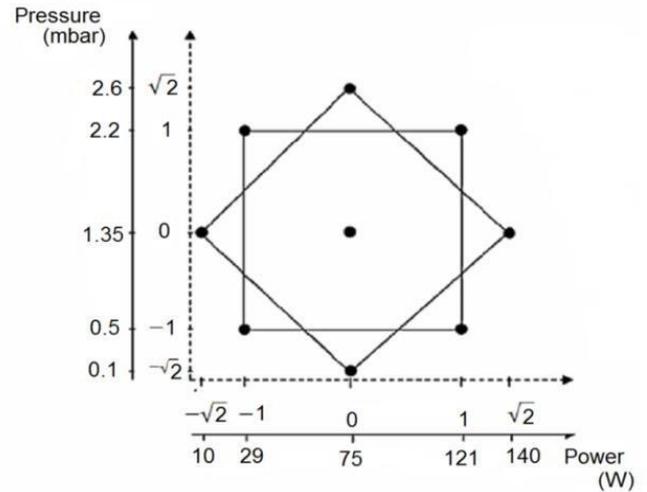


Figure 16 : Box-Wilson expérimental design (Hussain,.2014)

~ **One Factor At-a- Time (OFAT)**

Est une méthode de conception d'expériences impliquant le test de facteurs ou de causes, un à la fois au lieu de plusieurs facteurs simultanément, est favorisée par les non-experts, en particulier dans les situations où les données sont bon marché et abondantes. (Razavi et al.,2015)

Le test d'hypothèse est l'outil le plus couramment utilisé pour OFAT. (Rupinder , 2019).

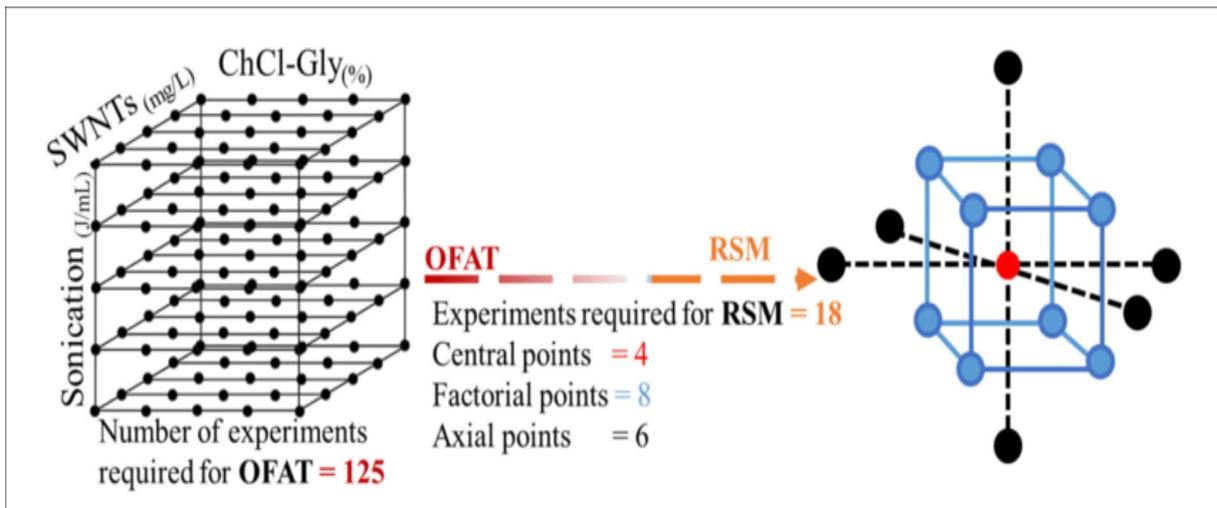


Figure17: (LHS)-One-factor-at-a-time-OFAT-for-three-variables

(Qammer Zaib,.2020)

Chapitre 04

Matériels et méthodes

Nous sommes en train de réaliser une étude comparative entre un groupe d'études menées par un groupe de chercheurs dans le but d'améliorer la production de protéase en utilisant différents substrats dans chaque étude.

Différentes méthodes approuvées ont été utilisées qui conduisent au même objectif, qui est l'étude de l'amélioration de la production avec une grande précision et des étapes étudiées, qui ont tout conduit à une augmentation de la production, mais à des degrés divers Selon les espèces étudiée.

Déchets de tomates

1. But

Étude de l'amélioration de la production de protéases par culture d'*Aspergillus oryzae* NRRL 2220 en cas de fermentation solide (FMS) et de fermentation submergée (FML) en utilisant le marc de tomate.

2. Principe

La composition du marc de tomate séché indique la présence d'une très grande quantité de fibres, de protéines et de matières grasses qui peuvent être exploitées dans plusieurs champs (*Alvarado et al., 2001*).

Il était nécessaires de concevoir une méthode de fermentation appropriée pour améliorer le rendement du produit, car les anciennes méthodes utilisant la méthode "une variable à la fois" prenaient beaucoup de temps et nécessitaient un plus grand nombre d'expériences (*Kammoun et al., 2008*).

Dans cette étude, les chercheurs ont eu recours à l'application de méthodes statistiques, grâce auxquelles l'optimisation des composants multimédias peut prendre en compte les interactions des variables dans la génération de réponses de processus.

3. Matériels et méthodes

Après préparation des micro-organismes, la suspension résultante a été utilisée comme inoculum après l'avoir ajustée à la concentration requise, dans des conditions de

fermentation et en utilisant du marc de tomate comme substrat de base ; des milieux de fermentation solides et immergés ont été préparés.

Là où il a utilisé 10 g de pulpe de tomate et trempé dans de l'eau distillée à la teneur en humidité requise avec l'achèvement de l'agent mouillant et la modification de la conception expérimentale et du pH, il a été bien mélangé et ramené à température ambiante, puis il a inoculé 1 ml de l'inoculum préparé et incubé à 30°C pendant 72 heures.

En fermentation submergée, les mêmes facteurs ont été suivis, car les milieux ont été répartis dans des flacons de 250 ml.

Ils ont également été inoculés avec 1 ml de vaccin et incubés à 30 degrés dans un (agitateur rotatif) (180 tr/min pendant 72 heures).

Pour extraire l'enzyme, le produit a été filtré dans un tissu de coton puis sur papier Whatman en FMS et sur papier Whatman directement dans FML, pour être ensuite utilisé l'extrait pour examiner la protéase.

- **Plan de Plackett et Burman**

Tableau 08: Gamme de différentes variables étudiées dans le plan Plackett-Burman

(Belmessikh et al., 2013)

variables	Code variable	Niveau faible (S1)	Haut niveau (+1)	
			FSS	SmF
Son de blé	X1	0g/L	25 % (p/p)	1,45g/L
Caséine	X2	0g/L	10g/L	10g/L
Erreur	X3	-	-	-
NH ₄ NON ₃	X4	0g/L	5g/L	5g/L
Erreur	X5	-	-	-
NaCl	X6	0g/L	1g/L	1g/L
ZnSO ₄ 7H ₂ O	X _{sept}	0g/L	0,1g/L	0,1g/L

L'effet de sept variables sur la production de protéase a été examiné par la conception de Plackett-Burman (cinq variables et deux erreurs) à des niveaux bas et élevés, puis les effets ont été mesurés et la signification de chaque variable a été déterminée.

4. Résultat et discussion

4-1 Sélection des facteurs par le plan de Plackett-Burman

Tableau 09 : Sélection des facteurs par le plan de Plackett-Burman

FML	FMS
D'après le plan de Plackett et Burman, on note que l'effet du son de blé sur la production de protéases est positif et perceptible, il explique cela par le fait que l'extrait est pauvre en sucres et en protéines, qui sont éliminés avec les résidus solides, et donc là le son de blé constituait un bon milieu de culture (<i>Sandhya et al., 2005</i>).	Contrairement au milieu submergé, l'effet du son de blé sur la production de protéases dans le milieu solide n'était pas significatif. Cela est dû à la présence d'une quantité importante de sucres solubles dans le marc de tomate, ce qui fait que le son de blé affecte négativement la production de protéines.
caséine : L'effet de la caséine sur la production enzymatique dans le milieu submergé était quelque peu négatif, en raison de la solubilité plus faible de ces substrats par rapport aux cultures solides (<i>Nilegaonkar et al., 2007</i>).	La caséine fournit les peptides intacts nécessaires au processus d'induction. Par conséquent, sa présence dans ce processus entraîne une augmentation significative de la production de l'enzyme.
Le nitrate d'ammonium : son effet n'était pas significatif en FML, ce qui a confirmé le phénomène de suppression de la production d'enzymes par l'aluminium (<i>Markovits, 1980</i>).	Le nitrate d'ammonium a affecté négativement la production de protéases dans FMS

NaCl : Il a été observé que la production de protéase est doublée en présence de NaCl, son effet étant positif dans les deux milieux. Le NaCl joue un rôle important dans la stabilisation et la protection de l'enzyme contre la dénaturation (*Murthy,2010*).

