

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

كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de la Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire
قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

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 Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Optimisation de la production de la protéase de
Clavispora lusitaniae et Caractérisation de l'enzyme**

Présenté par : TLILANI Meissoune
ZEHILOUA Narimene

Le 29/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : M^{me} Dakhmouche S. M.C.A - ENS Assia Djébar, Constantine.

Examineur 1 : M^{me} Bennamoun L. M.C.B - Université Frères Mentouri, Constantine 1.

Examineur 2 : M^{me} Lahneche M.A. M.C.B - ENS Assia Djébar, Constantine.

Année universitaire

2021 - 2022

*Remerciements
et dédicaces*

Remerciements

Nous tenons à exprimons tout d'abord, nos profonds remerciements et louanges à DIEU «ALLAH» le tout puissant le miséricordieux qui nous a guidé sur le droit chemin et de nous avoir accordé la Santé la force, la volonté le courage et la patience pour mener ce modeste travail à son terme.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications au Biopôle de Chaab-Ersass, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des frères MENTOURI, Constantine1

*Au terme de ce travail nous tenons d'abord à adresser notre profonde et sincère gratitude à notre professeur **Mme Dakhmouche** enseignante à ENS Assia Djebbar, Constantine d'avoir accepté de nous encadrer et de nous diriger.*

Nous ne saurions jamais oublier sa disponibilité, Sa compétence et ses conseils pour la réalisation de notre travail de recherche.

*Nous exprimons nos vifs remerciements à l'ensemble des membres de jury, **Mme Bennamoun Laila** et **Mme Lahneche Maya Amina** en*

tant qu'examinatrices, pour avoir mobilisé de leur temps pour examiner et juger ce travail.

*Nous remercions aussi **Mr Nouadri** responsable du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications et tous les*

*membres du laboratoire à savoir : **M^{elle} Chaib ibtissam***

*Sans oublier de remercier **M^{elle} Boutiti Kawther** membre au laboratoire de la biotechnologie végétale*

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin afin que notre travail puisse voir le jour.

Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant,.Qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie:

*A ma chère et adorable mère : **Boukammh Sofia** Pour son affection, sa patience, sa compréhension et leur soutien tout au long de mes études, sa disponibilité, et son soutien sans égal dans les moments*

s les plus difficiles de ma vie. Elle m'a arrosé de tendresse depuis ma naissance par son amour et ses prières a toujours crues en ma réussite.

*A mon père: **Ali** qui m'a toujours fait confiance et poussée à donner le meilleur de moi-même, de par son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils.*

Quoi que je fasse je ne pourrais pas leur rendre ce qu'ont fait pour moi, si je suis arrivée là c'est bien grâce à eux .Rien au monde ne vaut les efforts fournis par vous jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être .Que dieu les bénisse, la préserve et lui accorde santé et longue vie. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi,

*A mes frères : **Abdeerahman** et **Abdeeldjalil** .*

*A mes chères sœurs : **Balkisse** et **zina** plus précisément à ma sœur **Zina** pour leur soutien durant mon parcours universitaire plus particulièrement ce mémoire.*

*Et à ma petite sœur: **Aya tassnim** que je l'aime profondément.*

*A ma chère **Rachel**, qui m'a accompagnée durant les périples et pendant les bons et les mauvais moments de ces dernières années. Je t'aime beaucoup ma chère. Que Dieu garde notre amitié pour toujours*

*A mes deux défunts grands-pères : **Taher, Mohamed**.*

*À ma grand-mère **batul**, mes chères tantes : **Radia, Toubha, Zehra, moufida siham** et **Shahinaz**. Mes cousines : **Yousra, Roufaida, Nihed**. À mes oncles **hamza, moussa** et **fares** .*

A tous mes professeurs et tous ceux qui m'ont enseigné au long de ma vie scolaire.

*À toutes mes amies : **Chaima Ayat, Nour Ati, Layachi Linda, Aiech Sabrina, Meriem Batul, Haifa, Zergane Sofia , Yahyaoui Amel, Boufoula Doha** et **Scherazade** .*

À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer et qui m'ont aidée et soutenue de près ou de loin.

À tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer.

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

♥ *Meissoune* ♥

Dédicace

Tout d'abord, je remercie Allah, le tout puissant de m'avoir accordé la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce travail.

Je dédie ce modeste travail

A la personne la plus chère à mon cœur Maman Benbakir Cherifa

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect ; Mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous ma avez donné dans toute ma vie et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu. Le Très Haut vous. Vous accordez santé. Bonheur et longue vie.

A mon cher père Aissa

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être ; j'espère avoir répondu aux espoirs que tu as fondé en moi, que Dieu tout puissant te garde santé, bonheur et longue vie pour que tu demeureras le flambeau illuminant mon chemin.

A mes chers sœurs Sarah, Hadjer et Meriem

En témoignage de ma tendresse pour vous, je vous dédie ce travail avec mes vœux de bonheur et de réussite.

A ma chère nièce Ayla, je t'aime beaucoup. Qu'Allah te protège et te garde pour nous.

A toute les membres de ma famille.

A ma chère binôme Meissoune nous avons passé de bons moments ensemble que Dieu garde notre amitié pour toujours.

A toutes mes amies surtout : Nouna, Imene, Oumnia, Djouheina, Amani, Linda et Sabrina.

A tous mes professeurs Et à toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue de près ou de loin Que Dieu vous protège et vous bénisse tous.

*♥ **Marimene Rachel** ♥*

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Etude Bibliographique

Chapitre 01 : Levures

I. Habitat des levures	3
II. Morphologie et structure	4
1. Paroi cellulaire.....	4
2. Cytoplasme.....	5
3. Noyau.....	5
III. Classification des levures	5
1. Les ascomycètes.....	6
2. Les basidiomycètes.....	6
3. Les deutéromycètes.....	6
IV. Taxonomie du modèle biologique	6
V. Métabolisme chez les levures	7
1. Métabolisme oxydatif aérobie (Respiration).....	7
2. Métabolisme fermentaire (Anaérobie).....	7
VI. Mode de reproduction	7
VII. Physiologie et croissance des levures	9
1. Besoins nutritionnels.....	9
1.1. Sources de carbone.....	9
1.2. Source d'azote.....	9
1.3. Oligoéléments et facteurs de croissance.....	9
2. Conditions physico-chimiques de la croissance.....	10
2.1. Température.....	10
2.2. pH.....	10

2.3. Oxygène.....	10
2.4. Pression osmotique.....	10
VIII. Applications des levures.....	11
1. Boissons alcoolisées.....	11
2. Panification.....	11
3. Affinage des fromages.....	12
4. Production de protéines.....	12

Chapitre 02 : Enzymes protéolytiques

I. Classification des protéases.....	14
1. Selon la localisation cellulaire.....	14
1.1. Protéases intracellulaires.....	14
1.2. Protéases extracellulaire.....	14
2. Selon longueur de la chaîne polypeptidique	14
3. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....	15
3.1. Exoprotéases.....	15
3.1.1. Aminopeptidases.....	15
3.1.2. Carboxypeptidases.....	15
3.2. Endopeptidases.....	15
4. Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif.....	16
4.1. Sérine Protéases (EC 3.4.21).....	16
4.2. Cystéine/ thiolProtéases (EC 3.4.22).....	16
4.3. Protéases aspartiques (EC 3.4.23).....	16
4.4. Métalloprotéases (EC 3.4.24).....	16
5. Selon le pH optimal de l'activité	17
5.1. Protéases alcalines.....	17
5.2. Protéases acides.....	17
5.3. Protéases neutres.....	17
6. Selon la séquence et des similitudes structurelles MEROPS.....	17
7. Selon leur besoin en ATP.....	18
II. Sources de protéases.....	18
1. Protéases animales.....	18
2. Protéases végétales.....	19
3. Protéases microbiennes.....	19

3.1. Protéases bactériennes.....	19
3.2. Protéases fongiques.....	20
3.2.1. Protéases des moisissures.....	20
3.2.2. Protéases des levures.....	20
III. Production de protéase.....	21
1. Fermentation liquide FML.....	21
2. Fermentation solide FMS.....	22
• Avantages de la fermentation solide.....	22
IV. Méthodes d'optimisation.....	23
1. OFAT (One Factor at a Time).....	23
2. Plan de Plackett et Burman (1946).....	23
3. Plan de Box et Wilson.....	24
V. Applications des protéases.....	24
1. Application dans l'industrie laitière.....	24
2. Application dans l'industrie de la boulangerie.....	25
3. Application dans l'industrie de la bière.....	25
4. Application dans l'industrie du vin.....	25
5. Fabrication de produits à base de soja.....	25
6. Synthèse de l'aspartame.....	26
7. Industrie du cuir : Tannage.....	26
8. Médecine esthétique et produits de beauté.....	26
9. Applications pharmaceutiques et médicales.....	26
10. Industrie des détergents.....	27
11. Synthèse d'hydrolysats de protéines (Peptides bioactifs).....	27
12. Récupération d'argent.....	27
13. Traitement des déchets.....	27
14. Industrie chimique.....	28
15. Industrie de la laine.....	28

Matériel et méthodes

I. Matériel biologique.....	29
1. Souche levurienne.....	29
2. Repiquage de la souche.....	29

3. Préparation de l'inoculum.....	30
4. Dénombrement des cellules.....	30
II. Substrat de fermentation.....	31
III. Optimisation protéolytique.....	31
• Plan composite centré de Box et Wilson.....	31
IV. Milieu de fermentation.....	32
V. Extraction enzymatique.....	33
VI. Méthodes analytiques.....	34
1. Détermination de la matière sèche.....	34
2. Détermination des protéines (Lowry et <i>al.</i> , 1951).....	34
3. Dosage de l'activité protéolytique (ANSON 1938).....	34
VII. Analyse statistique.....	35
VIII. Essais en conditions optimales.....	35
IX. Etude des caractéristiques de la protéase produite.....	35
1. Détermination du pH optimal.....	35
2. Détermination de la température optimale.....	35
3. Effet de sels et détergents sur l'activité protéasique.....	36

Résultat et discussion

I. Production de protéase.....	37
• Optimisation des conditions de culture par les méthodes statistiques (plan de Box et Wilson).....	37
II. Analyse statistique.....	39
III. Graphiques de Pareto.....	41
IV. Détermination des interactions entre les variables.....	42
1. Interactions entre C ₃ (le temps d'incubation) et C ₂ (l'inoculum).....	42
2. Interactions entre C ₃ (le temps d'incubation) et C ₁ (humidité).....	43
3. Interactions entre C ₁ (humidité) et C ₂ (l'inoculum).....	44
V. Détermination des optima.....	44
1. Humidité.....	45
2. Inoculum.....	46
3. Temps d'incubation.....	46
VI. Validation expérimentale du modèle.....	47

VII. Etude des caractéristiques physico-chimiques de la protéase.....	47
1. Effet du pH sur l'activité de la protéase.....	47
2. Effet de la température sur l'activité de la protéase.....	48
3. Effet des sels et des détergents sur l'activité de protéase.....	50
3.1. Effet des sels sur l'activité de la protéase.....	50
3.2. Effet des détergents sur l'activité de la protéase.....	52
Conclusion générale.....	54
Références bibliographiques.....	55
Annexes.....	72
Résumés	

Liste des abréviations

FMS : Fermentation milieu solide.

FML : Fermentation milieu liquide.

YPGA : Yeast extract-Peptone-Gelose-Agar.

Rpm : Rotation par minute.

C° : Degré celsius.

Min : Minute.

H : Heure.

ml : Millilitre.

µl : Microlitre.

MS : Matière sèche.

CCD : Central Composite Design.

pH : potentiel d'hydrogène.

P : Probabilité.

ANOVA : Analyse of Variances.

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique Acide.

SDS : Sodium DodécylSulfate .

TCA : TriChloroacetic Acide.

BSA : Bovin Serum Albumin.

RSM : Méthodologie de surface de réponse (Response surface methodology).

Liste des figures

Figure1 :Structure de la levure.....	5
Figure 2 : Division d'une cellule de levure par bourgeonnement	8
Figure 3 : Reproduction sexuée d'une levure	8
Figure 4 : Culture après ensemencement par la méthode des stries.....	29
Figure 5 : Quadrillage de cellule de thomas.....	30
Figure 6 : Fermentation en milieu solide.....	33
Figure 7 : Extraction enzymatique.....	33
Figure 8 : Charte Pareto des effets standardisés des paramètres opératoires sur l'activité de protéase.....	42
Figure 9 : Graphique de contour de l'interaction entre C ₂ (inoculum) et C ₃ (temps d'incubation).....	43
Figure 10 : Graphique de contour de l'interaction de C ₁ (humidité) et C ₃ (temps d'incubation).....	43
Figure 11 : Graphique de contour de l'interaction entre C ₁ (humidité) et C ₂ (inoculum).....	44
Figure 12 : Valeurs optimales des variables et de la réponse déterminées par « RSM » pour une meilleure activité protéolytique.....	45
Figure 13 : Effet du pH sur l'activité de protéase.....	48
Figure 14 : Effet de la température sur l'activité proteolytique.....	49
Figure 15 : Effets des sels sur l'activité protéolytique.....	51
Figure16 : Effet des détergents sur l'activité protéolytique.....	52
Figure 17 : Courbe étalonnage des protéines.....	74
Figure 18 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine.....	77

Liste des tableaux

Tableau 1 : Production et utilisation de certaines enzymes levuriennes.....	13
Tableau 2 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan centré de Box et Wilson.....	31
Tableau 3 : Matrice expérimentale du plan composite pour l'étude de trois facteurs.....	32
Tableau 4 : Activités enzymatiques selon le plan de Box et Wilson.....	38
Tableau 5 : Résultats de l'analyse pour l'optimisation de l'activité de protéase.....	40
Tableau 6 : Analyse de la variance.....	41
Tableau 7 : Activités enzymatiques résiduelles après traitement par les sels.....	50
Tableau 8 : Activités enzymatiques résiduelles après traitement par les détergents.....	53
Tableau 9 : Protocole de dosage des protéines.....	73
Tableau 10 : Protocole de préparation de la courbe d'étalonnage.....	74
Tableau 11 : Protocole de l'étape 01 de dosage de l'activité protéasique.....	75
Tableau 12 : Protocole de l'étape 02 de dosage de l'activité protéasique.....	76
Tableau 13 : Protocole de préparation de la courbe d'étalonnage.....	76

Introduction

Les enzymes ont, toujours, fait partie de la vie quotidienne de l'homme (Nobel., 2004). Elles sont présentes dans toutes les cellules et sont indispensables pour la survie de toutes les espèces vivantes (Van Bielen et Li, 2002). En effet, elles sont utilisées comme catalyseurs pour induire des réactions chimiques et stimuler les processus de production (Mukhtar et Haq., 2013). Le marché des enzymes est très prometteur, en effet, il a atteint 6,30 milliards de dollars US en 2022. Cette demande croissante est liée à l'expansion des installations de traitement des aliments et au nombre croissant de tanneries et d'installations de fabrication de textiles (Kuddus, 2019).

Parmi ces enzymes, les protéases occupent une place centrale avec plus de 65 % du marché mondial (Mukhtar et Haq., 2013) car elles offrent de nombreuses possibilités d'applications. Elles sont utilisées dans la transformation de la viande (Rao *et al* 1998), la transformation des fromage (Gupta et Khare .,2007), la transformation des aliment (Delia, 2001) ,la panification (Robinson *et al* 2006) ,le traitement de la laine et le dégomme de la soie dans les industries textiles (Ravel et Banerjee 2003) ,la récupération de l'argent dans les films photographiques (Shankar *et al*,2010) ,les industries du tannage (Feroz, 2013), l'industrie de l'alimentation des volailles (Oxenboll *et al*.,2011). De plus, les protéases se retrouvent aussi bien dans les plantes que chez les animaux et les microorganismes. Ces microorganismes qui, grâce à leur diversité biochimique extensive représentent une source exceptionnelle de ces protéases. En effet, ces microorganismes produit 40% des enzymes industrielles parmi lesquels les souches fongiques (García *et al.*, 2009). Pour répondre aux besoins de l'industrie plusieurs recherches ont été menées sur la production de protéases. Tels que le coût principal de la production de protéases par le processus de fermentation est le milieu et les ingrédients utilisés pour la croissance microbienne (Sugumaran et Ponnusami., 2015), Par exemple l'utilisation de déchets industriels comme substrat est une bonne stratégie pour là pour la production à faible coût de protéase (Mukhtar et Haq., 2013).