ZnSO₄.7H₂O : La présence de zinc dans les deux milieux n'a eu aucun effet sur la production de protéines, bien que les protéases en dépendent généralement, Cela peut être dû au fait que le marc de tomate contient suffisamment de ce minéral (*Sepehr et al, .2012*).

Après les résultats obtenus en étudiant l'effet de toutes les variables sur la production de protéines, le nitrate d'ammonium a été exclu pour son effet supprimeur sur la production, et la caséine et le (ZnSO₄.7H₂O) ont été considérés comme des niveaux optimaux pour le FMS, le son de blé et le NaCl pour le FML, respectivement.

4-2 Optimisation par méthodologie de surface de réponse(RMS)

RMS est Une technique statistique utilisée pour améliorer les processus biologiques.

Dans cette étude, les niveaux des paramètres optimaux sélectionnés pour chaque milieu de culture ont été optimisés.

La valeur F a été calculée pour chacun des deux milieux avec une faible valeur P, ce qui a montré une très grande importance du modèle de régression, après que les données expérimentales ont été ajustées avec précision par le modèle et vérifiées pour leur pertinence, les résultats ont montré une corrélation significative entre les valeurs expérimentales observées et les valeurs attendues.

Après des calculs et des modifications très minutieux et réfléchis visant à faire de l'étude un succès, on s'est également appuyé sur Les surfaces de réponse tridimensionnelles correspondait aux effets combinés de la caséine-NaCl et du son de blé-NaCl, respectivement pour (FMS) et (FML), Ils sont plus utiles pour comprendre à la fois l'effet principal et l'effet d'interaction de ces facteurs.

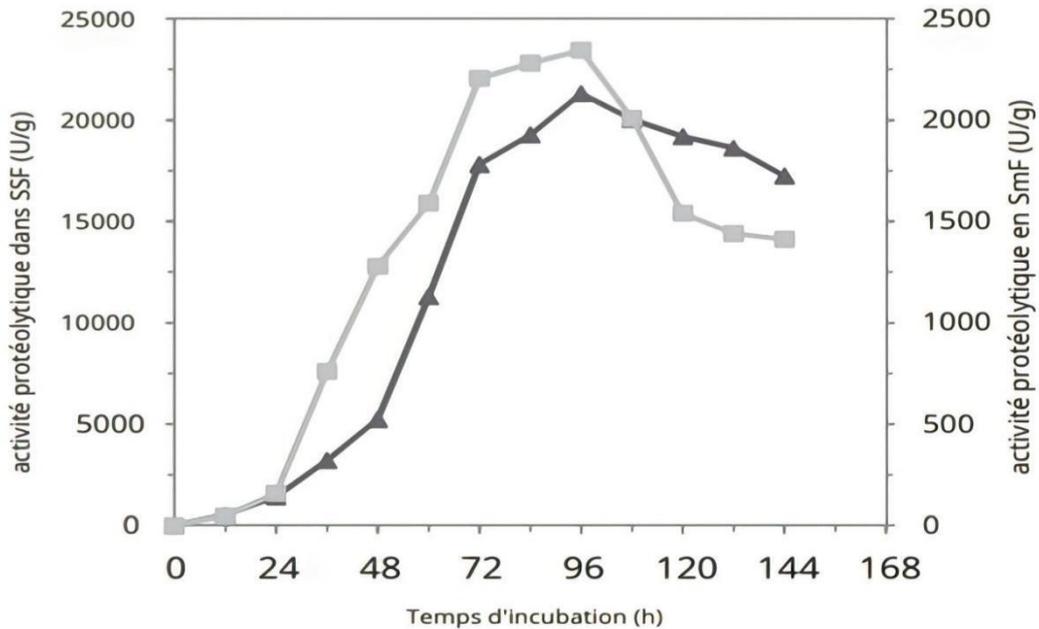


Figure 18: Évolution de la production de protéase neutre dans SSF (~) et SmF (&).

(Belmessikh et al., 2013)

- L'activité enzymatique pendant les premières 24 heures est très faible, surtout en FMS (inactivité des bactéries).
- le pic majeur d'activité était atteint le quatrième jour (96 h) dans le SSF (21309 U/g) ainsi que dans le SmF (2343,5 U/g) (Temps de production similaire).
- Au-delà du quatrième jour, une diminution de la production de protéases a été observée à cause de (l'épuisement des nutriments disponibles pour le micro-organisme, la variation du pH).

4-3 Comparaison entre les fermentations à l'état (S) et (L)

Tableau 10: Comparaison de résultats entre les fermentations à l'état solide et immergées.

	FMS	FML
Comportement de développement fongique de <i>A. oryzae</i>	-Croissance par extension hyphe et ramification à la surface et à l'intérieur des particules de substrat.	- les éléments hyphes en croissance ont tendance à s'emmêler

	-la séparation de la biomasse du substrat solide est difficile.	- donne des pastilles séparables par simple filtration.
Comparaison des rendements de protéase	<p>-A. oryzae produit une quantité beaucoup plus importante de protéines totales dans FMS que dans FML.</p> <p>-les champignons poussent généralement dans la nature sur des substrats solides et, par conséquent, la sécrétion d'enzymes dans FMS était plus étroitement liée à leur environnement naturel que FML.</p> <p>-A. oryzae besoin d'une paroi cellulaire statique dans FML pour faire face à une faible pression osmotique externe.</p> <p>-dans FMS, il n'y a pas besoin de paroi cellulaire statique, ce qui entraîne une possible perte de paroi cellulaire.</p>	

5. Conclusion

- ~ Dans cette étude, un déchet agro-industriel (marc de tomate) a été valorisé par son utilisation comme substrat.
- ~ La composition finale du milieu solide optimal était de 10 g de tomate marc tandis que le milieu liquide optimal était constitué de 40 g/L de marc de tomate.
- ~ Ces milieux optimisés sont composés de substrats naturels et peu coûteux entraînant une réduction considérable du coût de production, comme requis pour la production d'enzymes industrielles.
- ~ l'activité protéolytique était neuf fois plus élevée dans FMS par rapport à FML et donc l'efficacité la plus élevée de la culture à l'état solide par rapport à la culture liquide pour l'enzyme production.

Déchets agricoles

1. But

L'extraction d'enzymes à activité nouvelle à partir des extrêmophiles fournir les catalyseurs pour la fabrication de produits chimiques dans divers industries telles que l'industrie textile, l'industrie pharmaceutique, le papier l'industrie et l'industrie alimentaire afin d'atténuer le problème de la pollution.

2. Principe

Les souches microbiennes marines, possèdent certaines des adaptations particulières pour surmonter les conditions salines extrêmes, la température, pression etc., et donc capable de produire des protéines distinctives avec nouveau potentiel.

Les composants bioactifs présents dans ces organismes peuvent ne pas être trouvés dans leurs homologues terrestres.

L'organisme a été soumis à la production de protéases sous Fermentation à l'état solide (SSF) en utilisant différents agro déchets comme substrats.

Les micro-organismes criblés sont cultivés dans fermenteurs sous des compositions de milieux optimisées afin de produire les produits industriellement significatifs.