Actuellement, pour produire les protéases on utilise la fermentation à l'état solide (SSF) ou la fermentation submergée (SmF) (Contesini *et al.*, 2018 ; Razzaq *et al.*, 2019 ; Dos Santos Aguilar et Sato.,2018). Cependant certaines caractéristiques rendent la fermentation à l'état solide plus choisie que la fermentation submergée à savoir : le coût, la simplicité, le rendement plus élevé, la stabilité du produit, les exigences de stérilité moindres, etc., (Contasini *et al.* 2018).

Aujourd'hui, les procédés en phase solide attirent plus à travers le monde surtout la valorisation des sous-produits agricoles pour la production de divers produits et substances. (Van Dyk *et al.*, 2013), tels que les déchets de tomates et les restes de pain.

La protéase est une enzyme importante en industrie, mais sa production en masse implique des coûts élevés. Cette production est influencée par la composition des milieux de culture microbienne. Il est donc important d'améliorer le milieu de fermentation par l'optimisation du milieu de culture de manière à obtenir une meilleure croissance et une productivité élevée des métabolites (Unni, 2019). Il s'est avéré que l'optimisation du milieu de fermentation et des conditions du procédé afin de maximiser la production d'enzymes est nécessaire. Certaines recherches ont déjà été menées sur l'amélioration de la fermentation submergée, par l'optimisation des facteurs tels que les différentes concentrations de carbone et d'azote (Nisha et Divakaran., 2014). Différents plans statistiques sont utilisés pour l'amélioration des protéases notamment, les plans de Plackett et Burman et les plans de Box et Wilson (1951).

L'objectif principal de notre travail est :

- La production de la protéase par la levure *Clavispora lusitaniae* cultivé en fermentation en milieu solide (FMS) sur les restes du pain et les déchets de tomates. Ces sous-produits sont, en effet, riches en glucides et en protéines ce qui entraînera une bonne croissance de la levure et une bonne production d'enzymes.
- L'optimisation de la production de la protéase par l'application des plans statistiques de Box et Wilson (1951).
- La caractérisation de la protéase de *Clavispora lusitaniae* .

Pour élaborer ce travail, nous avons jugé nécessaire de le diviser en deux parties dont la première est une synthèse bibliographique contenant deux chapitres, le premier renferme l'étude des levures protéolytiques, la seconde porte sur l'étude des protéases et la production protéasique. Quant à la deuxième partie, elle concerne la méthodologie adoptée lors de la présente étude, en exposant les résultats et leur discussion. Finalement, on termine par une conclusion générale et des perspectives.

*Etude
bibliographique*

Chapitre 1 :

Levure

Levures

Les levures sont les premiers micro-organismes à être observés au microscope, dessinés par A. Van Leeuwenhoek en 1680 et identifiés par Pasteur comme agents des fermentations. L'homme les a utilisés, depuis des millénaires dans la fabrication des boissons alcoolisées et du pain par fermentation (Bouix et Leveau, 1991 et. Pol, 1996). Les travaux de Büchner ont montré que ce microorganisme est à l'origine du développement de la biochimie. En 1881, Hansen Emile, a décrit l'isolement des premières souches pures de *Saccharomyces* à partir de moûts. Plus tard, d'autres espèces de levures ont été identifiées entre 1950 et 1970 (Basmaji, 2005). Les levures représentent un matériel expérimental de choix à cause leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes (Pol, 1996). Elles permettent un développement rapide grâce à leurs faibles exigences en nutriments. Ainsi, elles sont utilisées comme systèmes modèles en Biochimie, en Génétique et en Biologie Moléculaire (Lachance, 2011).

Les levures sont utilisées par l'homme dans les disciplines scientifiques, alimentaires, médicales et agricoles. Elles sont traditionnellement les premiers microorganismes impliquées dans nombreuses fermentations alimentaires et la fabrication de produits tels que la bière, le cidre, le vin, le saké, les produits de boulangerie, le fromage, les saucisses et d'autres aliments fermentés. Elles sont utilisées pour la production du glycérol, certaines vitamines et solvants, et aussi pour la revalorisation de déchets agricoles industriels. Les levures continuent d'être utilisées pour le bénéfice de l'humanité dans la production de protéines recombinantes et à la production des protéines notamment les enzymes destinées à l'application industrielle comme la protéase, l'amylase, la cellulase, la lipase etc.) Et d'autres substances (Scriban, 1984 et Lecterc et al, 1995).

I. Habitat des levures

Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes microscopiques. Elles font partie du groupe des champignons unicellulaires qui constituent un groupe morphologique et physiologique relativement homogène. Elles sont distinguées, généralement, par l'absence de vrai mycélium (au moins dans la plus grande partie de leur cycle biologique) (Guiraud 2016).

Les levures sont des microorganismes ubiquitaires qui peuvent coloniser plusieurs niches écologiques : l'air (Starmer et Lachance, 2011), le sol (Laiche, 2011), l'eau douces et

profondes associées au plancton (Van Uden et Fell, 1968 et Ahearn, 1973), le tube digestif de certains animaux et les galeries d'insectes (Lachance *et al.*, 2001, Lachance *et al.*, 2006, Walker, 2009 et Starmer et Lachance, 2011). Certaines levures ont été isolées à partir d'environnements extrêmes comme l'Antarctique (Satyanarayana et Kunze, 2009). D'autres vivent, principalement, sur les végétaux riches en sucres, en particulier les fruits (Magliani *et al.*, 1997, Walker, 2009, Bouix et Leveau, 1991, Jimoh *et al.*, 2012, Greppi *et al.*, 2013 et Adewara *et al.*, 2013), à savoir le raisin (Oteng-Gyang, 1984). Aussi, les produits alimentaires (Stratford, 2006) comme le yaourt (Lopandic *et al.*, 2006), fromage (Prillinger *et al.*, 1999 ; Jacques et Caseregola, 2008 et Binetti *et al.*, 2013), le miel (Jimoh *et al.*, 2012 ; Greppi *et al.*, 2013 ; Adewara *et al.*, 2013) les dattes (Rezki *et al.*, 2013), les pelures de pomme de terre (Ouédraogo *et al.*, 2012) semblent être des niches favorables pour les levures.

II. Morphologie et structure

La levure a la morphologie la plus simple, elle s'agit d'une cellule unique, libre ou associée en paire, en chaînes ou en petits amas. Elle est sphérique, ovoïde, globuleuse, cylindrique, elliptiques, allongée, apicule (en citron), ogivale, triangulaire ou en forme de bouteille ou de formes plus spécifiques (Walker, 2009, Kutzman *et al.*, 2011 et Guiraud 2016). Les levures sont immobiles ; la taille des cellules est grande par rapport à celle des bactéries : elle varie selon les espèces entre 5 et 20 μ (Guiraud, 2016) allant de 2-3 μ m à 20-50 μ m de longueur, et 1-10 μ m de largeur (Anaisie *et al.*, 2003). Ces dimensions et aspects dépendent fréquemment des conditions de culture et l'âge des cellules (Scherr et Weaver, 1953). La morphologie cellulaire peut être examinée facilement à l'objectif $\times 40$ pour une préparation à l'état frais, Les colonies sont généralement blanches (très rarement roses ou rouges) et régulière. Les cultures en milieu liquide agité donnent un trouble uniforme (sauf en cas de floculation) (Guiraud, 2016) (Figure 1). Les cellules de levure sont constituées de :

1. Paroi cellulaire

La cellule de levure est limitée par une paroi rigide et élastique, enveloppant la cellule, riche en polysaccharides antigéniques (glucanes, mannanes et phosphomannanes liés à des peptides), en chitine (au niveau des bourgeons), en protéines (mannoprotéines) dont certaines sont des enzymes. La membrane cellulaire est constituée de protéines et de lipides certaines espèces possèdent une capsule polysaccharidique (Guiraud, 2016). En général, la

paroi cellulaire des levures est un organe complexe représentant 15 à 30% du poids sec de la cellule (Figure 1) (Romero, 2012).

2. Cytoplasme

Il est le siège de toutes les transformations biochimiques contenant tous les organites cellulaires : les vacuoles, les ribosomes, les mitochondries un argastoplasme et les réserves (tréhalose, glycogène, etc.) (Figure 1) (Guiraud, 2016).

3. Noyau

Le noyau Contient plusieurs chromosomes et il est limité par une membrane (Figure 1) (Guiraud, 2016).

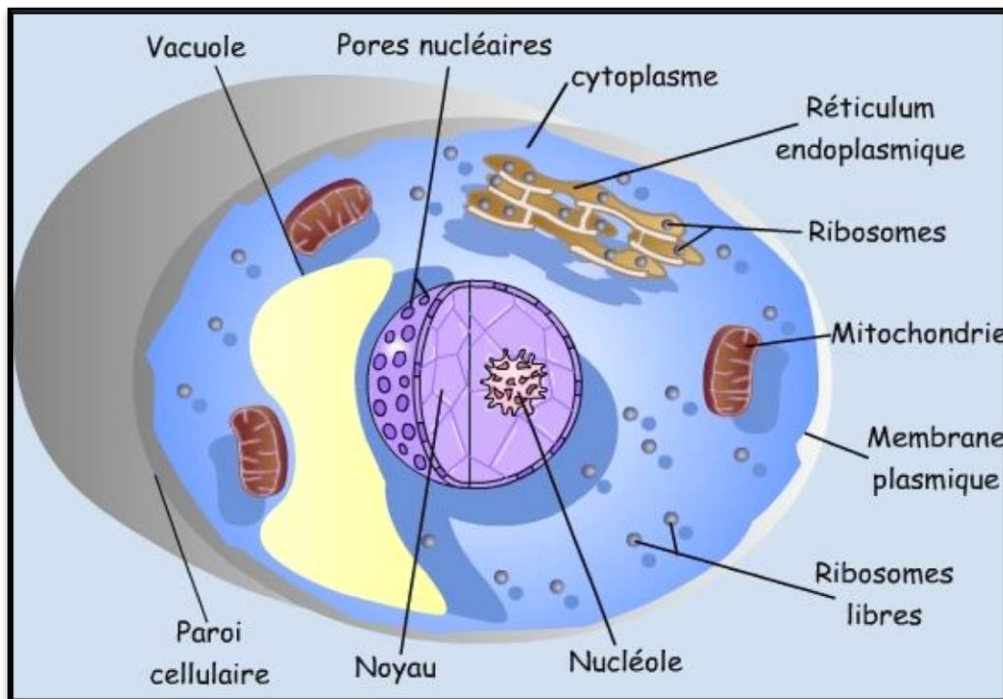


Figure1 :Structure de la levure.(web1)

III. Classification des levures

Grâce au développement des techniques d'analyses, Lodder (1971) a pu établir une classification des levures basée sur les critères morphologiques, culturels, sexuels et physiologiques ; mais l'isolement de nouvelles souches, ainsi que l'avènement des biotechnologies, ont permis par la suite à Kreger-Van Rij en (1984) de réactualiser cette classification qui est devenue actuellement une référence et comprend une soixantaine de

genres et près de 500 espèces (Kreger-Van Rij, 1984). On distingue actuellement trois grandes classes de levures, selon leur mode de reproduction :

- 1. Les ascomycètes :** Elles sont également appelées levures ascosporigènes, se reproduisent par un processus sexué, ou les ascospores sont endogènes (à l'intérieure de la cellule) et enfermés dans une structure issue du zygote dans l'asque.
- 2. Les basidiomycètes :** Elles sont capables d'élaborer des spores à l'extérieur du zygote (externes). Elles réalisent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores après méiose. Chez les levures, elles sont souvent appelées ballistosporos.
- 3. Les deutéromycètes :** ou levures imparfaites, elles regroupent l'ensemble des levures ne présentant pas de mode de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative (Kreger-Van Rij, 1984).

IV. Taxonomie du modèle biologique ; *Clavispora lusitaniae* strain CBS 6936 T

Le genre *Candida* fait partie du phylum des Ascomycètes de la classe des Saccharomycètes (forme sexué). En mycologie humaine, la forme sexué étant rarement rencontrée, le nom de la forme asexué (anamorphe) est alors utilisé. Ce genre comprend environ 200 espèces, mais moins d'une vingtaine d'entre elles sont fréquemment impliquées dans un processus pathologique (Ripert, 2013). Ce genre, le plus fréquemment isolé en pathologie humaine, est responsable de plus de 80 % des infections à levures (Koenig, 1995).

Règne : *Champignon.*

Phylum : *Ascomycota.*

Subphylum : *Ascomycotina.*

Classe : *Saccharomycetes.*

Ordre : *Saccharomycétales.*

Famille : *Saccharomycetaceae.*

Genre : *Candida.*

Espèce : *Clavispora lusitaniae* strain.

V. Métabolisme chez les levures

Les levures présentent une diversité métabolique dans la façon de production et de consommation de l'énergie à partir de substrats dégradés (Pol, 1996). Le métabolisme des levures se déroule aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose (Signoret et Bergler 2021) :

1. Métabolisme oxydatif aérobie (Respiration)

Toutes les levures sont capables d'utiliser le glucose en présence d'oxygène en rejetant du dioxyde de carbone et l'eau, et sans oublier de l'énergie (Signoret et Bergler 2021), par conséquent, leur métabolisme est exclusivement respiratoire et le pyruvate formé est oxydé par le cycle de Krebs. Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux levures une importante multiplication. En plus des sucres simples, certaines levures utilisent d'autres glucides (mono, di ou tri saccharides et des polysaccharides comme l'amidon), mais aussi des alcools, des acides et des alcanes (Larpent, 1991 et Le Blanc, 2008).

2. Métabolisme fermentaire (Anaérobie)

En plus du métabolisme oxydatif, certaines levures, en absence d'oxygène, peuvent privilégier une dégradation des glucides par un processus fermentatif (cas de la fermentation alcoolique), qui conduit à la formation d'éthanol et de CO₂, avec une coproduction, du glycérol des alcools, des aldéhydes, des esters, des acides en petites quantités. Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif (Guiraud et Rosec, 2004 Leyral et Vierlin 2007 ; Lai, 2010). Cette quantité d'énergie est 20 fois moins que celle obtenue en aérobiose (Encyclopaedia, 1985).

La levure a la capacité de passer assez rapidement d'un métabolisme à l'autre selon les conditions. (Signoret et Bergler, 2021).

VI. Mode de reproduction

Chez les levures, le mode de multiplication est bien spécial, il dépend des conditions du milieu (Larpent et Larpent-Gourgau, 1997), il est réalisé soit par voie sexuée, soit par voie asexuée (végétatif). Pour la plupart des levures, la reproduction asexuée est la forme majeure de multiplication, elle s'effectue par bourgeonnement ou par fission (scissiparité) à partir d'une cellule mère (Bonaly., 1991) (Figure 2).

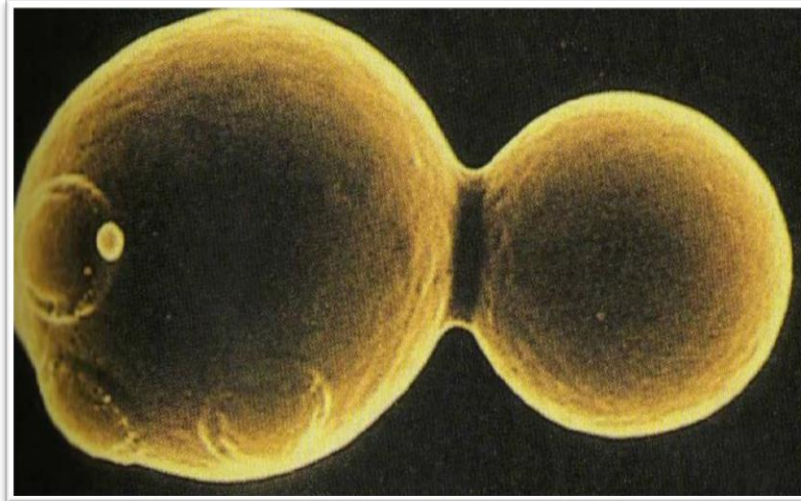


Figure 2 : Division d'une cellule de levure par bourgeonnement (Madigan et Martinko, 2007).

Dans certaines conditions de cultures, les levures sporogènes peuvent se reproduire par voie sexuée (Bourgeois et Larpent, 1996) (Figure3).

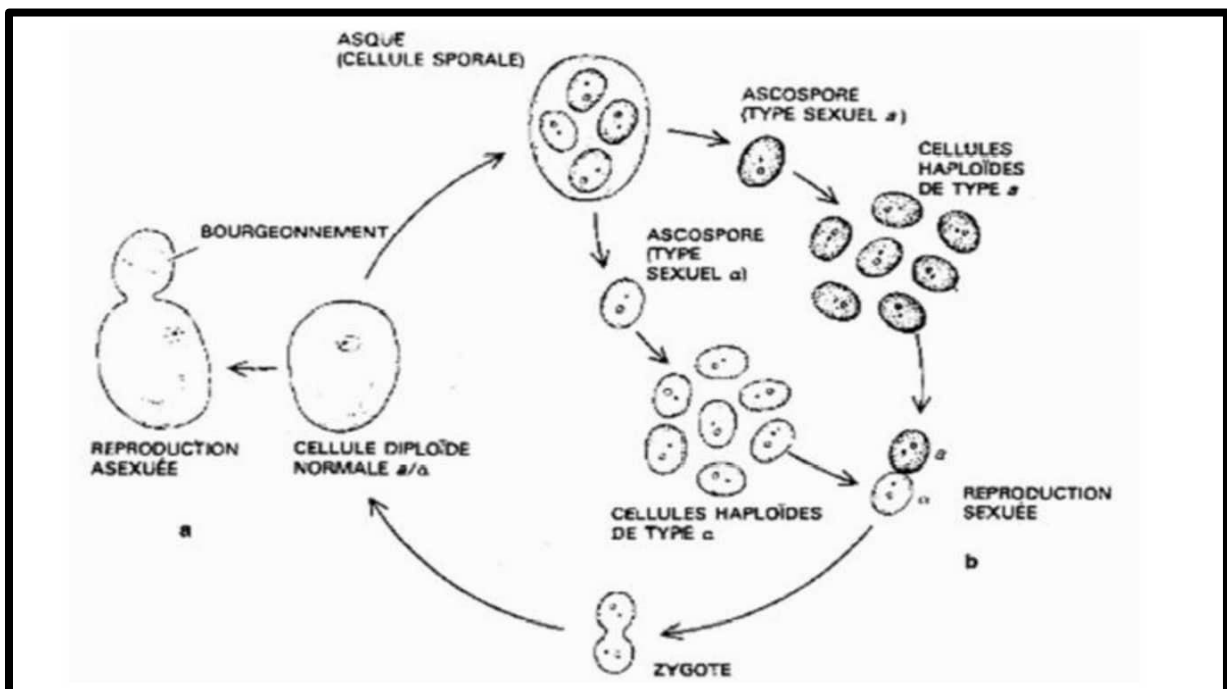


Figure 3 : Reproduction sexuée d'une levure (Larcher, 2011).
a : multiplication asexuée **b :** cycle sexuée

VII. Physiologie et croissance des levures

1. Besoins nutritionnels

Comme tout être vivant, les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour survivre, croître et se reproduire. Elles doivent trouver dans leur milieu de vie tous les éléments nécessaires à la synthèse cellulaire et des conditions physicochimiques favorables (Guiraud, 2016).

1.1. Sources de carbone

Le carbone est le composé majeur de la cellule levurienne, environ 50% du poids sec (Rivière, 1970). Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les levures puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés (les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques), leur oxydation fournit l'énergie à la cellule (Botton, 1991 et Larpent, 1991). Les oses tels que le glucose, le fructose et le mannose constituent les sources les plus efficaces (Pol, 1996). D'autres levures particulières utilisent des sources de carbone non conventionnelles comme l'éthanol et le glycérol (Tamaki et Hama, 1982).

1.2. Source d'azote

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques pour la biosynthèse d'acides aminés, de protéines, d'acides nucléiques et de vitamines (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997 ; Guiraud, 1998). Les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre (N_2). Par contre, l'assimilation des ions d'ammonium est largement répandue chez ces dernières. Toutefois, des espèces se caractérisent par leur capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés azotés tels que les acides aminés, les bases puriques et pyrimidiques comme source d'azote (Walker *et al.*, 1997 ; Bouix et Leveau, 1999).

1.3. Oligoéléments et facteurs de croissance

Comme la plupart des microorganismes, les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations (Larpent et Sanglier, 1992 et Boiron, 1996). Un excès provoquera la dénaturation d'enzymes et une perturbation de la morphologie et de la physiologie cellulaire et de la vitesse de croissance (Blom *et al.*, 2000). De plus, d'autres

facteurs, appelés facteurs de croissance, sont essentiels, comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique). Ces facteurs interviennent lors des réactions enzymatiques, comme des coenzymes (Botton *et al.*, 1990).

2. Conditions physicochimiques de croissance

2.1 Température

Les températures d'incubation des levures, se situent entre 25°C et 30°C. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans certains habitats, à savoir les régions à températures constamment basses ou élevées (Vishniac et Hempfling., 1979). La pression osmotique intervient également sur le développement des levures dont l'effet varie d'une souche à une autre (Leclerc, 1975). La majorité des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60 mais avec un métabolisme lent (Leveau et Bouix, 1979).

2.2. pH

Les levures présentent une tolérance élevée aux pH extrêmes. Elles tolèrent des gammes très larges de pH de 2,4 à 8,6 pour le milieu extracellulaire et de 5,8 à 6,8 pour le milieu intracellulaire (Bouix et Leveau, 1991).

2.3. Oxygène

Toutes les levures se développent en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes, certaines sont aérobies strictes et d'autres sont aéro-anaérobies facultatives (Bouix et Leveau, 1991).

2.4. Pression osmotique

La pression osmotique intervient également sur le développement des levures dont l'effet varie d'une souche à une autre (Leclerc, 1975). La majorité des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Certaines tolèrent des pressions

osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60 mais avec un métabolisme lent (Leveau et Bouix, 1979).

VIII. Applications des levures

Depuis longtemps, des procédés industriels impliquent les levures pour la production d'éthanol (carburant), de vaccins, de caroténoïdes et des protéines unicellulaires pour l'alimentation animale ou d'enzymes industrielles (Jacob, 1997 et Buzzini, 2000). Aussi, la levure diététique, vendue comme complément alimentaire est riche en vitamine B et en protéines, mais est carencée en acides aminés soufrés (Perry *et al.*, 2004). Elle peut être par exemple ajoutée à la farine de blé ou de maïs pour augmenter la valeur nutritionnelle (Madigan et Martinko, 2007). Les levures participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie) et dans la production des enzymes (invertase, lactase, lipase et amylases) et aussi dans la revalorisation des déchets agricoles. Donc elles sont très fréquentes dans beaucoup d'aliments et d'industries (Simon et Meunier, 1970 ; Guiraud 2016).

1. Boissons alcoolisées

Le rôle, le plus ancien des levures est la fabrication de boissons alcoolisées. Cette fabrication repose sur la fermentation alcoolique de sucres simples ou de l'amidon hydrolysé et la bioconversion de nombreux substrats saccharosés (jus de betteraves, sirop, mélasse de sucrerie) dont plusieurs dérivés peuvent être obtenus comme le bioéthanol, grâce à des levures essentiellement des souches du genre *Saccharomyces*. L'éthanol ainsi obtenu, peut remplacer partiellement ou totalement l'essence dans les moteurs à explosion et peut servir de complément au gasoil. Aussi, elles interviennent au cours de la vinification et de l'élaboration de la bière (Leveau et Bouix, 1993 ; Anonyme, 2007).

2. Panification

Depuis l'antiquité, l'utilisation des levures connue est la fabrication du pain : Le dégagement de gaz carbonique, qui accompagne la fermentation, permet de faire lever la pâte en lui conférant une texture légère. On utilise généralement, *Saccharomyces cerevisiae* appelée aussi levure de boulangerie (Simon et Meunier, 1970 et Cofalec, 2006).

3. Affinage des fromages

Les levures sont aussi capables d'utiliser les acides organiques comme source d'énergie et de carbone (Larpent, 1991). Elles participent à l'affinage des fromages ; en consommant l'acide lactique produit par les bactéries lactiques à partir des composants du lait. Elles contribuent aussi à réduire l'acidité du caillé (Leveau et Bouix, 1993). De nombreuses espèces se rencontrent en fromagerie, les plus fréquentes appartenant aux genres *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* et *Rhodotorula* (Larpent, 1991). Dans la fabrication d'un fromage, l'action des levures commence dès les premières heures de l'égouttage et se poursuit pendant tout l'affinage (Jacobsen et Poulsen, 1995 ; Leclerc *et al.*, 2004). Elles contribuent au développement des qualités organoleptiques du fromage par leurs implications aux phénomènes tels que la protéolyse, la lipolyse, la consommation d'acide lactique et la fermentation du lactose (Addis *et al.*, 2001).

4. Production de protéines

Les bonnes connaissances de la biologie moléculaire des levures et la mise au point des techniques de génie génétique, permettent de programmer les levures de façon qu'elles expriment des protéines humaines et animales recombinantes. Elles constituent une grande réussite des biotechnologies surtout d'intérêt médical tel que la productions d'enzymes (Tableau1), d'hormones peptidiques comme l'insuline par la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Mercier, 1997), de facteurs de croissance, d'hémoglobine, de ferritine, l'érythropoïétine, la sérumalbumine humaine, et la production de protéines hétérologues comme le vaccin de l'hépatite B (Blin, 2002) etc (Bouix et Leveau, 1991 ; Edelstein, 2002 et Walker, 2009 ; Rezki-Bekki, 2014).

En effet, l'invertase ou saccharase sécrétée par diverses levures est utilisée industriellement pour produire du glucose et du fructose à partir des mélasses de betterave ou de cannes à sucre (Simon et Meunier, 1970).

Tableau1 : Production et utilisation de certaines enzymes levuriennes.

Enzyme	Levures	Industrie	Références
Chymosine	<i>Klyveromyces sp.</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Préparation des aliments	Liese <i>et al.</i> , 2000 ; Pandey, 2006 ; Johnson et Echavarii, 2011.
Inulinases	<i>Candida sp.</i> <i>Klyveromyces marxianus</i>	Applications alimentaires	Liese <i>et al.</i> , 2000 ; Pandey, 2006 ; Johnson et Echavarii, 2011.
Lactase	<i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Klyveromyces sp.</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	Préparation des aliments Crèmes glacées	Liese <i>et al.</i> , 2000 ; Pandey, 2006 ; Johnson et Echavarii, 2011 et Dakhmouche , 2016 ;Simon et Meunier, 1970 et Sicard, 1982
Lipase	<i>Candida rigosa</i> <i>Pseudozyma antarctica</i> <i>Trichosporon fermentum</i> <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Candida lipolytica</i>	Préparation des aliments Arômes Dégraissage, Détergents, Fromagerie, Laiterie	Liese <i>et al.</i> , 2000 ; Pandey, 2006 ; Johnson et Echavarii, 2011 ; Dakhmouche 2016 ; Simon et Meunier, 1970 et Sicard, 1982.
Amylases	<i>Lipomyces starkey</i> <i>Schwanniomyces castellii</i>	Saccharification de l'amidon, Boulangerie,	Simon et Meunier, 1970 et Sicard, 1982.
Cellulases	<i>Candida pulcherrima</i> , <i>Cryptococcus flavus</i> , <i>Trichosporon cutanum</i>	Utilisation thérapeutique pour faciliter la digestion. la papeterie.	Béguin et Aubert, 1994;Bensmira, 2008.
Protéases	<i>Candida lypolytica</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Metschnikowia reukaufii</i> W6b <i>Candida buinensis</i>	Détergents, Applications alimentaires Pharmaceutique	Chi <i>et al.</i> , 2007 ; Tobe <i>et al.</i> , 1976 Kresze, 1991 ; Boiron, 1996 Contrera Gimenes <i>et al.</i> , 2019

Chapitre 2 :

Enzymes protéolytiques

Enzymes protéolytiques

Les enzymes sont les catalyseurs biologiques ; elles assurent le déroulement de toutes les réactions métaboliques de l'être vivant (Pelmont, 1995), telle que les protéases appelées aussi protéinases ou Peptidases (Qureshi *et al.*, 2011). C'est une classe d'enzymes catalysant l'hydrolyse totale des protéines en peptides et en acides aminés en clivant leurs liaisons peptidiques (Sumantha *et al.*, 2006). Elles sont les enzymes les plus importantes utilisées commercialement dans le monde. Les protéases contribuent à plus de 65% du marché mondial des enzymes (Ibrahim *et al.*, 2015).

I. Classification des protéases

Les protéases appartiennent à un groupe très vaste et complexe d'enzymes qui diffèrent par leurs propriétés. Selon le Comité de la nomenclature de l'Union internationale des Biochimie et biologie moléculaire, les protéases sont classées dans le sous-groupe 4 du groupe 3(hydrolases) (Rao *et al.*, 1998 ; Sajo *et al.*, 2014 ; Trehan 2018 ; Mamo et Assefa, 2018 ; Jisha *et al.*, 2013 ; Contrera Gimenes *et al.*, 2019). Les protéases peuvent être classées selon plusieurs critères :

1. Selon la localisation cellulaire

Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur localisation dans la cellule, soit les protéases intracellulaires et extracellulaires (Mathieu, 2005).

1.1. Protéases intracellulaires

Ces protéases jouent un rôle essentiel dans l'élaboration et la régulation des processus cellulaires et métaboliques, ce type de protéases est moins intéressant à l'utilisation industrielle car ces enzymes nécessitent une étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction (Rao *et al.*, 1998).

1.2. Protéases extracellulaires

Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des protéines en petits peptides assimilables par les cellules. Ces enzymes sont plus intéressantes pour utilisation en industrie car elles ne nécessitent pas d'étapes de lyse cellulaire pour en faire l'extraction (Rao *et al.*, 1998).

2. Selon longueur de la chaîne polypeptidique

Il existe deux catégories ; les protéases, qui scindent la molécule protéique en fragments polypeptidiques et les peptidases qui hydrolysent les polypeptides et les transforment en acides aminés libres (Frazier, 1967 ; Colwell et Grigorova, 1989).

3. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (la position ou site du clivage de la liaison peptidique sur les substrats protéiques).

3.1. Exoprotéases

Les exopeptidases n'agissent qu'à proximité des extrémités des chaînes polypeptidiques. En fonction de leur site d'action à l'extrémité N ou C, elles sont classées en amino- et carboxypeptidases (Sajo *et al.*, 2014 ; Trehan, 2018 ; Contrera Gimenes *et al.*, 2019).

3.1.1. Aminopeptidases

Agissent à une extrémité N libre de la chaîne polypeptidique et libèrent un seul amino acide résidu, un dipeptide ou un tri peptide. Ils sont connus pour éliminer l'acide aminé N-terminale méthionine qui peut être trouvée dans les protéines exprimées de manière hétérogène mais pas dans de nombreuses protéines matures naturelles. Les aminopeptidases sont présentes dans une grande variété de microorganisme, y compris les bactéries et les champignons (Sajo *et al.*, 2014 ; Trehan, 2018 ; Contrera Gimenes *et al.*, 2019).

3.1.2. Carboxypeptidases

Agissent aux extrémités C de la chaîne polypeptidique et libèrent un seul aminoacide ou un dipeptide. Les carboxypeptidases peuvent être divisées en trois groupes principaux, sérine carboxypeptidases, métallo carboxypeptidases et cystéine carboxypeptidases selon la nature du résidu d'acide aminé au site actif des enzymes (Rao *et al.*, 1998, B. Sajo *et al.*, 2014, Trehan ,2018, Contrera Gimenes *et al.*, 2019).

3.2. Endopeptidases

Sont caractérisées par leur action préférentielle au niveau des liaisons peptidiques des régions internes de la chaîne polypeptidique éloignées des extrémités N et C. La présence de groupe amino ou carboxyle a une influence négative sur l'activité enzymatique. (Pushpam *et al.*, 2011 ; Sajo *et al.*, 2014, Trehan 2018 ; Contrera Gimenes *et al.*, 2019).

4. Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif

Les endopeptidases sont divisés en quatre sous-groupes selon leur mécanisme catalytique :

4.1. Sérine Protéases (EC 3.4.21)

Elles sont caractérisées par la présence d'un groupe sérine dans leur site actif Ils sont abondants et communs chez les virus, les bactéries et les eucaryotes, indiquant qu'ils sont utiles pour les organismes. Les sérine protéases se trouvent dans les groupes exopeptidase, endopeptidase, oligopeptidase et omégapeptidase (Geethanjali et Subash, 2011 ; Pushpam *et al.*, 2011 ; Sajo *et al.*, 2014 ; Mamo et Assefa, 2018).

4.2. Cystéine/ thiolprotéases. Les protéases à cystéine (EC 3.4.22)

Elles hydrolysent une liaison peptidique qui contient de la tyrosine, de la phénylalanine ou de la leucine du côté carboxyle de la liaison de séparation. Les protéases de type cystéine sont présentes à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes, Sur la base de leur spécificité de chaîne latérale, ils sont globalement divisés en quatre groupes papaïne, trypsine (avec une préférence pour le clivage au niveau du résidu arginine), et spécifiques à l'acide glutamique, et les autres (Pushpam *et al.*, 2011 ; Geethanjali et Subash, 2011 ; Sajo *et al.*, 2014 ; Mamo et Assefa, 2018).