3. Optimisation

Afin d'optimiser la production d'enzymes, le processus de fermentation a été réalisé sous SSF à l'aide de divers déchets agricoles (enveloppe de paddy, son de riz, paille de paddy, déchets de fruits, déchets de légumes, son de blé et sciure de bois) avec différentes conditions expérimentales telles que différents pH (5–10), température (10–60 -C), sources de carbone et d'azote (1%), concentrations de chlorure de sodium (2–6%). Différents pH ont été maintenus en utilisant des tampons appropriés ; Tampon citrate 0,1 M (pH 4–5), phosphate 0,2 M (pH 6–8) et tampon phosphate-NaOH (pH 8–11). Les différentes sources de carbone telles que le fructose, le lactose, le saccharose, la cellulose, le galactose, le rhamnose et le maltose ont été testées pour leur impact sur le rendement enzymatique. Urée, sulfate d'ammonium, nitrate d'ammonium, nitrate de sodium, extrait de levure, peptone.

4. Résultats

Tableau 11: Caractérisation biochimique de *Bacillus halodurans* isolé des sédiments marins. (Chellapandian et al., 2021).

S.NO	Test	Résultat
1	Coloration de Gram	+
2	Test d'indole	-
3	Test IRM	+
4	test de visa-présence	-
5	Test de catalase	-
6	Test d'oxydase	+
sept	Test au citrate	+
8	Essai STI	+

4-1 Criblage d'organisme producteur de protéase

-L'inoculation d'échantillons de sédiments marins dilués en série a donné quatre colonies morphologiquement distinctes.

-Les colonies ont été criblées pour leur capacité de production d'enzymes sur de la gélose au lait écrémé en observant la zone de clairance due à l'hydrolyse de la caséine.

-Parmi les quatre isolats différents, celui qui produisait une zone de clairance maximale a été soumis à d'autres travaux expérimentaux.

4-2 Détachage

L'enzyme protéase produite par l'isolat marin B. *Halodurans* a été testé pour son aptitude en tant qu'agent additif en soumettant un tissu taché de sang. L'efficacité d'élimination de l'enzyme s'est avérée plus élevée par rapport au traitement avec de la poudre commerciale.

5. Discussion

Les protéases sont l'une des enzymes qui trouvent de larges applications dans les industries.

Quatre souches bactériennes différentes produisant l'enzyme protéase ont été isolées des sédiments marins. Parmi les isolats, une souche a été sélectionnée pour d'autres études sur la base de la zone de clairance maximale. Les caractéristiques culturales, biochimiques et le séquençage de l'ARNr 16S ont révélé que l'isolat était *B.halodurans*.

La séquence a été déposée dans Gen Bank, NCBI avec le numéro d'accès MK829640.1. Plusieurs Bacille souches telles que *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens*, et *B.mojavensis* ont été identifiées comme des sources potentielles pour la production de protéases (*Gupta et al., 2002*).

Dans la présente étude, les agro déchets ont été utilisés comme substrats sous SSF pour la production de l'enzyme protéase. *Esakkiraj et al(2011)* ont utilisé des bios déchets pour la production de protéase alcaline.

Parmi les agro déchets testés, le son de blé a produit un maximum de protéases dans la présente étude.

Utilisant le son de blé comme substrat, (*Anandan et al.,2007*) étudié la production de protéases par *Aspergillus tamaridans* dans le cadre du FSS.

Mahanta et al. (2008) ont également signalé une quantité maximale de rendement enzymatique dans le son de blé par rapport aux autres sources.

La teneur en humidité du milieu est importante pour la fermentation à l'état solide de la production de protéases. Dans cette étude, *Bacillus halodurans* produit plus d'enzymes (401,18 U/ml) sous une teneur en humidité de 85 % parmi les autres conditions d'humidité testées.

La présente étude s'appuie sur les travaux antérieurs d'*Esakkiraj et al. (2011)* qui ont enregistré un rendement maximal en protéase dans 75 % d'humidité par *S.proteomaculans*. *Anandan et al. (2007)* et *Mahanta et al, (2008)* ont signalé respectivement 65 % et 66,7 % comme taux d'humidité optimal.

La production de protéase est principalement affectée par des facteurs tels que le pH et la température dans la plupart des organismes.

Dans ce travail, le *Bacillus halodurans* a été expérimenté pour maximiser le rendement enzymatique en optimisant le pH ainsi que la température d'incubation.

La production maximale de protéases a été enregistrée à pH 9 car la souche appartient au milieu marin.

De même, le rendement optimal en protéase a été enregistré à 40 °C à partir de la souche candidate *Bacillus halodurans*.

Dans cette étude, la quantité maximale de rendement en protéase a été enregistrée dans un milieu supplémenté en saccharose.

Les protéases sont souvent testées pour leur employabilité en tant qu'additifs dans le nettoyage des taches (*Choudhary, 2012 ; Mothe et Sultanpuram, 2016*).

Les résultats expérimentaux sur les performances de lavage de la protéase sécrétée par *Bacillus halodurans* dans l'élimination des taches ont indiqué que l'enzyme a montré une meilleure élimination de la tache de sang que les détergents commerciaux.

6. Conclusion

L'objectif de cette étude est la production de la protéase à partir des bactéries isolées des sédiments marins, et l'organisme a été identifié comme *Bacillus halodurans*. Le processus de fermentation a été réalisé sous SSF dans le but d'optimiser la production à l'aide de divers déchets agricoles, le son de blé a produit un maximum de protéases par rapport aux autres sources.

L'enzyme protéase produite par l'isolat marin *B. halodurans* a une efficacité d'élimination des taches de sang, il a été testé en tant qu'agent additif.

+ Optimisation de la production des protéases . Application de l'enzyme dans l'attendrissement de la viande.

1. But

Attendrir la viande par des méthodes efficace.

Optimisation d'une extraction de protéase par une approche statistique pour la production d'un attendrisseur de viande alternatif à partir de plante (*Manihot esculenta*) les racines.

2. Principe

Les protéases sont des enzymes qui effectuent la protéolyse, qui est l'une des réactions biologiques les plus importantes, capable d'hydrolyser les liaisons peptidiques qui relient les acides aminés entre eux dans la chaîne polypeptidique formant la protéine. Par conséquent, il peut dégrader les protéines musculaires de la viande pour augmenter la tendreté (*Sun et al.,2018*).

La tendreté est un paramètre essentiel de la qualité de la viande, Dans cette étude, La racine de *Manihot esculenta* a été choisie comme source de protéase en raison de son effet ulcératif sur la peau, suggérant la présence d'une forte activité protéolytique, utilisant la méthodologie de surface de réponse (RSM) avec quatre variables indépendantes.

La protéase brute optimisée a été appliquée comme attendrisseur de viande en utilisant trois méthodes différentes, qui étaient l'analyseur de texture, l'électrophorèse et la microscopie électronique à balayage (SEM).

3. Matériels et méthodes

- ~ La peau externe de *Manihot esculenta* racine a été pelée pour obtenir la chair de la racine et coupée en petits morceaux puis soumise à une extraction à la protéase.
- ~ Quatre variables indépendantes ont été utilisées pour concevoir l'expérience avant l'extraction de la protéase (le pH, CaCl₂, Triton X-100, 2-mercaptoéthanol).



Figure 19: *Manihot esculenta* Crantz (*Mi-aime-a-ou.com*,2022)

- ~ L'enzyme brute a été filtrée en utilisant du papier filtre Whatman n° 3.
- ~ Le filtrat a été centrifugé pendant 30 min à 9910 tr/min.
- ~ Le surnageant a été collecté et stocké à 4 °C pour une analyse plus approfondie (*Ahmad et al., 2019*).
- ~ L'activité protéase a été déterminée en utilisant la méthode Folin-Ciocalteu avec quelques modifications (*Darwesh et al. 2019*).
- ~ L'étude s'appuie sur RSM et Une conception composite centrale à faces centrées (FCCCD), dans le processus d'optimisation avec quatre variables à trois niveaux avec 30 exécutions.
- ~ Les conditions d'extraction de la protéase ont été optimisées numériquement pour l'activité maximale de la protéase sur la base de l'analyse de régression et des tracés de surface 3D des variables indépendantes.
- ~ La teneur en protéines de l'extrait brut a été déterminée à l'aide de la méthode de Bradford (*Gallagher et Wiley 2008*).

Utilisation de l'enzyme sur l'attendrissement de la viande

La texture a été analysée à l'aide d'un analyseur de texture CT3 équipé d'un kit de sonde général, qui était un couteau de 60 mm de large (*Zhu et al., 2018*), la force de cisaillement appliquée sur chaque échantillon de viande a été enregistrée (*Rawdkuen et al., 2013*).