4.3. Protéases aspartiques. Les aspartic proteinases (EC 3.4.23)

Ce sont les endopeptidases qui dépendent des résidus d'acide aspartique pour leur activité catalytique qui sont vitaux pour leur activité catalytique Il est communément connu sous le nom de protéases acides. Ils sont principalement classés en deux groupes : les enzymes de type pepsine et de type rénine (Pushpam *et al.*, 2011 ; Geethanjali et Subash, 2011 ; Sajo *et al.*, 2014 ; Mamo et Assefa, 2018).

4.4. Métalloprotéases (EC 3.4.24)

Sont des types de protéases très diversifiés. Les ions métalliques divalents sont leurs caractéristiques indispensables à l'activité (Pushpam *et al.*, 2011 ; Geethanjali et Subash, 2011 ; Sajo *et al.*, 2014 ; Mamo et Assefa, 2018).

5. Selon le pH optimal de l'activité

5.1. Protéases alcalines

Sont généralement les protéases à sérine, sont utilisées depuis assez longtemps (Pathak et Rathod, 2018). Les protéases alcalines ont généralement des optima de pH compris entre 8 et 12 (Naveed *et al.*, 2021 ; Solanki *et al.*, 2021).

5.2. Protéases acides

Comme leur nom l'indique, les protéases acides ont tendance à montrer leur activité dans la plage de pH acide, principalement le pH optimal étant de 3 à 4 et le point isoélectrique entre 3 et 4,5 et appartiennent au groupe des aspartiques protéases (Machado *et al.*, 2016; Razzaq *et al.*, 2019 ;Solanki *et al.*, 2021).

5.3. Protéases neutres

Les protéases neutres font référence aux enzymes protéolytiques qui montrent leur activité soit à pH neutre, soit à pH légèrement alcalin, soit à pH légèrement acide, avec l'activité maximale dans la plage de pH de 5 à 8 (Razzaq *et al.*, 2019). De nombreuses protéases neutres entrent dans la catégorie des metalloprotéases et ont besoin d'un ion divalent chargé positivement pour leur activité (Solanki *et al.*, 2021).

6. Selon la séquence et des similitudes structurelles MEROPS

Les protéases varient dans leurs plis structuraux et dans la composition des acides aminés catalytiques, toutes les protéases connues sont classées en clans et familles et sont disponibles dans la base de données MEROPS. Elle est une base de données et un schéma de classification hiérarchique et nomenclatures des protéases. Les familles dans MEROPS sont définies comme des groupes de protéines homologues qui partagent une similitude significative dans la séquence d'acides aminés avec l'unité peptidase de l'exemple type de la famille ou une autre protéine précédemment attribuée à la famille. Les familles sont affectées à un clan si les membres représentatifs de la famille ont des plis protéiques clairement similaires. Les membres d'un clan sont supposés partager une origine commune, les membres d'une famille sont divisés en sous-familles (Monttinen *et al.*,2019 ; Contrera Gimenes *et al.*, 2019).

7. Selon leur besoin en ATP

Un autre critère de classement, est lié au besoin ou non d'ATP pour fonctionner (Ganesh *et al.*, 1998), ce groupe de protéases comprend celles composées de plusieurs sous-unités contenant des domaines d'ATPase et des domaines protéolytiques. Il existe des protéases qui ne peuvent être classées dans aucun de ces groupes, (exemple : les signaux peptidases des lipoprotéines) (Mathieu, 2005).

II. Sources de protéases

Étant donné que les protéases sont physiologiquement nécessaires aux organismes vivants, elles sont omniprésentes, se trouvant dans une grande diversité de sources telles que les plantes, les animaux et les micro-organismes (Rao *et al.*, 1998).

1. Protéases animales

Les protéases d'origine animale les plus connues sont la chymotrypsine, la trypsine pancréatique, la pepsine et la rénine. Elles sont préparées sous forme pure en grandes quantités. Cependant, leur production dépend de la disponibilité du bétail pour l'abattage, qui est à son tour régie par les politiques et agricoles (Rao *et al.*, 1998). La chymotrypsine (Mr 23 800) est une protéase digestive à sérine (Lehninger, 1982). Elle est préparée à partir d'extraits pancréatiques d'animaux. La chymotrypsine pure est une enzyme coûteuse, qui n'est utilisée que dans des applications diagnostiques et analytiques. La trypsine (Mr 23 300) est la principale enzyme digestive intestinale responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires (Rao *et al.*, 1998). La pepsine (Mr 34 500) est une protéase acide que l'on trouve dans l'estomac de presque tous les vertébrés (Rao *et al.*, 1998 et Ward, 1985). La pepsine était déjà utilisée dans les détergents à lessive en 1913, mais aujourd'hui remplacée par un mélange de protéases microbiennes à base de sérine et de métal qui semblent moins dégradables par les savons, les conditions alcalines et les températures élevées (Adinarayana et Ellaiah, 2002). La présure est une protéase de type pepsine qui est produite sous forme de précurseur inactif dans l'estomac de tous les mammifères allaitants. Elle est convertie en rénine (Mr 30,7 kDa) active par l'action de la pepsine. Elle est largement utilisée dans l'industrie laitière pour produire un caillé stable et de bonne saveur (Rao *et al.*, 1998). Seules les porcines et les pepsines bovines présentent un intérêt industriel (Scriban, 1993).

2. Protéases végétales

L'utilisation des plantes en tant que source de protéases est régie par plusieurs facteurs tels que la disponibilité de terres pour la culture et l'adéquation des conditions climatiques pour la croissance. De plus, la production de protéases à partir de plantes est un processus qui prend du temps. La papaïne, la bromélaïne, les kératinases et la ficine sont quelques-unes des protéases d'origine végétale les plus connues (Rao *et al.*, 1998). La papaïne et la ficine sont préparées par extraction à l'eau de matières brutes provenant respectivement de *Carica papaya* et de *Ficus carica*. La bromélaïne est préparée à partir de la tige et du jus de l'ananas (Ward, 1985). Les kératinases sont produites par certains groupes botaniques des plantes pour dégrader les cheveux et la laine. Cette digestion est importante pour la production d'acides aminés essentiels tels que la lysine et pour la prévention du colmatage des systèmes de traitement des eaux usées (Rao *et al.*, 1998). La ficine est issue de la figue (*Ficus glabrata*) (Scriban *et al.*, 1993).

3. Protéases microbiennes

Les micro-organismes représentent une excellente source d'enzymes en raison de leur grande diversité biochimique et de leur sensibilité à la manipulation génétique. Les protéases microbiennes sont préférées aux enzymes d'origine végétale et animale car elles possèdent presque toutes les caractéristiques souhaitées pour leurs applications biotechnologiques (Rao *et al.*, 1998). Les protéases microbiennes représentent environ 40 % du total des ventes mondiales d'enzymes (Castro, 2013 et Kumar *et al.*, 1999 et Rao *et al.*, 1998).

3.1. Protéases bactériennes

Les protéases bactériennes, qui sont de nature alcaline, ont une grande importance commerciale dans la lessive, l'alimentation, le cuir et de la soie en raison de leur capacité de production élevée et leur activité catalytique. Les protéases alcalines bactériennes sont caractérisées par leur forte activité à un pH alcalin entre 8 et 12, avec une température optimale comprise entre 50°C et 70°C. Ces propriétés des protéases alcalines bactériennes rendent leur utilisation dans l'industrie des détergents (Jisha *et al.*, 2013). Parmi les bactéries, *Bacillus subtilis* est la souche productrice de la subtilisine ou subtilase. Celle-ci est très stable et résiste bien à l'action des détergents (Calk *et al.*, 2000). Des protéases appartenant à d'autres genres bactériens sont également disponibles sur le marché de la biocatalyse, tels que *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Thermus*, *Oenococcus*, *Chrysobacterium*,

Microbacterium (Adesh *et al.*, 2002 ; Anisha *et al.*, 2008 ; Mahajan et Badgujar, 2010; Ameen., 2013).

3.2. Protéases fongiques

Les champignons élaborent une plus large variété d'enzymes que les bactéries. Les protéases fongiques sont actives dans une large gamme de pH et présentent une grande spécificité du substrat. Elles sont particulièrement utiles dans l'industrie fromagère en raison de leurs spécificités étroites de pH et de température (Rao *et al.*, 1998). Elles offrent l'avantage de séparer le mycélium par simple filtration et peuvent être facilement produites par un processus de fermentation à l'état solide (Jisha *et al.*, 2013).

3.2.1. Protéases des moisissures

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

3.2.2. Protéases des levures

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

III. Production de protéase

Actuellement, pour la production de protéases microbiennes en utilisant la fermentation à l'état solide (FMS) et la fermentation submergée (FML) (Contesini *et al.*, 2018 ; Razzaq *et al.*, 2019 ; dos Santos Aguilar et Sato 2018). Mais en général les protéases sont produites par fermentation submergée (FML), qui représente près de 90% de la production de toutes les enzymes industrielles (Hölker *et al.*, 2004). Afin d'atteindre une production maximale d'enzymes, chaque souche microbienne a ses propres exigences nutritionnelles et physicochimiques. Il n'existe donc pas de condition de culture et de milieu définis (Kasana *et al.*, 2011 ; Contrera Gimenes *et al.*, 2019). Il existe plusieurs microorganismes producteurs d'enzymes proteolytique, mais l'attention se limite à ceux qui ont des rendements significatifs et des propriétés appropriées, donc les meilleures conditions pour la croissance des microorganismes ne se traduisent pas nécessairement par une bonne production (Kasana *et al.*, 2011).

La physiologie du milieu solide est la principale différence entre la production d'enzymes par FMS et FML, c'est-à-dire que les enzymes qui ne sont pas sécrétées dans le milieu dans la FMS (les enzymes intracellulaires), peuvent être sécrétées dans la FML (les enzymes extracellulaires). Par conséquent, les différences moléculaires dans l'expression des gènes biosynthétiques ont un impact direct sur la productivité des enzymes, ce qui peut entraîner la production et la sécrétion de protéases différentes (Barrios-González, 2012). De nombreuses sources de substrats ont été étudiées afin de trouver les conditions optimales pour la production des enzymes protéolytiques. Un bon rendement est obtenu lorsque les sources souhaitées d'hydrates de carbone, de protéines et de minéraux nécessaires à la croissance des micro-organismes et à la production de protéases sont présentes (Mukhtar et Haq., 2013), Par exemple on peut utiliser les déchets de tomates comme une source de carbone ou une source d'azote pour la production de protéase par *Aspergillus oryzae* (boukhalfa-lezzar, 2015).

1. Fermentation en milieu liquide (FML)

La plus part des protéases sont produites par fermentation submergée (FML), qui représente près de 90% de la production de toute les enzymes industrielles (Hölker *et al.*, 2004). Dans la FML, la croissance microbienne a lieu dans un milieu liquide avec une grande disponibilité d'eau libre et convient mieux aux bactéries. Cette technique présente des avantages tels que la facilité de contrôle des variables physico-chimiques, une bonne

distribution des composants du milieu et la récupération d'enzymes extracellulaires. Donc, les enzymes produites sont diluées et peuvent être moins stables. En général, la production de protéase microbienne par FML utilise différents substrats tels que le fructose, le sucrose, le lactose, l'extrait de levure, peptone et des sous-produits industriels complexes, à savoir : la mélasse, l'eucalyptus et liqueur de maïs (Contrera Gimenes *et al.*, 2019 ; Contesini *et al.*, 2018 ; Anandharaj *et al.*, 2016).

2. Fermentation en milieu solide (FMS)

La fermentation à l'état solide (FMS) est un processus de fermentation qui implique une matrice solide et se déroule en l'absence ou la quasi-absence d'eau libre. Donc, le substrat doit posséder une humidité suffisante pour soutenir la croissance et le métabolisme du micro-organisme. La matrice solide peut être soit la source de nutriments ou un support imprégné par les nutriments appropriés qui permet le développement des micro-organismes (Pandey, 2003).

L'habitat naturel des microorganismes ressemble à la FMS et constitue donc un choix privilégié pour la croissance et la production de microorganismes pour se développer et produire des produits utiles à valeur ajoutée (Hölker *et al.*, 2004). Cependant la FMS est plus adaptée aux champignons en raison de leur proximité de leur habitat naturel et de leur milieu, et de leur besoin d'une humidité moindre que celle des bactéries (Singhania *et al.*, 2009).

- **Avantages de la fermentation solide**

La FMS présente plusieurs avantages mais aussi quelques inconvénients. Parmi les avantages, on peut citer : une productivité de fermentation plus élevée, la stabilité des produits, une plus faible répression catabolique, la culture de micro-organismes spécialisés dans les substrats insolubles dans l'eau ou la culture mixte de divers champignons, et, enfin et surtout, une moindre demande de stérilité en raison de la faible activité de l'eau utilisée en FMS (Hölker *et al.*, 2004).

Le système FMS présente des inconvénients tels que : une difficulté pour contrôler la fermentation, un échauffement éventuel, une énergie importante exigée pour les systèmes avec mélangeur, un inoculum sporogène important, un risque de contamination bactérienne et des difficultés de passer à des volumes très grands (Larpen-Gourgand et Sanglier, 1992).

IV. Méthodes d'optimisation

Le processus d'optimisation a une grande importance pour la production industrielle des enzymes et surtout dans le cas d'une surproduction, les manipulations des milieux représentent la meilleure alternative aux manipulations génétiques (Reddy *et al.*, 2008). Différents types de plans d'expériences sont utilisés en biologie et particulièrement dans le domaine des biotechnologies, ils permettent l'optimisation de la production d'enzymes microbiennes. Ces méthodes permettent de faire varier plusieurs facteurs à la fois, de manière à étudier leurs effets sur les paramètres à étudier (Cochran et Cox, 1992). L'objectif des plans d'expériences est de choisir au mieux les expériences à réaliser pour découvrir les règles d'évolution d'une grandeur d'intérêt en fonction de variables opératoires. Ces règles se traduisent le plus souvent par une formule mathématique ou par des consignes d'utilisation. Les formules trouvées sont essentiellement pratiques c'est-à-dire qu'elles donnent une représentation mathématique approchée du phénomène dans une région limitée de l'espace expérimental (Goupy, 1990).

1. OFAT (One Factor at a Time)

L'OFAT est une technique de résolution de problèmes qui permet d'identifier les causes critiques d'un effet à partir d'un ensemble de causes potentielles. L'approche adoptée consiste à modifier un seul facteur, et en gardant tout le reste constant (tous les autres facteurs). Le test d'hypothèse est le moyen le plus couramment utilisé pour l'OFAT (Web 2). Cette technique est longue et coûteuse. De plus, lorsqu'un grand nombre de variables est considéré, elle n'a pas la capacité de détecter l'optimum réel et ne prend pas en compte les interactions entre les facteurs (Hajji *et al.*, 2008 ; Kammoun *et al.*, 2008).

2. Plan de Plackett et Burman (1946)

Plackett R.L. et Burman J.P. ont publié leur étude en 1946 dans la revue *Biometrika*. Ils expliquent comment construire des plans pour étudier un grand nombre de facteurs en peu d'essais. Ils attribuent deux niveaux à chaque facteur et supposent que toutes les interactions entre facteurs sont négligeables devant les effets principaux. Ce plan est présenté sous forme de matrices carrées orthogonales contenant uniquement des +1 et des -1. Ce sont des matrices d'Hadamard. Ils indiquent toutes les matrices (N, N) à partir de N = 8 et jusqu'à N = 100 qu'il est possible de construire. Il n'avait pas encore trouvé la construction de la matrice (96, 96) au moment de leur publication (Goupy, 1990).

3. Plan de Box et Wilson

Le plan d'expérience de Box-Wilson (plans composites centrés) couplé à la surface de réponse est le plus utilisé. Les plans composites centrés comprennent un plan factoriel ou un plan factoriel fractionnaire avec des points centraux, auxquels s'ajoute un groupe de points axiaux (ou étoiles) qui permettent d'estimer la courbure (Web 3), Ce plan permet de modéliser des facteurs quantitatifs.

- $(n, [nc, \alpha])$: renvoie une matrice d'expériences Box-Wilson de facteur n (également appelée CCD, Center Composite Design). Les arguments facultatifs nc et α peuvent être ajoutés pour spécifier le nombre de points centraux et la valeur de la distance entre le point axial réel et le centre de l'expérience. Cette fonction est limitée aux plans avec $2 \leq n \leq 9$.

- n est un entier qui spécifie le nombre de facteurs.