Après avoir soumis des échantillons de viande hachée à L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), à microstructure des échantillons a été déterminé à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Zeiss Evo50, Allemagne).

4. Résultats et discussions

La signification des variables sur l'activité de la protéase a été déterminée en comparant le l'ampleur des effets.

- ✓ Le pH optimal pour l'extraction de la protéase à partir de *Manihot esculenta* était de 9, parce que l'activité de la protéase a augmenté de manière significative à l'approche du pH= 9 et a diminué lorsque le pH était supérieur à cette valeur.
- ✓ L'activité de la protéase augmentait lentement en s'approchant du niveau optimal de CaCl₂ (3,24 mM) et diminue lorsque la concentration de CaCl₂ a encore été augmentée, L'ion métallique peut améliorer l'activité de la protéase en raison de la liaison ionique formée entre l'ion métallique et la protéine.
- ✓ L'activité de la protéase augmente fortement à l'approche du niveau optimal de Triton X-100 (4,19 %) et diminue légèrement lorsqu'elle atteint le niveau le plus élevé de Triton X-100 (5 %).

Triton X-100 est un détergent ionique utilisé dans l'extraction de protéases pour perturber les membranes et essentiel pour solubiliser les protéines membranaires (*Krishnan et Murugan 2015*).

- ✓ L'activité de la protéase a augmenté rapidement à mesure que la concentration de 2-mercaptoéthanol s'approchait du niveau optimal (6,32 mM) et diminuait lentement lorsqu'elle est dépassait. Le 2-mercaptoéthanol a été utilisé comme agent réducteur et antioxydant pour protéger contre la dénaturation et améliorer l'activité de la protéase (*Matkawala et al.,2019*).

Les variables indépendantes pour l'activité protéase ont été classées dans l'ordre décroissant suivant, Triton X-100, pH ,2- mercaptoéthanol, CaCl₂. Triton X-100 montre le plus fort effet sur l'activité de la protéase par rapport à d'autres variables tandis que CaCl₂ montre l'effet le plus faible.

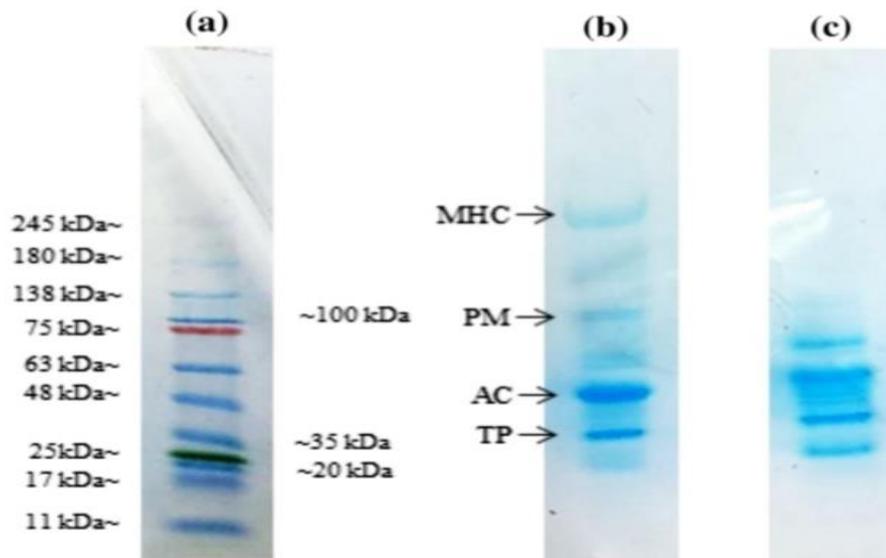


Figure 20: Analyse électrophorétique d'un Protéine échelle standard, "b" contrôle, et "c" après traitement à la protéase (Mohamed et al.,2020).

~ Électrophorèse SDS-PAGE

Il existe quatre protéines musculaires principales qui peuvent être observées,

L'analyse des principales protéines myofibrillaires de la viande a montré le plus haut niveau de chaîne lourde de myosine (MHC) suivi de l'actine et de la troponine (Vigoreaux, 2006). Il montre un schéma assez similaire au résultat obtenu ici.

L'intensité de la bande MHC a été clairement diminuée lorsque la bande a disparu après avoir été traitée avec l'enzyme.

~ Microscopie électronique à balayage (MEB).

Le tissu conjonctif joue un rôle important dans la détermination de la qualité gustative de la viande.

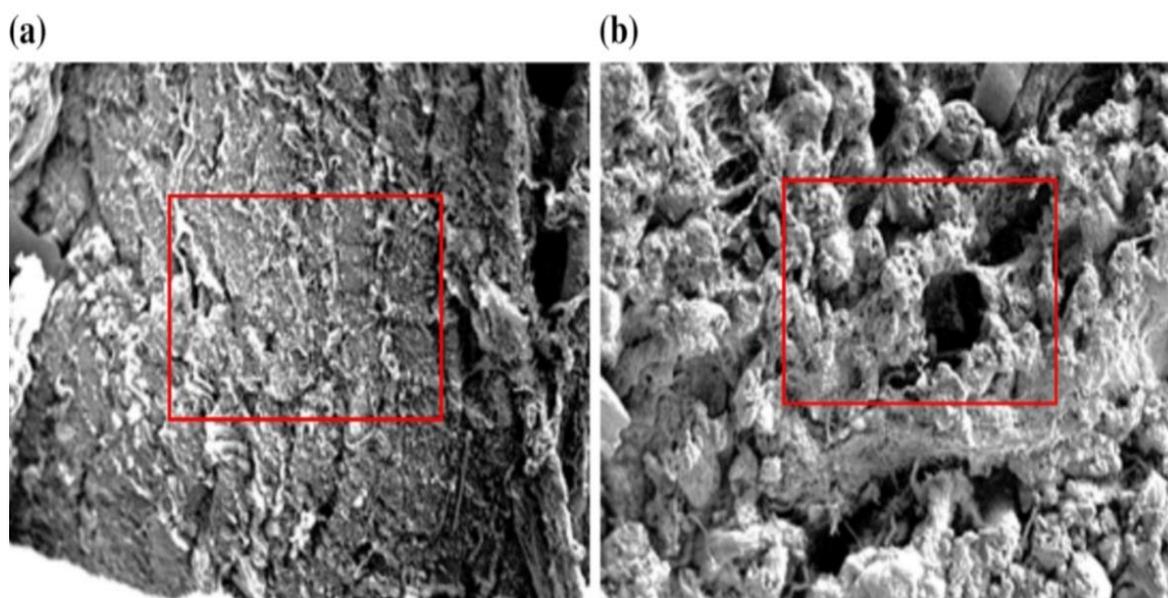


Figure 21: Micrographies SEM de bœuf dans un traitement témoin et b avec *Manihot Protéase esculenta* (Norazmi et al., 2020)

La figure 21 montre la microstructure du contrôle et de l'échantillon traité avec la protéase brute.

Les fibres musculaires brisées peuvent être observées dans l'échantillon traité aux enzymes (b), De plus, il y avait une perte d'interaction des fibres musculaires et moins de fibres attachées, Cela est dû à la dégradation du collagène et du sarcolemme entourant les fibres musculaires [la dégradation du collagène est un facteur important dans la tendreté de la viande (Mikołajczak et al., 2019)] et Un autre facteur c'est la perturbation de la structure du tissu conjonctif (Purslow, 2018).

5. Conclusion

Les résultats obtenus dans cette expérience indiquent que la protéase brute de *Manihot esculenta* peut être utilisée comme attendrisseur de viande. Sur la base de l'analyse statistique de RSM, les variables optimales d'extraction obtenues pour le pH,

CaCl₂, Triton X-100 et 2-mercaptoéthanol étaient pH 9, 3,24 mM, 4,19 % et 6,32 mM respectivement. L'analyse SDS-PAGE, SEM et de texture confirme l'efficacité de la protéase brute qui agit comme un attendrisseur de viande.

✚ Déchets alimentaires (Le pain)

1. But

La coproduction des deux enzymes industrielles: α -amylase et protéase via SSF par *Rhizopus oryzae* sur les déchets de pain humidifiés.

2. Principe

L'optimisation de la production de protéases et d'amylases, par *Rhizopus oryzae* Cultivé sur déchets de pain par la fermentation l'état solide.

Nous sommes intéressés à utiliser (*Rhizopus oryzae*) dans SSF pour la production d'enzymes protéolytiques, les enzymes produites pourraient être des alternatives pour détoxifier le gluten utilisé en biotechnologie alimentaire.

3. Matériel et Méthode

➤ Fermentation fongique à l'état solide et optimisation des conditions

Après stockage et broyage puis tamisage du déchets de pain, la poudre a été prise dans des plateaux rectangulaires (environ 250 g de déchets de pain dans chacun).

Les plateaux ont été fermés avec du papier d'aluminium, autoclaves à 121°C pendant 15 minutes, refroidi à température ambiante et mélangé soigneusement avec de l'eau distillée stérilisée pour atteindre une teneur en humidité appropriée. La poudre humidifiée a été étalée uniformément sur le plateau en couches, puis inoculée avec une suspension de spores fongiques de (*Rhizopus oryzae*) et recouvert d'une feuille d'aluminium.

1mL de solution de spores Cryo conservées de *Rhizopus oryzae* a été inoculé à la surface des déchets de pain. Les plateaux ont été incubés à 30°C dans des conditions statiques.

Des facteurs tels que la période d'incubation, la teneur en humidité, la taille de l'inoculum, le pH, la hauteur du substrat et les effets du sel influençant la sécrétion d'enzymes par *R. oryzae*. L'optimisation des paramètres de fermentation pour SSF a été réalisée pour déterminer l'effet de chaque paramètre sur la production d'enzymes.

➤ Récupération et dosage d'enzymes

Pour l'isolement des enzymes produites dans les échantillons de SSF, 5 g du substrat fermenté ont été mis en suspension dans 50 ml d'eau distillée à température ambiante à l'aide d'un mélangeur de type cuisine pour former une suspension de 100 g/L. Après agitation dans un agitateur rotatif (170 rpm) pendant 1 heure à 30°C, la bouillie a été pressée à travers une étamine humide.

➤ Essai de protéase

La méthode mentionnée par (*Han et al.,2017*) a été utilisé pour quantifier l'activité protéase avec modification. Exactement, le mélange réactionnel contenant 0,3 ml de 20 % azo caséine, 0,1 ml de préparation enzymatique, et 0,2 ml de tampon citrate à pH 5,2 a été incubé pendant 4 h à 45°C. La réaction a été arrêtée en ajoutant 2 ml de TCA à 10 % et stocké à 4°C pendant 10 min, et les tubes à essai ont été centrifugés à 3500 g pendant 5 min à 4°C. Une unité de l'activité enzymatique (U) a été définie comme une absorbance (440 nm) changement de 0,01 après 4 h à 45°C (*M'hir et al.,2009*), (*M'hir et al.,2012*).

4. Résultats et discussion

Dans la fermentation SSF, plusieurs facteurs sont à optimiser car ils contrôlent la croissance microbienne et donc la production enzymatique, à savoir la température (30°C), le temps de fermentation, la teneur en humidité (de 60 %), la hauteur du substrat à 1 cm, le pH du milieu (à 5,5), la taille de l'inoculum (105spores/g), les sources de carbone et d'azote et les concentrations de sel.

La figure 2 montre l'effet du temps de fermentation sur la production d'amylase et de protéase pendant 144 h. Les quantités de production de protéase et d'amylase étaient plus élevées à été atteinte dans les 120 h suivant la fermentation. Après ce temps de fermentation, l'activité chute drastiquement. En général, une longue période d'incubation entraîne une diminution de la production d'enzymes consécutive à la réduction des nutriments dans le substrat ainsi qu'à la libération de protéases et à la baisse du pH dans le substrat (Bansal et al., 2012).

La Production de protéases à partir de déchets de rizerie par *Aspergillus niger* dans SSF augmentait avec la période d'incubation, conformément à nos résultats. En plus du temps d'incubation, la production de protéases dépend fortement du pH extracellulaire qui affecte plusieurs processus métaboliques et enzymatiques et transporte divers composants à travers les membranes cellulaires, influençant ainsi la croissance cellulaire et la production de métabolites, (Ellaiah et al., 2002).

Cela indiquait que l'enzyme a un rôle de métabolite primaire, étant produit dans la phase logarithmique de la croissance du champignon pour l'utilisation de source azotée de déchets de pain (Arunachalam et al., 2009).

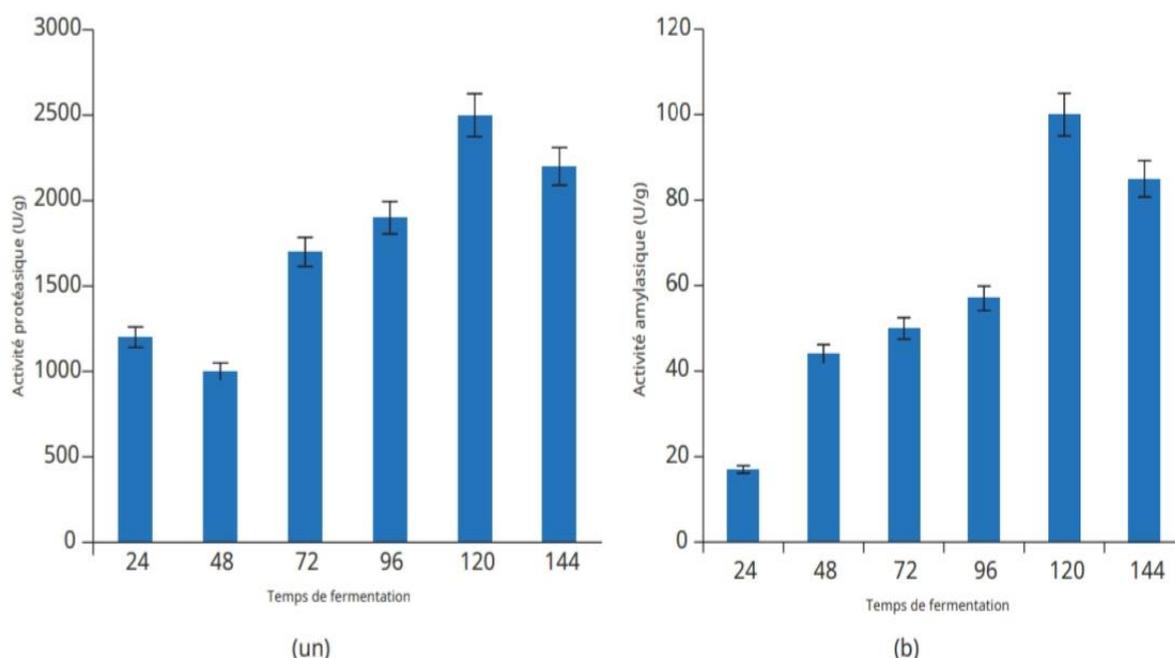


Figure 22: Effet de la période d'incubation (h) sur la production de protéase (a) et d' α -amylase (b) par *R. oryzae* CH4 à 30°C dans des conditions statiques.

(Benabda al., 2019).

Les résultats ont montré que l'activité protéasique variait de 1150 à 1550 U/g, alors que celle de α -amylase variait de 63,42 à 216,66 U/g.

Autres études ont rapporté que d'autres sources d'azote inorganique augmentaient la production d'enzymes. En effet, lorsqu'il est complété par nitrate de potassium, *Aspergillus funiculosus* a produit une protéase maximale.

En outre, (*El Safey et al., 2004*) ont rapporté que le sulfate d'ammonium était la meilleure source d'azote pour la production de protéases.

L'épaisseur du substrat est un facteur important et doit être optimisé pour contrôler les conditions aérobies pour les champignons. Les activités de protéase et d'amylase variaient avec l'épaisseur du substrat qui variait de 0,5 cm à 2,5 cm.

5. Conclusion

Déchets de pain est un bon milieu de culture en SSF en termes de composition et de sécurité. Production d'enzymes par *Rhizopus oryzae* tel que α -l'amylase et la protéase dans des conditions de culture optimisées étaient les suivantes : 65 % d'humidité, inoculum 105spores/g, et période d'incubation de 120 h (5 jours). D'autres études devraient être poursuivies pour tester la protéase et la stabilité de l' α -amylase (stabilité thermique, du pH et du détergent) dans le but de réaliser leur production à l'échelle pilote. Plusieurs autres paramètres biochimiques et biophysiques tels que la sensibilité aux ions, les inhibiteurs, la cinétique de réaction et les études structurales doivent être effectués pour valider leurs applications industrielles.