- nc (facultatif) est un entier qui spécifie le nombre de points centraux. Le nombre de points centraux par défaut est $nc = 4 \cdot \sqrt{nf + 1} - 2n$, où nf est le nombre d'exécutions pour la partie factorielle et l'expérience Box-Wilson.

- α (facultatif) est un nombre réel qui spécifie la distance entre le point axial réel et le centre de l'expérience. La valeur par défaut pour α est $nf^{1/4}$, où nf est le nombre d'exécutions pour la partie factorielle et l'expérience Box-Wilson. Pour respecter la capacité de rotation, $\alpha > 1$. (Web 4).

V. Applications des protéases

Les protéases ont été considérées comme l'un des groupes d'enzymes les plus essentiels dans l'industrie des enzymes et ont diverses applications dans différentes industries (Mamo et Assefa ,2018).

1. Application dans l'industrie laitière

La principale application des protéases acides est la production de fromage dans l'industrie laitière. Le rôle majeur des protéases acides dans la production de fromage est d'hydrolyser la liaison peptidique spécifique pour générer de la para-Kcaséine et des macropeptides donc la coagulation du lait (Mamo et Assefa ,2018).

2. Application dans l'industrie de la boulangerie.

La farine de blé est un composant majeur des processus de boulangerie. Il comprend une protéine insoluble appelée « gluten » qui régule la propriété de la pâte. Des endo et exoprotéinases ont été appliquées pour améliorer le gluten de blé par protéolyse limitée. De plus, les protéases aspartiques fongiques ont également été largement utilisées dans la production d'assaisonnements alimentaires et l'amélioration d'aliments riches en protéines tels que le pain et les denrées alimentaires apparentées (Mamo et Assefa ,2018).

3. Application dans l'industrie de la bière

Lors de la fabrication de la bière, les protéines et les polyphénols extraits du tissu végétal peuvent interagir et former un trouble La formation de trouble est un problème majeur dans la production de bière, car elle affecte les qualités du produit final. Il s'agit notamment de l'hydrolyse des protéines indésirables lors de la finition de l'opération pour obtenir une bonne qualité de la bière (Mamo et Assefa ,2018).

4. Application dans l'industrie du vin

Le maintien de la stabilité du vin avant la mise en bouteille est une étape difficile et cruciale dans le processus de vinification. Le vin trouble avec précipité se forme à la suite d'une instabilité thermique des protéines. L'enzyme protéase acide convient à la dégradation du complexe de turbidité produit à partir des protéines dans le vin. Aussi il a été démontré que les vins traités avec l'enzyme protéase avaient une teneur en acides aminés plus élevée que les vins non traités, Ces résultats ont indiqué que le traitement à la protéase pouvait augmenter la concentration d'azote assimilable, qui était l'un des nutriments importants pour la levure dans la fermentation du vin (Mamo et Assefa ,2018).

5. Fabrication de produits à base de soja

Le soja est riche source de nourriture, en raison de leur teneur élevée en protéines de bonne qualité. Les protéases sont utilisées depuis l'Antiquité pour préparer sauce soja et autres produits à base de soja. Les protéases d'origine fongique jouent un rôle important dans la transformation de la sauce de soja. Modification protéolytique des protéines de soja contribue à améliorer leurs propriétés fonctionnelles (Rao *et al.*, 1998).

6. Synthèse de l'aspartame

L'utilisation de l'aspartame comme édulcorant artificiel non calorique a été approuvée par le Food and Gestion des médicaments. L'aspartame est un dipeptide composé de l'acide L-aspartique et l'ester méthylique de la L-phénylalanine. La configuration des deux acides aminés est responsable du goût sucré de l'aspartame (Rao *et al.*, 1998).

7. Industrie du cuir : Tannage

Le traitement conventionnel du cuir implique des opérations unitaires consécutives (trempage, chaulage, épilation, détartrage...etc.) où des produits chimiques nocifs sont utilisés (chaux, solvants, sulfure de sodium et sels d'ammonium). Le sulfure de sodium qui crée des problèmes de pollution agit sur la tige du cheveu en dehors de la peau, réduisant la liaison SS et augmentant la solubilisation des protéines. Les protéases est une alternative écologique pour remplacer l'utilisation du sulfure de sodium pour épiler et tanner le cuir (Troncoso *et al.*, 2022 ;Contesini *et al.*, 2017 ;Jisha *et al.*, 2013 ; Banerjee et Kumar Ray, 2017).

8. Médecine esthétique et produits de beauté

L'application des protéases pour la médecine cosmétique et la préparation de produits de beauté repose sur l'obtention de composés bioactifs dotés de propriétés fonctionnelles (des biopeptides, des hydrolysats antioxydants). Le collagène hydrolysé est incorporé dans les produits régénérants cutanés pour prévenir le sèche et les dommages cutanés. D'autre part, les protéases sont principalement utilisées pour favoriser l'exfoliation cutanée, et augmenter l'absorption d'eau et d'autres ingrédients cosmétiques, traiter les ulcères cutanés et cicatriser les brûlures (Troncoso *et al.*, 2022).

9. Applications pharmaceutiques et médicales

Les applications médicales utilisant des enzymes sont en développement continu pour traiter des maladies ou des troubles humains avec des méthodes non invasives, La papaïne est utilisée pour le traitement des œdèmes, du gluten intolérance, hypochlorhydrie, troubles digestifs et infections, La ficine est utilisée comme agent hémostatique (Troncoso *et al.*, 2022). Les protéases sont efficaces dans le traitement de diverses maladies comme la tumeur, l'inflammation, le cancer, etc. l'activité catalytique, les protéases sont considérées comme des

agents importants dans plusieurs voies biochimiques et fonctions physiologiques telles que la signalisation cellulaire, l'apoptose, la migration cellulaire, l'adhésion cellulaire et les métastases (Banerjee et Kumar Ray, 2017). La grande diversité et la spécificité des protéases sont utilisées avec grand avantage dans le développement d'agents thérapeutiques efficaces (Jabalia *et al.*, 2014).

10. Industrie des détergents

Les détergents utilisent des enzymes, telles que des protéases pour éliminer les taches sur les tissus qui sont autrement difficiles à enlever avec le commun détergent. Ces taches comprennent des protéines, des pigments (Contesini *et al.*, 2017). Les protéases sont l'un des ingrédients standard de toutes sortes de détergents allant de ceux utilisés pour la lessive domestique aux réactifs utilisés pour nettoyer les lentilles de contact ou les prothèses dentaires (Jabalia *et al.*, 2014).

11. Synthèse d'hydrolysats de protéines (Peptides bioactifs)

De nombreuses protéines peuvent être hydrolysées de manière limitée, ce qui entraîne les peptides, aussi appelés hydrolysats de protéines aux activités biologiques remarquables, comme antihypertenseur à partir de protéines précurseurs par hydrolyse enzymatique par des enzymes protéolytiques (Contesini *et al.*, 2017).

12. Récupération d'argent

Il existe plusieurs méthodes chimiques pour la récupération de l'argent, mais elles ne sont pas respectueuses de l'environnement. Des protéases alcalines sont utilisées à cette fin particulière, qui dégrade activement la couche de gélatine du film et libèrent l'argent lié (Jisha *et al.*, 2013 ; Banerjee et Kumar Ray, 2017 ; Jabalia *et al.*, 2014).

13. Traitement des déchets

Dalev, en 1994, a rapporté un procédé enzymatique utilisant une protéase alcaline de *B. subtilis* dans le traitement des déchets de plumes des abattoirs de volailles. Les plumes représentent environ 5 % du poids corporel des volailles et peuvent être considérées comme une source élevée de protéines pour l'alimentation humaine et animale, à condition que leur structure rigide de kératine soit complètement détruite. Un prétraitement avec du NaOH, une désintégration mécanique et une hydrolyse enzymatique ont entraîné une solubilisation totale

des plumes Le produit final était une poudre lourde et grisâtre avec une teneur très élevée en protéines qui pouvait être utilisée comme additif alimentaire (Jisha *et al.*, 2013). En raison de caractéristiques particulières, des kératinases ont été largement utilisées comme agents nématocides, pour la production de biocarburants et pour la production d'engrais à partir de déchets de volaille la production de peptides, le recyclage des déchets, les industries de transformation des déchets. Traitement de l'eau (Banerjee et Kumar Ray, 2017).

14. Industrie chimique

Les protéases jouent un rôle majeur dans l'industrie chimique de synthèse sous forme de biocatalyseur. Cependant, un inconvénient majeur de cette application est la réduction de l'activité enzymatique dans des conditions anhydres. Plusieurs chercheurs ont rapporté la catalyse de la synthèse peptidique en solvant organique par des protéases alcalines (Banerjee et Kumar Ray, 2017).

15. Industrie de la laine

Les fibres de laine sont recouvertes d'écaillés qui se chevauchent et pointent vers la pointe de la fibre. Une méthode réussie impliquait l'hydrolyse partielle des pointes d'écaillés avec la protéase, la papaine (Jabalia *et al.*, 2014).

*Matériel et
méthodes*

Matériel et méthodes

Le travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Génie Enzymatique et Application (GEA). Il porte sur l'optimisation de la production de la protéases de la levure *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T et l'étude de ses caractéristiques à savoir l'effet de la température et du pH sur l'activité protéolytique.

I. Matériel biologique

1. Souche levurienne

La levure utilisée pour la production de la protéase est la souche *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T isolée à partir des pelures de pomme de terre. Elle est conservée dans la mycothèque du laboratoire de Génie Enzymatique et Application GEA.

2. Repiquage de la souche

Le repiquage des colonies est effectué sur un nouveau milieu de culture nutritive YPGA (**annexe1**)ensemencé par la méthode de stries dans des boîtes pétries (Figure 4) à l'aide d'une pipette pasteur sous les conditions d'asepsie. Les boîtes sont incubées pendant 48 heures à 30°C dans une étuve. Elles sont utilisées pour l'inoculation des différents milieux destinés à la fermentation.



Figure 4 : Culture après ensemencement par la méthode des stries.

3. Préparation de l'inoculum

50 ml du milieu YPGA sont coulés en erlens meyers de 250 ml et ensemencés ensuite avec *Clavispora lusitaniae* ABS7. Après une incubation de 48h à 30°C, une quantité d'eau distillée stérile (ou d'eau physiologique)est ajoutée et les cellules sont homogénéisées par agitation manuelle. En récupère la solution mère de levure pour effectue le dénombrement et l'ensemencement des milieux. La solution mère est l'inoculum qui correspond à la suspension cellulaire de la levure, elle est conservée au réfrigérateur.

4. Dénombrement des cellules

L'estimation du nombre de cellules de la suspension cellulaire est effectuée par comptage direct à l'aide d'une cellule de Thomas (0.1mm, 1/400mm²) et au grossissement (x40). On dépose, entre la cellule et lamelle, une goutte de la suspension de levure par la pipette pasteur, puis on fait le comptage des cellules levuriennes dans le quadrillage (Figure 5). Le comptage permet de déterminer le nombre de cellules totales par unité de volume de milieu de culture. La relation suivante permet d'exprimer la concentration en cellules totales en nombre de cellules par ml :

$$\text{Nombre cellules totale /ml} = \frac{\text{Nombre de cellules totales} \times \text{dilution} \cdot 10^3}{\text{Nombre de carreaux} \times 0,00025}$$

NB : Pour les éléments chevauchent les lignes, comptez tous ceux qui chevauchent les lignes à gauches et en haut. Ne comptez aucun élément qui chevauche les lignes à droite et en bas.

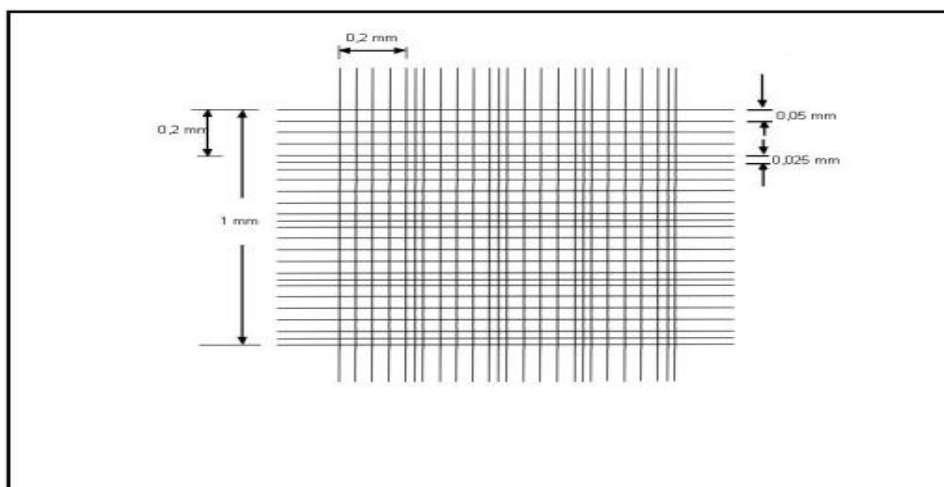


Figure 5 : Quadrillage de cellule de thomas.

II.Substrat de fermentation

Ce travail est une contribution sur l'étude du potentiel de production de protéases sur un milieu solide pour cela, les milieux à base des déchets de tomates et les restes du pain ont été choisis, car ces substrats sont riches en nutriments nécessaires pour le développement des levures et aussi pour la production d'enzymes.

Les déchets de tomates essorés et les restes du pain récupérés sont séchés à l'air libre (25 – 30°C) pendant 3 - 4 jours. Ils sont broyés à l'aide d'un moulin électrique ménager puis tamisés de manière à avoir un substrat sous forme de farine.

III.Optimisation protéolytique

La production de protéase est influencée par divers paramètres de production, notamment des paramètres nutritionnels et environnementaux. Pour cela, la composition du milieu de culture est optimisée par les méthodes statistiques à savoir le plan d'expériences composite central (CCD) de Box et Wilson (1951). Le CCD permet de déterminer les optima des paramètres sélectionnés précédemment.

- **Plan composite centré de Box et Wilson (CCD : Central Composite Design)**

Ce plan est un outil expérimental efficace permettant l'identification des facteurs effectifs, l'étude de leurs interactions et la sélection des conditions optimales d'un système multi variable. Le plan composite centré de Box et Wilson (1951) a été sélectionné pour optimiser les valeurs des trois facteurs significatifs à savoir l'humidité, le temps d'incubation et l'inoculum. (Tableau 3) Chaque facteur du plan est étudié à cinq niveaux (tableau 2).

Tableau 2 : Relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan centré de Box et Wilson.

Facteurs	Niveau				
	-1,168	-1	0	+1	+1,168
C₁ : Humidité (%)	63,18	70	80	90	96,82
C₂ : Inoculum (cellules/ml)	$2,08 \times 10^2$	10^3	10^4	10^5	$0,5 \times 10^6$
C₃ : Temps d'incubation(h)	31,62	48	72	96	112

Tableau 3 : Matrice expérimentale du plan composite pour l'étude de trois facteurs.

Essai	C₁	C₂	C₃
1	1,682	0	0
2	0	0	0
3	0	0	1,682
4	1	1	-1
5	1	-1	1
6	0	0	0
7	1	-1	-1
8	0	0	0
9	-1	-1	1
10	-1	-1	-1
11	0	0	1
12	-1	1	0
13	0	0	0
14	0	-1,682	0
15	0	1,682	0
16	-1,682	0	-1
17	-1	1	0
18	0	0	-1
19	1	1	1
20	0	0	-1,682

IV.Milieu de fermentation

Afin de déterminer les optima des 3 paramètres pour la production de la protéase, les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant un mélange de 5g des deux substrats des déchets (50% reste du pain et 50% déchets de tomates), suivi par l'ajout d'un volume de tampon selon le taux d'humidité désiré suivant le plan statistique. Le contenu de chaque erlenmeyer doit être bien mélangé à l'aide d'une tige. Les Erlenmeyers sont ensuite bouchés avec du coton cardé (figure 6 : A), recouverts de papier aluminium et stérilisés à l'autoclave.

Après stérilisation et refroidissement, les erlenmeyers sont inoculés avec des taux d'ensemencement déterminés selon le plan statistique et le contenu de chaque erlenmeyer doit être bien mélangé à l'aide d'une tige stérile. Les erlenmeyers sont incubés à 30°C dans une étuve (figure 6 : B) pendant un temps d'incubation selon le plan statistique. Toutes les expériences sont réalisées en duplicate.