Conclusion générale

Conclusion générale

Notre travail a pour objectif la valorisation des déchets agro-alimentaires visant la production des enzymes protéolytiques.

En comparant la production des protéases sur milieu de culture solide et immergé, il a été conclu que les milieux solides sont plus adaptés pour améliorer la production de protéases que les milieux immergés.

L'étude comparative menée avec une grande précision, visant à améliorer et optimiser la production de protéases à base de divers substrats notamment le marc de tomate, les résidus agricoles, le son de blé, a confirmée l'importance du choix de ces substrats .

Une optimisation du milieu de culture consiste à sélectionner les facteurs influençant la production de protéases par application de plans statistiques de (Plackett et Burman). les optimas des facteurs sélectionnés sont déterminés via le plan de (Box et Wilson) et (RMS).

Les protéases ainsi produites peuvent être utilisées dans différents domaines à savoir : l'IAA , le textile , papeterie détergents...ect.

En comparant les différents travaux de recherches on remarque que toutes les études sont pertinentes , mais chacune a sa méthode d'application dans un différent domaine industriel.

En perspective, le travail peut être complété par une purification de l'enzyme, détermination des caractéristiques et des effets, production de l'enzyme vers fermenteur.....

Résumé

Résumé

Les enzymes protéolytiques font partie des hydrolases connus par leurs applications dans divers domaines.

Cette étude vise à valoriser les déchets agro-alimentaires par fermentation sur milieu solide ceci est dont le but de diminuer le coût de production de ces enzymes.

Au vu, des résultats obtenue des travaux antérieurs l'optimisation de la production des protéases par différentes souches microbiennes permet d'utiliser ces enzymes dans différents domaines : attendrissement de la viande, en détergence, en textile ...etc.

Mots clés:

Enzymes protéolytiques, Fermentation, Optimization, Applications, Valorisation.

Abstract

Proteolytic enzymes are part of the hydrolases known by their applications in various fields.

This study aims to recover agro-food waste by fermentation on a solid medium, this is the purpose of which is to reduce the cost of production of these enzymes.

In view of the results obtained from previous work, the optimization of the production of proteases by different microbial strains makes it possible to apply these enzymes in different fields: tenderizing of meat, in detergents, textiles..... etc.

Keywords:

Proteolytic enzymes, Fermentation, Optimization, Applications, Valuation.

المخلص

الإنزيمات المحللة للبروتين هي جزء من الهيدرولازات المعروفة بتطبيقاتها في مختلف المجالات. تهدف هذه الدراسة إلى استعادة نفايات الأغذية الزراعية عن طريق التخمير على وسط صلب ، والغرض منه هو تقليل تكلفة إنتاج هذه الإنزيمات. في ضوء النتائج التي تم الحصول عليها من العمل السابق ، فإن تحسين إنتاج البروتياز بواسطة السلالات الميكروبية المختلفة يجعل من الممكن تطبيق هذه الإنزيمات في مجالات مختلفة: تطرية اللحوم ، في المنظفات ، المنسوجات ، إلخ.....

الكلمات المفتاحية :

الإنزيمات المحللة للبروتين ، التخمير ، التحسين. التطبيقات ، التقييم

Références Bibliographiques

- **Ata Ö.**, Corinna R., Nadine E., Tatto., Minoska V., Teresa M., Stephan H., Matthias G., Steiger., Pinar Ç et Diethard M. A single Gal4-like transcription factor activates the Crabtree effect in *Komagataella phaffii*. *Cell Syst.*, **2018**, 5: 345-357.
- Aguilar C.N.**, Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán P.A., Rodríguez-Herrera R., MartínezHernandez J.L. et Contreras-Esquivel J.C. Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *Am J Biochem Biotechnol.*, 2008, 4(4): 354-366.
- Alvarado A**, Pacheco-Delahaye E, Hevia P. Value of a tomato byproduct as a source of dietary fiber in rats. *Plant Food Hum Nutr* 2001;56:335–48.
- **Al-Muhtaseb AH**, Al-Harashsheh M, Hararah M, Magee TRA. Drying characteristics and quality change of unutilized-protein rich-tomato pomace with and without osmotic pre-treatment. *Ind Crop Prod* 2010;31:171–7
- Anandan, D.**, Marmer, W.N., Dudley, R.L., 2007. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamari*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34 (5), 339–347 .
<https://doi.org/10.1007/s10295-006-0201-5>.
- **Arunachalam. C** and D. Narmadhapiya, “*Monascus fer_x0002_mented rice and its beneficial aspects: a new review,*” *Asian Journal of Phramaceutical and Clinical Research*, vol. 4, no. 1, 2009.
- **Belmessikh Aicha**, Hayet Boukhalfa , Aicha Mechakra-Maza, Zoubida Gheribi-Aoulmi , Abdeltif Amrane ,2013." Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace ", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 44 (2013) 377–385.
- Bonaly R.** (1991). Morphologie et reproduction asexuée des levures Ds : Larpent J.P., *Biotechnologie des levures*. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p : 4-18.
- **Brou M. P. R.** Modélisation de cultures mixtes de levures pour leur mise en oeuvre optimale dans les bioprocédés. Thèse de Doctorat. Génie des Procédés et de l'Environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse. Université de Toulouse. France., 2018.

- **Buzzini P.**, Benedetta T. et Andrey Y. Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around. *J. Inst. Brew.*, 2018, 35(8) : 487-497.
- **Belmessikh A.** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée, Université Mentouri, Constantine, Algérie. 2011.
- **Benabda Olfa**, Sana M'hir ,1 Mariam Kasmi, Wissem Mnif , and Moktar Hamdi, 2019." Optimization of Protease and Amylase Production by *Rhizopus oryzae* Cultivated on Bread Waste Using Solid-State Fermentation", Article ID 3738181, 9 pages <https://doi.org/10.1155/2019/3738181>.
- **Botton B.**, Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle .Masson. Paris. P. 12-426.
- **Chniti S.** Optimisation de la bioproduction d'éthanol par valorisation des refus de l'industrie de conditionnement des dattes. Thèse de Doctorat. Institut des Sciences Chimiques, Université de Rennes, France., 2017.
- **Chellapan S.**, Jasmin C., Basheer S.M., Elyas K.K., Bhat S.G. et Chandrasekaran M. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *J. Process Biochem.*, 2006, 41: 956-961.
- **Choudhary, V.**, 2012. Compatibility with commercial detergents and stain removal capability of *Aspergillus versicolor* protease. *J. Acad. Indus. Res.* 1 (6), 301–305. Das, G., Prasad, M.P., 2010. Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *Int. Res. J. Microbiol.* 1 (2), 26–31.
- **Chellapandian** Balachandran, Alagumalai Vishali , Natarajan Arun Nagendran , Kathirvelu Baskar ,Abeer Hashem , Elsayed Fathi Abd_Allah, 2021." Optimization of protease production from *Bacillus halodurans* under solid state fermentation using agrowastes", *Saudi Journal of Biological Sciences* 28 (2021) 4263–4269
- **Dali N.S** et Hamame A. Recherche de levures productrices d'enzymes glycolytiques exocellulaires thermostables : Production (sur boîte de Pétri et en batch) et Caractérisation

des enzymes produites. Mémoire de Master en Biochimie / Analyse Protéomique et Santé, Université Frères Mentouri, Constantine, Algérie., 2016.

- **Djama R.** et Abdelilah W. Production de la polygalacturonase par la moisissure *Aspergillus*

niger cultivée sur milieu solide (SSF). Mémoire de Master en Biochimie de la Nutrition, Université Mentouri, Constantine, Algérie., 2018.

- **Duchiron F.** et Copinet E. Fermentation en Milieu Solide (FMS). Bioprocédés et bioproductions. BIO620 v1., 2011, 1-13.

- **Durand.** et Alain. La fermentation en milieu solide. Biofutur [en ligne]., 1988, 181: 41-43.