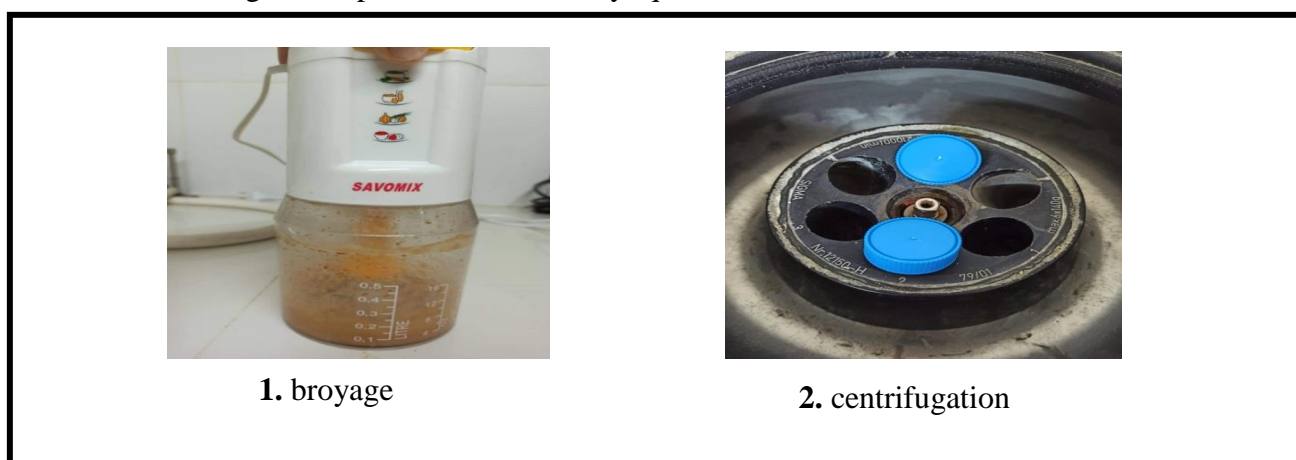
A : Milieu de culture de FMS

B : incubation dans une étuve à 30°C

Figure 6 : Fermentation en milieu solide.

V.Extraction enzymatique

Après fermentation, une quantité connue (2,5 g) de substrat fermenté est mélangée avec 25 ml de solution de Tween 80 (0,02%). Le mélange est mixé pendant 5 minutes (figure 7 :1) et la solution est par la suite centrifugée à 10000 rpm à 4°C pendant 10 minutes (figure 7 :2). Ensuite le surnageant est récupéré et filtré à travers un papier filtre (Whatman n° 1), pour éliminer les particules du substrat, Le filtrat obtenu constitue l'extrait enzymatique brut ; il est conservé au congélateur pour les études analytiques ultérieures.



1. broyage

2. centrifugation

Figure 7 : Extraction enzymatique

VI. Méthodes analytiques

1. Détermination de la matière sèche

La matière sèche des déchets est déterminée par séchage d'un échantillon de 2,5 g introduit dans des boîtes de pétrie en verre pesées préalablement et séchées à 70°C jusqu'au poids constant. La matière sèche est exprimée en % (**annexe 1**).

2. Détermination des protéines (Lowry et al., 1951)

Le principe du dosage des protéines est fondé sur la résultante de deux réactions :

- La première est la réaction de Biuret pour augmenter la sensibilité de détection, où la présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin entraîne la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et la liaison peptidique dans la protéine.
- La deuxième est la réaction au réactif de *Folin-Ciocalteu* qui réagit sur les acides aminés aromatiques la tyrosine et le tryptophane présentes dans les protéines et se réduit en un complexe d'une coloration bleu-violette proportionnelle à la quantité d'acides aminés présents dans le milieu et qui peut être détectée entre 650 et 750 nm.

Après dosage, le taux de protéines est calculé par référence à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution standard de *Bovin Serum Albumin* (BSA) à 500µg/ml. Chaque dosage est effectué en double (**Annexe 2**).

3. Dosage de l'activité protéolytique (ANSON 1938)

L'activité protéolytique est déterminée à partir de l'effet de protéases sur la caséine. Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par la protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés dans la phase soluble. Les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA (solution d'acide trichloracétique). Cette quantité de tyrosine libérée, peut être mesurée directement par colorimétrie. La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines, que l'on utilise comme standard de dosage colorimétrique de l'activité protéasique à l'aide du réactif de *Folin-Ciocalteu*. Celui-ci réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu, donc La mesure de l'activité enzymatique consiste à une mesure directe de l'absorbance lue à 750 nm (**Annexe 2**). La densité optique ainsi déterminée peut être convertie en concentration de tyrosine libérée, à l'aide d'une courbe d'étalonnage de concentration en tyrosine. La courbe d'étalonnage est

préparée à partir de solutions dont les concentrations en tyrosine varient entre 0 et 100 µg/ml. Pour la préparation de ces solutions, la tyrosine est diluée dans la solution de TCA. Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1 µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme (**Annexe 1**). L'activité protéolytique est rapportée aussi à la quantité de matière sèche initiale (Ms).

VII. Analyse statistique

Les données résultantes des différents essais de la production protéase sont soumises à une analyse de la variance (ANOVA). Afin d'évaluer les effets entre les 3 différents facteurs étudiés. Le traitement statistique de la matrice est réalisé par le logiciel Minitab 17.

Concernant le plan composite centré, les dérivés permettant de déterminer les coordonnées des valeurs codées qui sont ensuite transformées en valeurs réelles (les optima).

VIII. Essais en conditions optimales

La souche *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T a été cultivée en erlenmeyers de 250 ml en conditions optimales :

- ✓ Humidité : 80% (tampon citrate-sodium, pH=5).
- ✓ Inoculum : $2,08 \times 10^2$ cellule/ml sachant que le nombre des cellules par 1 ml dans la suspension cellulaire est 7220×10^6 cellule/ml.
- ✓ Le temps d'incubation : 72h.

La fermentation est réalisée afin de de confirmer le maximum prédit de la production proteasique.

IX. Etude des caractéristiques de la protéase produite

L'extrait brut de la protéase de *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T est utilisé pour déterminer quelques caractéristiques de l'enzyme : pH optimal, température optimale, et effet des quelques effecteurs (activateurs / inhibiteurs) :

1. Détermination du pH optimal

L'influence de différents pH sur l'activité enzymatique est étudié par l'utilisation des

solutions tampons suivant :

- Citrate-sodium (0,1M/0,2M) de pH 3 à 9 (**Annexe 3**).
- Glycine - NaOH (0,1 M) de pH 8 à 12 (**Annexe 3**).

2. Détermination de la température optimale

L'étude de l'effet de la température sur l'activité de la protéase est étudiée en incubant le mélange réactionnel à différentes températures (30, 40, 50, 60, 70, 80°C) pendant 1 h à pH optimal. L'optimum est déterminé en traçant la courbe de l'activité protéolytique en fonction de la température.

3. Effet de différents métaux et réactifs chimiques sur l'activité protéasique

Pour l'étude de l'effet des ions sur l'activité protéasique, on utilise des sels tels que le CuSO_4 (5mM), BaCl_2 (5mM), FeSO_4 (5mM), Na_2SO_3 (5mM), KCl (150mM), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,75mM), MnSO_4 (5mM), ZnSO_4 (0,75mM), MgSO_4 (5mM), NaCl (150mM) et CaCl_2 (7,5mM). Les échantillons sont incubés avec chaque ion métallique séparément à 60°C pendant 10 min, puis l'activité enzymatique est mesurée. D'autre part, différentes substances chimiques (détergents) comme l'Éthylène Diamine Tetra Acétate(EDTA) (5mM), l'urée (5mM), le SDS (5mM), le β -marcaptoéthanol (1%) et le tween 80(1%) Tween 20(1%) sont testés sur l'activité enzymatique. Après une pré-incubation de l'enzyme avec chaque réactif à 60°C pendant 10min, les activités résiduelles de la protéase sont comparées avec celle du contrôle incubé dans les mêmes conditions sans effecteurs.

*Résultats et
discussion*

Résultats et discussion

I. Production de protéase

La production de la protéase de la souche *Clavispora lusitaniae* CBS6936 T en FMS a été réalisée sur un milieu constitué d'un mélange des deux substrats : les restes du pain et les déchets de tomate (50% reste du pain et 50% déchets de tomate) et le dosage enzymatique est effectué à pH = 5.

- **Optimisation des conditions de culture par les méthodes statistiques (plan de Box et Wilson)**

La production de la protéase par la souche *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T a été étudiée par le plan composite centré de Box et Wilson (CCD : central composite design). Les résultats des expériences de l'optimisation sont présentés dans le tableau 4.

L'activité enzymatique varie de 8205, 8 U/min à 11676, 4 U/min (Tableau 4). La plus faible activité est obtenue par l'essai n°11 où le milieu estensemencé avec 10^4 cellules /ml, humidifié de 80 % avec le tampon citrate-sodium de pH=5 et incubé pendant 96h dans l'étuve à 30°C. Par contre, l'activité la plus importante est enregistrée dans l'essai n°4 où le milieu de production contient 90% de l'humidité, 10^5 cellules/ml de l'inoculum et incubé pendant 48h.

Tableau 4 : Activités enzymatiques selon le plan de Box et Wilson.

Essai	C ₁	C ₂	C ₃	AE (U/min)	AE _{MS} (u /g)	P (mg)	AS AE /P(U/mg)
1	1,682	0	0	8764,7	4812,6	2,28	3844,16
2	0	0	0	9470,5	4009,6	3,02	3135,92
3	0	0	1,682	9352,9	3978,6	3,28	2851,49
4	1	1	-1	11676,4	5503,6	3,02	3866,35
5	1	-1	1	10500	5530,9	2,89	3633,21
6	0	0	0	10352,9	5370,9	3,28	3156,37
7	1	-1	-1	9352,9	4419,3	2,69	3476,91
8	0	0	0	9735,2	4868,6	2,89	3368,58
9	-1	-1	1	11500	5199,9	2,93	3924,91
10	-1	-1	-1	9205,8	3841,5	3,28	2806,64
11	0	0	1	8205,8	4049,5	2,66	3084,88
12	-1	1	0	10647,1	4439,2	3,44	3095,08
13	0	0	0	8647,1	4179,7	3,18	2719,21
14	0	-1,682	0	8617,6	4136,7	3,28	2627,31
15	0	1,682	0	9323,5	4695,6	2,89	3226,12
16	-1,682	0	-1	8529,4	3411,8	3,85	2215,42
17	-1	1	0	11558,8	5826,1	3,05	3789,77
18	0	0	-1	8294,1	3855,6	3,05	2719,37
19	1	1	1	8323,5	4562,3	3,15	2642,38
20	0	0	-1,682	8529,4	3978,3	3,44	2479,47

C₁ : Humidité. C₂ : Inoculum Temps. C₃ : d'incubation. AE : Activité enzymatique.
 AE_{MS} : Activité par rapport matière sèche. AS : Activité spécifique. P : Protéines totales.

II. Analyse statistique

Les résultats des expériences de l'optimisation sont présentés dans le tableau 4 et sont analysés en utilisant le logiciel Minitab 17. La signification de chaque coefficient est déterminée par les valeurs de t et les valeurs de p correspondantes (Tableau 5).

* $P < 0,05$: le résultat est significatif, donc les facteurs ou l'interaction entre les facteurs a un effet sur la production d'enzyme.

* $P > 0,05$: le résultat est non significatif, donc le facteur ne présente pas un effet important sur la production de protéase ($C_1 * C_2$ la valeur de p est 0,102).

La valeur élevée de t et la valeur faible de p indiquent la signification élevée du coefficient correspondant. Nous remarquons que l'effet des facteurs : humidité (C_1), Inoculum (C_2) et le temps d'incubation (C_3), leurs effets quadratiques ont influencé positivement la production protéasique de *Clavospora lusitaniae*. L'effet des interactions entre C_1 et C_3 et aussi entre C_2 et C_3 est hautement significatif sur la production de la protéase ($p = 0.000$).

L'équation de régression suivante :

$$C_4 = 4071 - 522,7C_1 - 370,0C_2 + 376,2C_3 + 525,5C_1 * C_1 + 305,7C_2 * C_2 + 410,2C_3 * C_3 + 97C_1 * C_2 - 645C_1 * C_3 - 849C_2 * C_3$$

C_4 : l'activité de protéase. C_1 : Humidité. C_2 : Inoculum. C_3 : Temps d'incubation.

L'analyse statistique indique un coefficient de détermination de $R^2 = 0,9336$, cela signifie que 93,36% de la variation de la production de protéase peuvent être expliquées par les trois variables étudiées. Selon Vimal *et al.*, 2015, le coefficient de détermination est une mesure globale pour la qualité du modèle. Le R^2 ajusté = 87,39% indique un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites pour la production d'enzyme.

Tableau 5 : Résultats de l'analyse pour l'optimisation de l'activité de protéase.

Terme	Coeff	Coef ErT	Valeur de T	Valeur de p	FIV
Constante	4071	111	36,75	0,000	
C1	-879	143	-6,16	0,000	1,60
C2	-622	130	-4,79	0,001	1,31
C3	633	125	5,06	0,000	1,32
C1*C1	1487	216	6,90	0,000	1,39
C2*C2	865	193	4,48	0,001	1,11
C3*C3	1160	197	5,88	0,000	1,13
C1*C2	557	310	1,80	0,102	1,52
C1*C3	-1826	324	-5,64	0,000	1,85
C2 *C3	-2401	312	-7,69	0,000	1,15

Cette analyse est confirmée par la valeur du test de Fisher de 15,63 et la valeur de **P** du modèle de 0.000. Ceci indique aussi que le modèle est accepté et que les variables inclus dans ce modèle ont un effet important sur la production de la protéase (tableau 6).

$C_1 * C_3$, la valeur de p est 0,000 : l'interaction entre l'humidité (C_1) et le temps d'incubation (C_3) a un effet sur la production de protéase. Pour l'interaction entre $C_2 * C_3$, la valeur de p est 0,000 : l'interaction entre l'inoculum (C_2) et le temps d'incubation (C_3) a un effet sur la production de protéase. Par contre pour $C_1 * C_2$, la valeur de p est 0,102 cela signifie que cette interaction n'a aucun effet sur la production de protéase (tableau 6).

Tableau 6 : Analyse de la variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Modèle	9	8622974	958108	15,63	0,000
Linéaires	3	3182887	1060962	17,31	0,000
C1	1	2327098	2327098	37,97	0,000
C2	1	1405395	1405395	22,93	0,001
C3	1	1572320	1572320	25,65	0,000
Carré	3	5015202	1671734	27,27	0,000
C1*C1	1	2917711	2917711	47,60	0,000
C2*C2	1	1231940	1231940	20,10	0,001
C3*C3	1	2120054	2120054	34,59	0,000
Interaction à 2 facteurs	3	4794378	1598126	26,07	0,000
C1*C2	1	198161	198161	3,23	0,102
C1*C3	1	1952109	1952109	31,85	0,000
C2*C3	1	3620186	3620186	59,06	0,000
Erreur	10	612938	61294		
Inadéquation de l'ajustement	6	507137	84523	3,20	0,140
Erreur pure	4	105801	26450		
Total	19	9235912			

III. Graphiques de Pareto

Le diagramme de Pareto (Figure 8) permet de représenter graphiquement les résultats de l'analyse du plan pour la production de protéase et illustre l'ordre de signification des variables. Où il apparaît clairement que les paramètres, humidité (C₁), l'inoculum (C₂), le temps d'incubation (C₃) sont significatifs sur la production protéasique ainsi que leurs interactions mutuelles C₂×C₃ (la plus significatif) et C₁×C₃ (significatif), tous les facteurs ou les interactions qui dépassent 2.228, sont significatifs. D'après la charte Pareto obtenue, on remarque que l'effet de l'interaction C₁×C₂ n'est pas significatif sur la production de la protéase car inférieure à 2.228.

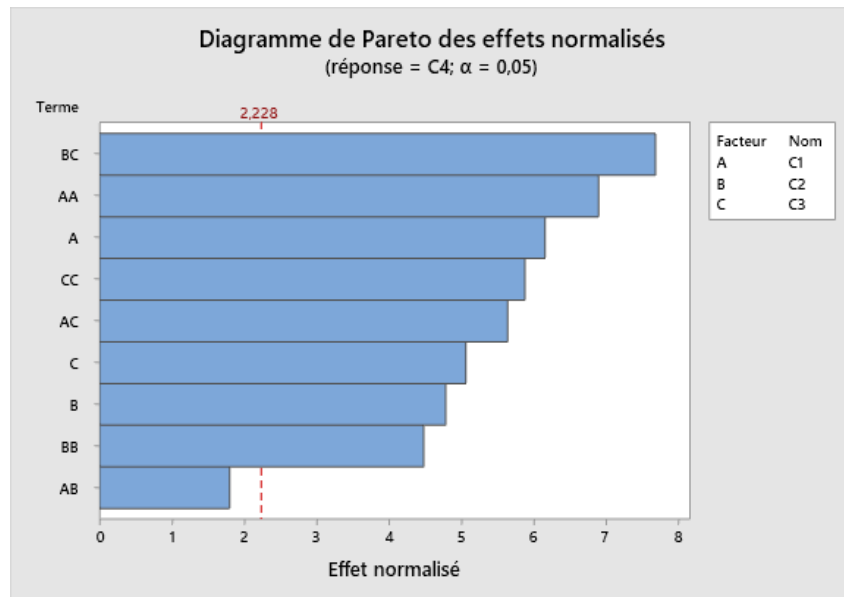


Figure 8 : Charte Pareto des effets standardisés des paramètres opératoires sur l’activité de protéase.