-**Darwesh OM,** El-Hawary AS, El Kelany US, El-Sherbiny GM (2019) Nematicidal activity of thermostable alkaline protease produced by *Saccaromonospora viridis* strain Hw G550. *Biotechnol Rep (Amst)* 24:e00386. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00386>

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

-**Esakkiraj, P.,** Sankaralingam, S., Usha, R., Palavesam, A., Immanuel, G., 2011. Solid_x0002_state protease production using anchovy waste meal by moderate halophile *Serratia proteamaculans* AP-CMST isolated from fish intestine. *Ann. Microbiol.* 61, 749–755. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0191-4> .

- **Ellaiah. P, K.** Adinarayana, Y. Bhavani, P. Padmaja, and B. Srinivasulu, “Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species,” *Process Biochemistry*, vol. 38, no. 4, pp. 615–620, 2002.

- **El-Safey E. M** and U. M. Abdul-Raouf, “Production, purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis*,” in *Proceedings of the International Conferences for Development and the Environment in the Arab World*, pp. 1–26, Assiut University, Assiut, Egypt, March 2004.

- **Esakkiraj, P.,** Sankaralingam, S., Usha, R., Palavesam, A., Immanuel, G., 2011. Solid_x0002_state protease production using anchovy waste meal by moderate halophile

- Serratia proteamaculans AP-CMST isolated from fish intestine. Ann. Microbiol.61, 749–755. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0191-4>
- **Fao.**, (2007). Les bonnes pratiques d'hygiène dans la préparation et la vente des aliments de rue en Afrique: Outils pour la formation. Ed. Food & Agriculture Org, Italie. 175p.
 - **Gournier-Chateau n.**, Larpent J.-P, Castellanos M.-l., Larpent J.-L. (1994).-Les probiotiques en alimentation animale et humaine Ed. Tee & Doc - Lavoisier, 192 p.
 - **Gobert A.** Etude des besoins en azote des levures non-Saccharomyces en vinification : impact sur les fermentations séquentielles. Sciences agricoles. Thèse de Doctorat en Biotechnologies agro-alimentaire. Université Bourgogne Franche-Comté. France., 2019.
 - **Gupta R.**, Beg Q.K. et Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. J. Appl Microbiol Biotechnol., 2002, 59: 15-32.
 - **Gervais P.** et Bensoussan M. Solid-state fermentations of the genus Aspergillus. In: Smith. J. E., editor. Aspergillus. Plenum Press., 1994, P. 101–140.
 - **Gallagher SR**, Wiley EA (2008) Current protocols essential laboratory techniques. Wiley, New York.
 - **Gupta, R.**, Beg, Q.K., Lorenz, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59 (1), 15–32. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0975-y>.
 - **Houdaya M.** Isolement et identification des levures de quatre fruits tropicaux : Mangifera indica, Psidium cattleianum, Clidemia hirta et Psidium goyava, récoltes dans trois régions de Madagascar : Atsinanana, Boeny et Yakinankaratra. Mémoire de Master. Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée. Université d'Antananarivo. Madagascar., 2015.
 - **Hernández M.S.**, Marilú R., Nelson P.G. et Renato P.R. Amylase production by Asprgillusnigerin submerged cultivation on two wastes from food industries. J. Food Eng., 2006, 73: 93-100.
 - **Hamma S** et Saoudi S,(2016). Optimisation de la production des des xylanases chez Jonesia denitrificans BN13 xylanases chez par la méthode des plans d'expériences. Mémoire de master. Université A. MIRA - Bejaia.

- **Hu J**, Ge S, Huang C, Cheung PCK, Lin L, Zhang Y, Zheng B, Lin S, Huang X (2018) Tenderization effect of whelk meat using ultrasonic treatment. *Food Sci Nutr* 6(7):1848–1857. <https://doi.org/10.1002/fsn3.686>
- **Hao Li**, Yue Huang, Bin Zhang, Dawei Yang, Xiaoli Zhu, Genxi Li, 2014." A New Method to Assay Protease Based on Amyloid Misfolding: Application to Prostate Cancer Diagnosis Using a Panel of Proteases Biomarkers", 4(7): 701-707. doi: 10.7150/thno.8803.
- **Hamrouni. R**, J. Molinet, L. Mich'e et al., "Production of coconut aroma in solid-state cultivation: screening and identification of Trichoderma strains for 6-pentyl-alpha pyrone and conidia production," *Journal of Chemistry*, vol. 2019, Article ID 8562384, 7 pages, 2019.
- **Hedstrom. L**, « *Serine protease mechanism and specificity.* », *Chem Rev*, vol. 102, 2002, p. 4501–24 ([PMID 12475199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12475199/), [DOI 10.1021/cr000033x](https://doi.org/10.1021/cr000033x)).
- **Hyun Kyung Yoon** and Tae Hyeon Yoo, 2013." A novel protease activity assay method based on an engineered autoinhibited protein using an enzyme-linked immunoassay", *View Article Online DOI: 10.1039/C3AN01336G*.
- **I.L.H. Ong**, K.L. Yang, 2017." Recent Developments in Protease Activity Assays and Sensors", *View Article Online DOI: 10.1039/C6AN02647H*
- **Jani, S.A.**, Chudasama, C.J., Patel, D.B., Bhat, P.S., Patel, H.N., 2012. Optimization of extracellular protease production from alkali thermo tolerant Actinomycetes: *Saccharomonospora viridis* SJ-21. *Bullet. Environ. Pharmacol. Life Sci.* 1 (6), 84–92.
- **Kurtzman C.P.**, Part Iva. Classification of the Ascomycetous Taxa Chapitre 13. Discussion of Teleomorphic and anamorphic Ascomycetous and yeasts-like-taxa. In Kurtzman C. P., Fell J.157 W. and Boekhout T (Eds). *The yeasts, a taxonomic study.* Fifth edition. Elsevier., 2011, 2: 293- 311.
- **Kurtzman C.P.**, Fell J.W et Boekhout T. *The yeasts : a taxonomic study*, Fifth Edition., 2011, 1 : 3
- **Kumar D.**, Savitri., Thakur N., Verma R. et Bhalla T.C. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.*, 2008, 3(12): 661–672.

- **Kammoun R**, Naili B, Bejar S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for a-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresour Technol* 2008;99:5602–9.
- **Krishnan VGM**, Murugan K (2015) Purification, characterization and kinetics of protease inhibitor from fruits of *Solanum aculeatissimum* Jacq. *Food Sci Hum Wellness* 4(3):97–107. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.06.003>
- Kandasamy, S.**, Muthusamy, G., Balakrishnan, S., Duraisamy, S., Thangasamy, S., Seralathan, K.K., Chinnappan, S., 2016. Optimization of protease production from surface-modified coffee pulp waste and corncobs using *Bacillus* sp. by SSF. 3. *Biotech* 6 (167), 11. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0481-z>.
- **Labrecque M-H.**, (2003)-Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Mémoire, Faculté des sciences de l agriculture et de l'alimentation, Université LAVAL : 19-24.
- **Larpent J.P.** et Larpent-Gourgau M. (1997). *Mémento technique de microbiologie*. 3e édition, Lavoisier-Tec &Doc, Paris. 8, p : 217-240.
- Leclerc H.**, Meyer A. et Deiana J. (1995). *Cours de microbiologie générale*. Nouveau programme. Biosciences et Techniques. doin éditeurs, Paris. p : 73-92.
- Lachance Marc-André.**(2011). *Encyclopédie de levure des sciences de la vie*.12-56.
- **Liszkowska W.** et Berlowska J. Yeast Fermentation at Low Temperatures. Adaptation to Changing Environmental Conditions and Formation of Volatile Compounds. *Molecules.*, 2021., 26(4): 1035.
- **Lakba H.** et Soucha H. Production des protéases par les mycètes isolés de milieux sahariens. Mémoire de Master en Microbiologie, Université Mentouri, Constantine, Algérie. 2015.
- **Leisola M.**, Jokela J., Pastinen O. et Turunen O., 2001. *Industrial use of enzymes*. Laboratory Bioproc. Eng., Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds. 2001.