IV. Détermination des interactions entre les variables

Les tracés d’iso-réponses de la production de protéase sont obtenus par le modèle polynomial de second degré. Ces graphiques permettent d’illustrer les effets linéaires, quadratiques et interactifs sur chaque variable. En effet, elles sont utilisées pour prédire les valeurs optimales pour les différentes variables du test, afin d’obtenir la réponse maximale de la production de la protéase.

1. Interactions entre C₂ (l’inoculum) et C₃ (le temps d’incubation)

Les interactions entre les deux variables C₂ (l’inoculum) et C₃ (le temps d’incubation) et leurs effets sur la production de protéase sont représentées par le graphique de contour. La zone en vert foncé de la figure 9 représente l’intervalle entre les valeurs en C₃ (le temps d’incubation) et C₂ (inoculum) où on retrouve la zone d’activité protéolytique la plus importante >9000. Ce qui indique une production élevée de la protéase. Dans cet intervalle se situe les hauts niveaux des facteurs (valeurs supérieurs à 1.5). Puisque la probabilité de l’interaction entre les facteurs C₂ et C₃ est inférieure à 0.05 (p = 0.000), l’effet est positivement significatif.

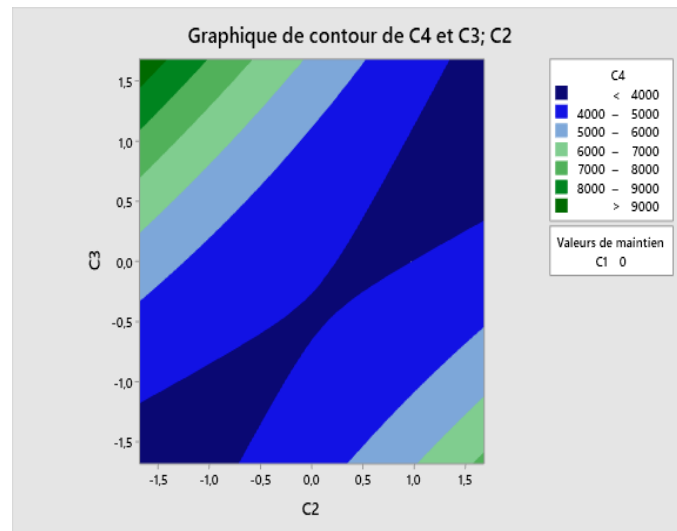


Figure 9 : Graphique de contour de l’interaction entre C₂ (inoculum) et C₃ (temps d’incubation).

2. Interactions entre C₃(le temps d’incubation) et C₁ (humidité)

Les interactions entre les deux variables C₁ (humidité) et C₃ (le temps d’incubation) et leurs effets sur la production de protéase sont représentées par le graphique de contour. La zone en vert foncé de figure 10 représente l’intervalle entre les valeurs de C₃ (le temps d’incubation) et de C₁ (humidité) où l’on retrouve la zone d’activité protéolytique la plus importante >10000. Ce qui indique une production élevée de la protéase. La probabilité de l’interaction entre les facteurs C₃ et C₁ est inférieure à 0.05 (p = 0.000), on conclut, donc que l’effet est aussi positivement significatif.

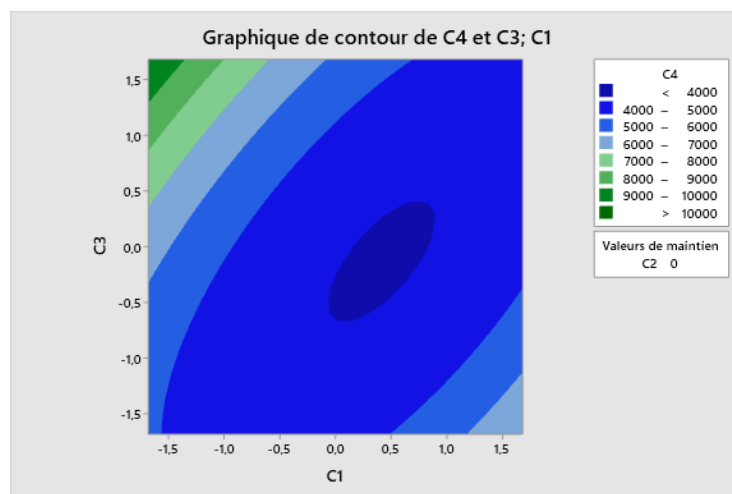


Figure 10 : Graphique de contour de l’interaction de C₁ (humidité) et C₃ (temps d’incubation).

3. Interactions entre C₁ (humidité) et C₂ (l'inoculum)

Les interactions entre les deux variables C₁ (humidité) et C₂ (l'inoculum) sont montrées par le graphique de contour. La zone en vert foncé de figure 11 représente l'intervalle entre les valeurs de C₁ (humidité) et de C₂ (l'inoculum) où l'on retrouve la zone d'activité protéolytique la plus importante >8000. Ce qui indique une production élevée de protéase dont cet intervalle se situe les niveaux élevés des facteurs. Il n'y a pas d'effet significatif de l'interaction entre les facteurs C₁ et C₂ car la probabilité est supérieure à 0.05 (p = 0.102).

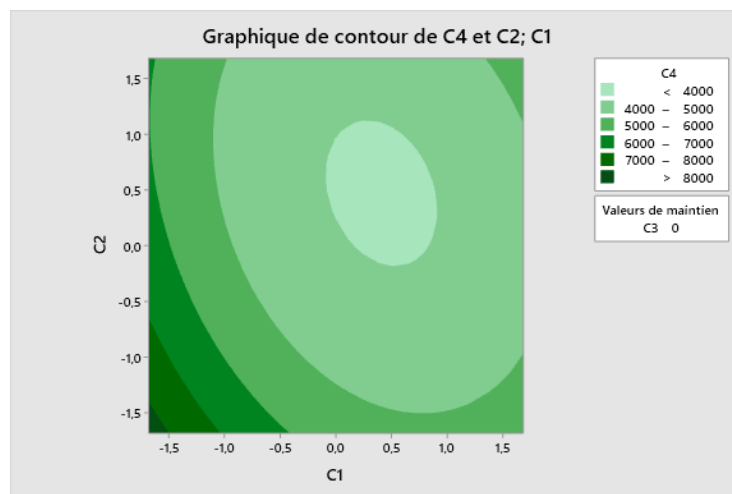


Figure 11 : Graphique de contour de l'interaction entre C₁ (humidité) et C₂ (inoculum).

V. Détermination des optima

La méthodologie de surface de réponse « **RSM** », a permis de déterminer les valeurs optimales des trois variables retenues pour une meilleure activité protéasique. L'optimisation de la production de protéase nécessite soit l'évaluation de l'influence de chaque paramètre sur l'activité étudiée d'une part et les effets des interactions par paire de facteurs d'autre part. La réalisation par la méthodologie de surface de réponse a permis de déterminer les optima des facteurs étudiés à savoir : l'humidité à 80%, l'inoculum de $2,08 \times 10^2$ cellule/ ml et le temps d'incubation de 72 h.

Le plan composite centré de Box et Wilson couplé à la méthode des surfaces de réponse (RSM) ont permis de déterminer les optima des facteurs étudiés (inoculum, humidité et temps d'incubation) (Figure 12).

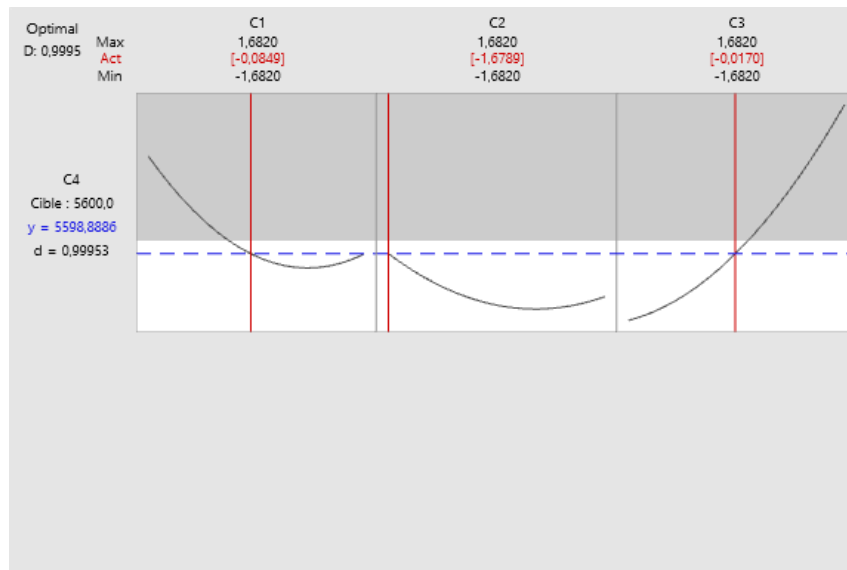


Figure 12 : Valeurs optimales des variables et de la réponse déterminées par « RSM » pour une meilleure activité protéolytique.

Les résultats obtenus montrent que les paramètres de culture sélectionnés l'humidité le temps d'incubation et l'inoculum jouent un rôle important dans la production des protéases par la souche *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T.

1. Humidité

L'humidité joue un rôle important dans la biosynthèse et la sécrétion de nombreux types d'enzymes, en particulier la protéase. Il est connu que la teneur en eau d'un milieu a une profonde influence sur la production de produits par les micro-organismes. Dans la fermentation à l'état solide, la teneur en eau du substrat est fortement influencée par la capacité d'absorption et les forces capillaires du substrat, la température de croissance, la quantité de chaleur métabolique générée, la quantité de dégagement d'humidité et les besoins de croissance des organismes. Une augmentation de la teneur en humidité entraîne une diminution de la porosité du substrat, limitant ainsi le transfert d'oxygène, diminuant ainsi les échanges gazeux. Tandis qu'une teneur en humidité plus faible entraîne une réduction de la solubilité des nutriments du substrat, un degré de gonflement plus faible ce qui diminue également la production d'enzymes. Par conséquent, un niveau optimal d'humidité est nécessaire pour une productivité maximale des enzymes (Migliani Sharma *et al.*,2017).

Nos résultats montrent que l'humidité a un effet significative ($p = 0.000$) pour l'activité d'enzymatique, dans notre étude la valeur optimale de l'humidité pour la production de

protéase est de 80 %. Nos résultats corroborent ceux de Balachandran *et al.*, (2021) qui a trouvé que l'optima de l'humidité est de 80 % pour la production de protéase (401,18 U/ml) par la souche *B. halodurans*. Chez l'isolat ZIBL1 d'*Aspergillus*, la production maximale de protéase acide de 87,4 U/ml a été obtenue à 50 % d'humidité (Usman *et al.*, 2021).

Dans l'étude de Kuan Ooi *et al.*, (2021), il a été trouvé que 60% était la teneur minimale en humidité chez *Aspergillus niger* cultivé en FMS en utilisant les déchets de crevettes comme substrat, la production de protéase obtenue est de 3,7 U/mg.

Talhi *et al.*, (2022) ont montré que la production maximale de la protéase de 1187,03 a été obtenue par la souche *Mycothermus thermophilus MK770356* en FMS sur le son de blé humidifié à 47%.

2. Inoculum

D'après nos résultats, l'inoculum a un effet significative ($p = 0.001$) sur l'activité protéasique chez la souche levurienne *Clavispora lusitaniae CBS 6936 T.* avec un taux de $2,08 \times 10^2$ cellule/ ml, alors que chez le champignon thermophile *Mycothermus thermophilus strain MK770356* l'inoculum de 5×10^5 spores/g semble être meilleur (Talhi *et al.*, 2022). Une autre recherche sur la protéase de la souche de *B. licheniformis NK* isolé de la source chaude de Nakhl, à Oman a montré que l'inoculum de 4,86 % est recommandé pour une production maximale de protéase (68,56 U/m) en utilisant les déchets intestinaux de *S. longiceps* comme substrat à faible coût (Ramkumar *et al.*, 2018).

L'étude statistique a été aussi utilisée pour améliorer la production de la protéase. L'activité maximale a été obtenue en présence de 1,0 cellule/ ml d'*Aspergillus niger* en utilisant des déchets de crevettes comme substrat (Kuan Ooi *et al.*, 2021). La production maximale de protéase acide chez la souche d'*Aspergillus l'isolat ZIBL1* a été obtenue avec 1 ml d'inoculum de $3,2 \times 10^6$ spores/ml en utilisant un milieu de fermentation contenant du son de blé comme substrat solide (Usman *et al.*, 2021).

3. Temps d'incubation

La durée de fermentation est également un paramètre qui doit être optimisé afin d'atteindre la production maximale d'enzyme, Généralement, le temps nécessaire de la production optimale de protéases par des bactéries ou des champignons peut atteindre 48 h à 9

jours (Miglani Sharma *et al.*, 2017). La valeur de p obtenu pour le temps d'incubation est de (0,000) hautement significative sachant que le temps d'incubation optimum est de 72 h.

Plusieurs études sur plusieurs souches en étaient déjà faites pour optimiser le temps d'incubation ; en notant que chez *A. oryzae* MTCC 5341, le temps de fermentation de 123 h avec une activité maximale de 8,93 9 105 U/g pour la production de protéase acide extracellulaire en FMS a été signalé par fermentation solide (Vishwanatha *et al.*, 2009). La protéase de la souche de *Bacillus. Licheniformis* NK isolé de la source chaude de Nakhl, à Oman a révélé que le temps d'incubation de 71,11 h est le meilleur pour une production maximale de protéase (68,56 U/m) en présence de déchets intestinaux de *S. longiceps* comme substrat (Ramkumar *et al.*, 2018).

La bactérie *Bacillus thuringiensis.*, isolée de l'intestin du poisson d'eau douce *Systemus sarana fsh*, est un producteur efficace de protéase (245 U/ml) dans les conditions optimisées à 32 h d'incubation (Dhayalan *et al.*, 2022), alors que Usman *et al.*, (2021) ont montré que la protéase acide chez l'isolat fongique *ZIBLI* atteint son maximum de production de protéase acide après une incubation de 120 h.

VI. Validation expérimentale du modèle

La culture de la souche *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T, en conditions optimales (Humidité : 80 %, inoculum $2,08 \times 10^2$ cellule/ ml, temps d'incubation : 72h) a permis l'obtention d'une activité protéasique maximale de 7264, 70 U.

VII. Etude des caractéristiques physico-chimiques de la protéase

1. Effet du pH sur l'activité de la protéase

La figure 12 montre l'effet du pH sur l'activité protéolytique, cette étude est faite dans une gamme de pH de 3 à 12. On remarque une augmentation de l'activité protéolytique avec l'augmentation de pH jusqu'à une meilleure activité de 6276,47UI à pH 4 désignant le pH optimal de la protéase étudiée. Au-delà de ce pH, une diminution de l'activité protéolytique est observée (figure 13).