- **Loudjani H.** et Belmerabet K. Etude des paramètres physico-chimiques de la production de protéase par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Mémoire de Master en Microbiologie, Université Mentouri, Constantine, Algérie. 2016.
- Lopez-Otin C.** et Bond J.S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol Chem.*, 2008, 283(45): 30433-30437.
- Levin. L, F.** Forchiassin and A., (2005) “Viale, Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements“, *Process Biochemistry*, vol. 40 , pp. 1381–1387.
- Morge C.,** Antoine G., Raphaëlle Tourdot-Maréchal., Céline Sparrow., Youzhong Liu., Beatriz Quintanilla-Casas., Stefania Vichi et Hervé Alexandre. Non-Saccharomyces Yeasts Nitrogen Source Preferences : Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Front. Microbiol.*, 2017, 10 : 3389.
- **Moreira J.** da V., Modélisation de la bascule métabolique chez les cellules eucaryotes : Application à la production de citrate chez la levure *Yarrowia lipolytica*. LIX - Laboratoire d'informatique de l'École polytechnique. Thèse de doctorat en Biotechnologie. Université ParisSaclay. France., 2019.
- **Mukherjee A.K.,** Adhikari H. et Rai S.K. 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. *J. Biochem Eng.*, 2008, 39: 353-361.
- Murthy PS,** Naidu MM. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Appl Sci J* 2010;8:199–205.
- Markovits A,** Acevedo F. Effect of the medium composition on the synthesis of protease by *Aspergillus* sp. *Rev Argent Microbiol* 1980;12:34–8.
- **Matkawala F,** Nighojkar S, Kumar A, Nighojkar A (2019) A novel thio-dependent serine protease from *Neocosmospora* sp. N1. *Heliyon* 5:e022246. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02246>

- **Mikolajczak B**, Iwan óska E, Spsychaja A, Danyluka B, Montowska M, Grzes ó B, Banach JK, Zywnica R, Pospiec E (2019) An analysis of _ the influence of various tenderising treatments on the tenderness of meat from Polish Holstein-Friesian bulls and the course of changes in collagen. *Meat Sci* 158:107906. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107906>.
- Mahanta, N.**, Gupta, A., Khare, S.K., 2008. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresour. Technol.* 99 (6), 1729–1735. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.046>.
- Mothe, T.**, Sultanpuram, V.R., 2016. Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*. *3. Biotech.* 6 (1), 53. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0377-y>.
- **MN Ahmad**, Mat Noh NA, Abdullah EN, Yarmo MA, Mat Piah MB, Ku Bulat KH (2019) Optimization of a protease extraction using a statistical approach for the production of an alternative meat tenderizer from *Spondias cytherea* roots. *J Food Process Preserv* 43(11):1–14. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14192>
- Nilegaonkar SS**, Zambare VP, Kanekar PP, Dhakephalkar PK, Sarnaik SS. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresour Technol* 2007;98:1238–45.
- **Norazmi Mohammad** Ahmad1 • Nik Husna Nik Hilmi1 • Erna Normaya1 • Mohd Ambar Yarmo2 • Ku Halim Ku Bulat, 2020." Optimization of a protease extraction using a statistical approach for the production of an alternative meat tenderizer from *Manihot esculenta* roots", *J Food Sci Technol* <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04317-5>.
- **Pelmont J.**, (1995). *Enzymes : catalyseurs du monde vivant*. Presse Universitaire de Grenoble. pp. 7; 621; 652–654.
- **Pandey A.**, Soccol C.R., Larroche C. (2016),. *Développements actuels de la fermentation à l'état solide*. Asiatech Publishers, INC. SPRINGER, New Delhi, Inde.
- **Pandey A.** et Soccol C.R. Economic utilization of crop residues for value addition. A futuristic approach. *J. Sci. Ind. Res.*, 2000, 59: 12-22.

- **Plackett RL**, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 1946;33:305–25.
- **Purslow PP** (2018) Contribution of collagen and connective tissue to cooked meat toughness; some paradigms reviewed. *Meat Sci* 144:127–134. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.03.026>
- **Rao M.B.**, Tanksale A.M., Ghatge M.S. et Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 1998, 62(3): 597–635.
- **Rahardjo Y.S.P.**, Tramper J., Rinzema A. (2006). Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol. Adv.* 02:161- 179.
- **Raimbault M.** Fermentation en Milieu Solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé. Thèse d'Etat.Th Sci Nat. Université Paul Sabatier, Toulouse, France. 1980.
- **Roussos S.** Croissance de *Trichoderma harzianum* par Fermentation en Milieu Solide: Physiologie, Sporulation et Production de Cellulases. Thèse de doctorat, Université de Marseille.1985.
- **Rawdkuen S**, Jaimakreu M, Benjakul S (2013) Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* latex. *Food Chem* 136(215):909–916. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.077>
- Soong Y.H.**, Valerie N.L., Seongkyu Y.C.L. et Dongming X. Cellular and metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowialipolytica* for bioconversion of hydrophobic substrates into high value products. *Eng. Life Sci.*, 2019, 19 : 423–443.
- **Sine J-P.** Enzymologie et applications. Ellipses Edition marketing S.A, Paris. 2010.
- **Singh R.**, Anshumali M., Manoj K. et Praveen K.M. Microbial Proteases in Commercial Applications. *J. pharm chem biol.*, 2016, 14(3): 365-374.
- **Sumantha A.**, Sandhya C., Szakacs G., Soccol C. R., Pandey A. (2005). Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technology and Biotechnology.*4:313-319.

- **Sumantha A.**, Sandhya C., Szakacs G., Soccol C. R., Pandey A. (2005). Production and partial purification of a Neutral metallo-protease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technology and Biotechnology*.04: 313-319.
- **Singhania, R.R.**; Patel, A.K.; Soccol, C.R.; Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation *Biochemical Engineering Journal.*, 44, 13-18.
- **Sandhya C**, Nampoothiri KM, Pandey A. Microbial proteases. *Method Biotechnol* 2005;17:165–79.
- **Sepehr MN**, Zarrabi M, Amrane A. Removal of CR (III) from model solutions by isolated *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* living microorganisms: Equilibrium and kinetic studies. *J Taiwan Inst Chem Eng* 2012;43:420–7.
- **Sun Q**, Fusheng F, Geng F, Luo Y, Gong S, Jiang Z (2018) A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. *Food Chem* 245:570–577. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.113>
- **Theron LW**, Divol B (2014) Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(21):8853–8868.
- **Thomas, L.**, Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid–state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146–161
- **Vázquez J. A.**, Araceli M., Ana I.D., Margarita N., Andrea F.C., Ricardo I.P.M et Isabel R. A. Production of Valuable Compounds and Bioactive Metabolites from By-Products of Fish Discards Using Chemical Processing, Enzymatic Hydrolysis, and Bacterial Fermentation. *Mar. Drugs.*, 2019, 17(3): 139.
- **Zemmouri S.** et Zemouri N. Mise en évidence d'une protéase produite par une archée halophile extrême et essai de protéase brut comme ingrédient de détergent à lessive. Mémoire de Master en Biotechnologie microbienne, Université M'hamed Bougarra de Boumerdes, Algérie. 2017.
- **Zhu X**, Kaur L, Staincliffe M, Boland M (2018) Actinidin pretreatment and sous vide cooking of beef brisket: effects on meat microstructure, texture and in vitro protein digestibility. *Meat Sci* 145:256–265. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.029>.
- [http://fr.wikipedia.../Candida_\(genre\)](http://fr.wikipedia.../Candida_(genre)).

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : Amiour Ilhem

Bendjeddou Hayame

**les protéases d'origine levurienne produites par fermentation
sur milieu solide**

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Résumé :

Les enzymes protéolytiques font partie des hydrolases connus par leurs applications dans divers domaines.

Cette étude vise à valoriser les déchets agro-alimentaires par fermentation sur milieu solide ceci est dont le but de diminuer le coût de production de ces enzymes.

Au vu, des résultats obtenue des travaux antérieurs l'optimisation de la production des protéases par différentes souches microbiennes permet d'appliqué ces enzymes dans différents domaines : attendrissement de la viande, en détergence, textileetc.

Mots-clés :

Enzymes protéolytique, Fermentation, Optimization, Applications, Valorisation.

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mme BENNAMOUN L. (M.C.B, Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Examineur 1 : Mr NOUADRI T. (M.C.A, Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Examineur 2 : Mme DAKHMOUCHE S. (M.C.A, ENS, ASSIA DJEBAR, Constantine 3)