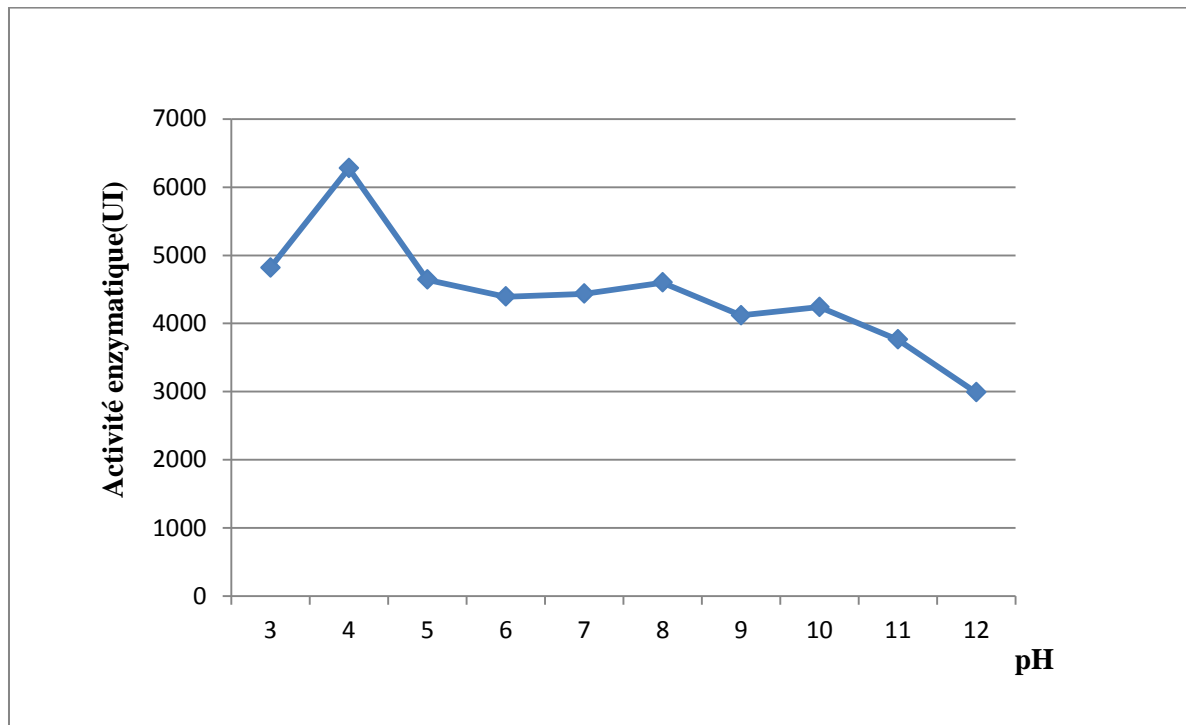


Figure 13 : Effet du pH sur l'activité de protéase.

Chaque enzyme possède un pH optimal pour sa stabilité, dans notre travail la protéase de *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T donne une bonne stabilité et activité à pH acide par rapport aux pH neutre et pH alcalin. La protéase hydrolyse bien le substrat dans les conditions favorables permettant à la protéase de catalyser la rupture des liaisons peptidiques des protéines (Silva, 2017). L'activité de protéase produite par *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T a montré un pH optimal de 4, même résultat a été rapporté par Lario *et al.*, (2015) pour *Rhodotorula mucilaginosa* L7 et pour *Metschnikovia pulcherrima* et *Wickerhamomyces anomalus* (Schlander *et al.*, 2017). Les bactéries comme *Bacillus subtilis* SCK6 produisent de la protéase (Xiaoguang *et al.*, 2021) et d'autres levures produisent de la protéase alcaline (Bessadok *et al.*, 2017).

2. Effet de la température sur l'activité de la protéase

L'effet de la variation de la température sur l'activité protéolytique a été étudié dans une gamme de température de 30°C à 80°C et à pH optimum de 4. Le profil de l'activité de l'enzyme en fonction de la température obtenu présente un aspect un peu large (figure 14). Nous constatons que l'activité protéolytique augmente avec la température jusqu'à 40°C où elle atteint son maximum de 6617,64UI puis elle diminue jusqu'à 2423,52UI à 80°C.

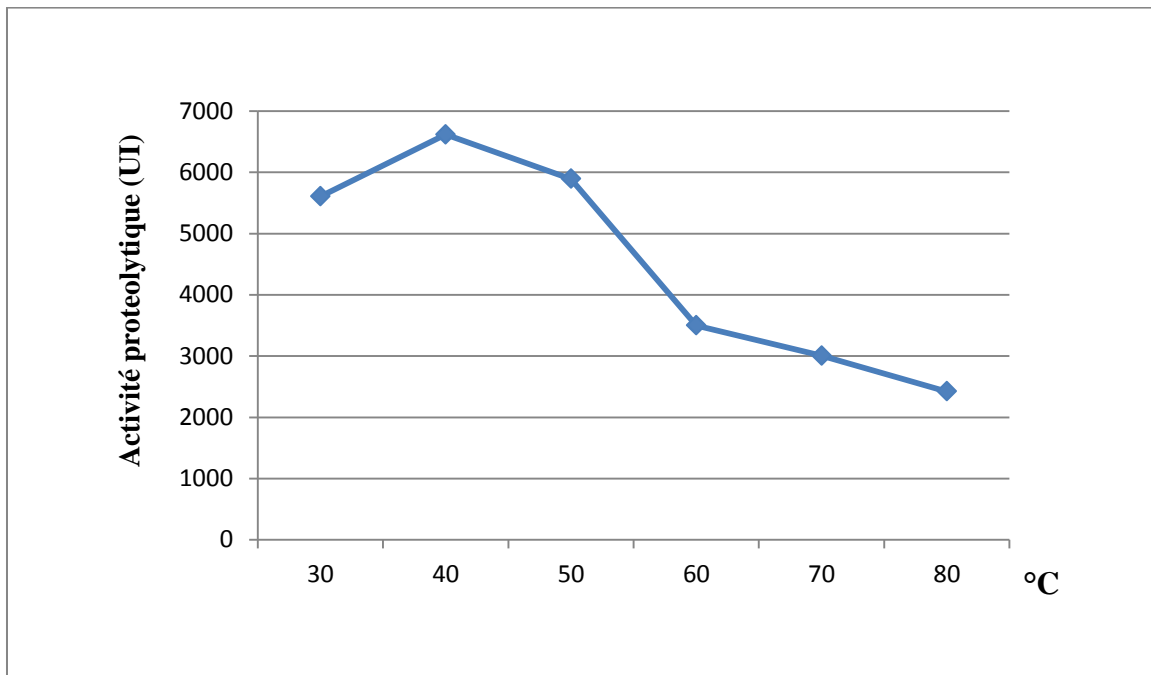


Figure 14 : Effet de température sur l'activité protéolytique.

La température est un facteur important dans la catalyse des transformations chimiques. En effet, elle augmente l'agitation des molécules et accroît la possibilité de contact entre les molécules. Dans le cas de réaction enzymatique, la température accélère la fréquence de collision entre le substrat et l'enzyme. Au-delà d'une certaine température, la protéine enzymatique va subir des modifications de sa structure tridimensionnelle, ce qui entraîne progressivement la perte de son activité (Boukhalifa, 2015).

Xiaoguang *et al.*, (2021) ont trouvé que la sérine protéase de *Bacillus subtilis SCK6* a révélé l'activité optimale à 65 °C. Des études sur la caractérisation de la protéase produites par la souche *Geobacillus SBS-4S*, ont révélé que la température optimale de cette enzyme était de 60°C (Ahmad *et al.*, 2020) Une autre recherche sur la protéase de la souche de *B. licheniformis NK* isolé de la source chaude de Nakhl, à Oman montré qu' à température 46,31 °C pour une production maximale de protéase (68,56 U/ml) (Ramkumar *et al.*, 2018).

La protéase brute de *Aspergillus reticulatus* a montré une activité maximale à 40–50°C (Chung *et al.*, 2022).

3. Effet des sels et des détergents sur l'activité de protéase

3.1.Effet des sels sur l'activité de la protéase

D'après la figure 15, il ressort que $ZnSO_4$ n'as pas d'effet sur l'activité protéolytique, alors que $BaCl_2$ et $CaCl_2$ ont un faible inhibition sur l'activité protéolytique de la souche *Clavispora lusitaniae CBS 6936 T*, et les autres sels étudiés($CuSO_4$, $FeSO_4$, Na_2SO_3 , KCl , $(NH_4)_2SO_4$, $MnSO_4$ et $MgSO_4$, $NaCl$,) ont un effet inhibiteur sur l'activité protéasique sachant que ($MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_3) ont une forte inhibition car ils ont éliminées 50% de l'activité enzymatique (tableau 7). L'effet inhibiteur de tous les sels étudiés est dû à la concentration utilisée qui a probablement dépassé le seuil critique pour l'activité enzymatique.

Tableau7 : Activités enzymatiques résiduelles après traitement par les sels.

Sels	Activité résiduelle(%)
$CuSO_4$	68,72
$BaCl_2$	90,52
$FeSO_4$	63,98
Na_2SO_3	53,55
KCl	64,92
$(NH_4)_2SO_4$	55,45
$MnSO_4$	62,08
$ZnSO_4$	99,05
$MgSO_4$	50,71
$NaCl$	74,40
$CaCl_2$	87,67

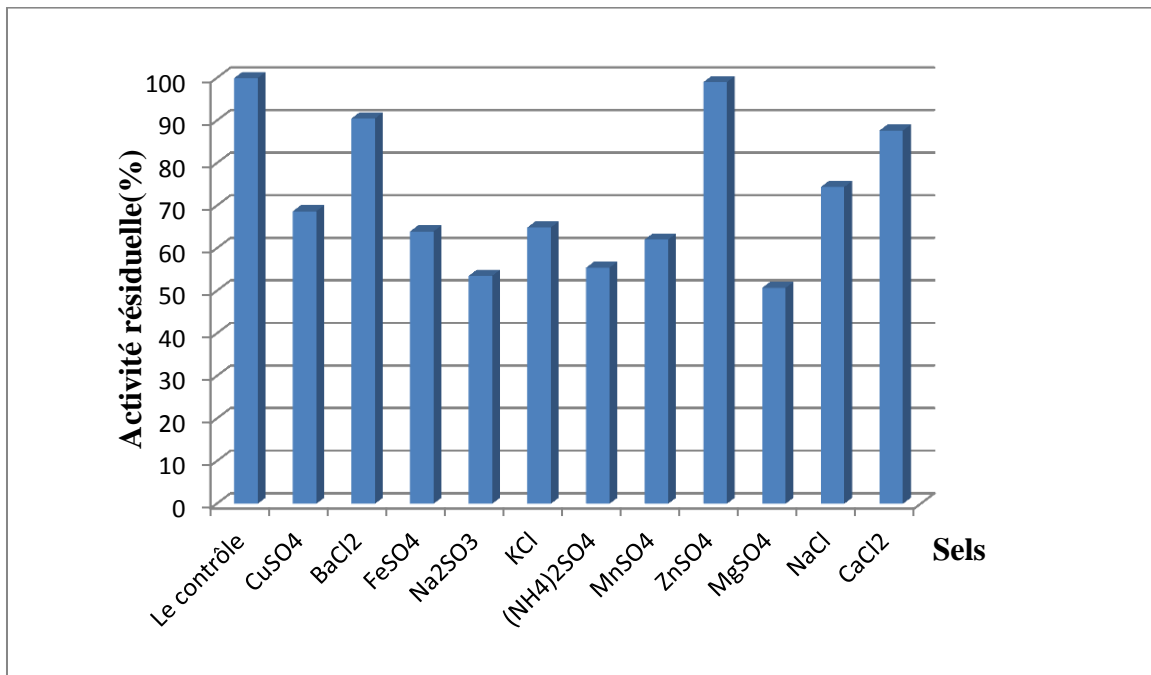


Figure 15 : Effets des sels sur l'activité protéolytique.

Dans notre étude, le $BaCl_2$ a un faible effet inhibiteur sur l'activité protéolytique par contre Mota de Oliveira *et al.*, (2020) ont rapporté que l'incubation en présence de $BaCl_2$ améliore l'activité enzymatique.

De plus, il a été suggéré que la souche fongique *SKI-1* produit une sérine protéase alcaline extracellulaire dont l'activité reste relativement élevée sur une large gamme de concentrations de $NaCl$ (Chung *et al.*, 2022).

Selon Chunling *et al.*, (2007), l'enzyme est activée par Cu^{2+} (à une concentration de 1,0 mM) et Mn^{2+} et inhibée par Fe^{2+} , Zn^{2+} . Xiaoguang *et al.*, 2021 ont démontré que la protéase a présenté une activité et une stabilité excellentes en présence de Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} .

Un effet inhibiteur plus fort sur la protéase de la souche thermophile de *Bacillus sp SMIA-2* a été observé en présence de K^+ , Cu^{2+} qui entraîné la perte complète d'activité à des concentrations de 1 mM. .au contraire L'activité a été stimulée par Mn^{2+} et Ca^{2+} , indiquant que ces ions avaient un rôle fonctionnel dans la structure moléculaire de l'enzyme (Do Nascimento et Martins *et al.*, 2003).

3.2.Effet des détergents sur l'activité de la protéase

Les résultats de l'effet des détergents (SDS, EDTA, Tween 80, Tween 20 et Urée et β -marcaptoéthanol) sur l'activité de la protéase sont montrés dans la figure 16.

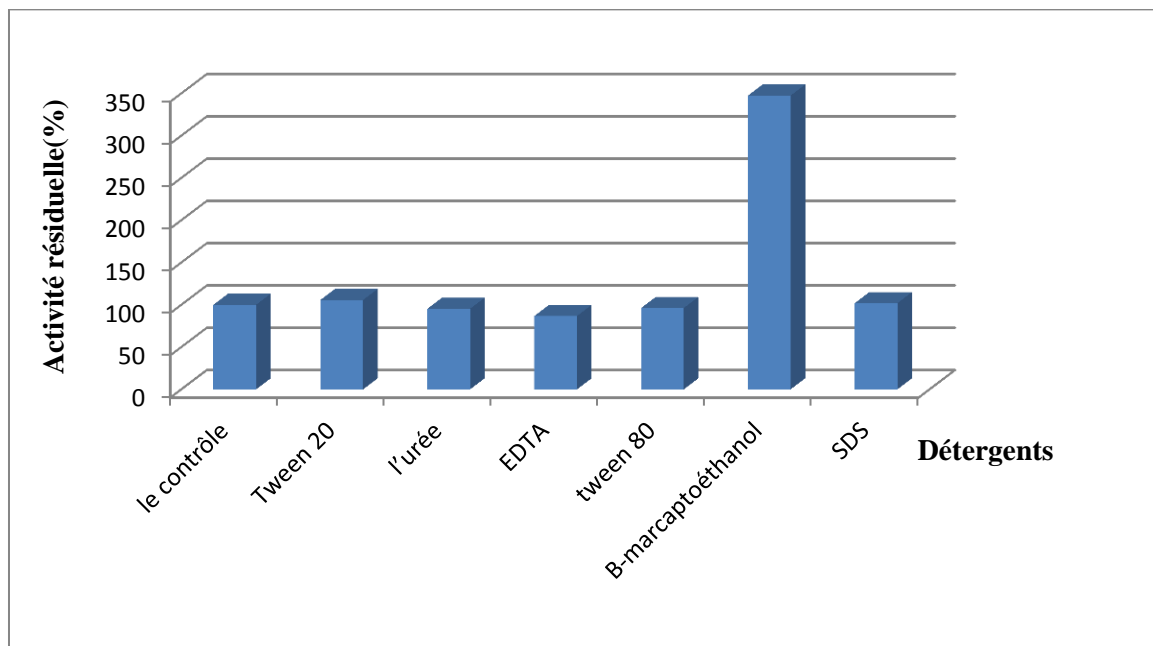


Figure16 : Effet des détergents sur l'activité protéolytique.

Parmi les détergents étudiés, le β -marcaptoéthanol a un effet activateur très significatif sur l'activité protéasique (347,39%), le tween 20 (105,68%) et SDS (101,89%) n'ont aucun effet sur la protéase alors que l'urée, EDTA et le tween 80 ont un effet inhibiteur avec des activités résiduelles de 95,26%, 86,72%, 96,20% respectivement (tableau 8).

Tableau 8 : Activités enzymatiques résiduelles après traitement par les détergents

Détergents	Activité résiduelle(%)
Tween 20	105,68
l'urée	95,26
EDTA	86,72
tween 80	96 ,20
β -marcaptoéthanol	347,39
SDS	101,89

Selon Ahmad *et al.*, (2020), l'activité protéasique a été légèrement réduite (92%) en présence de SDS, tandis que la présence de détergents non ioniques (Tween-20 et Tween-80) a réduit l'activité enzymatique, 82 à 82 69 % respectivement, par contre ont n'a trouvé dans notre étude que le Tween-20 et la SDS ont un effet activateur sur la protéase.

D'après les résultats de Jin-Beom *et al.*, (2018), l'EDTA a presque inhibé l'activité de la protéase de *B. subtilis FBL-1* en tant que chélateur de métaux.

Ramkumar *et al.*, (2018) a trouvé que la protéase a conservé une activité de 93, 103, 90 et 98 % contre l'urée, le β -marcaptoéthanol, le SDS et le tween 80 respectivement. La protéase alcaline était compatible avec tous les détergents commerciaux testés avec une activité résiduelle supérieure à 90 %.

Conclusion

générale

Le but de cette étude est la production de la protéase par la levure *Clavispora lusitaniae* cultivée par fermentation en milieu solide (FMS) par l'utilisation des déchets et des sous-produits comme les restes du pain et les déchets de tomates.

En industrie, il serait intéressant d'améliorer (optimiser) la production d'enzymes microbiennes. Pour cela, nous avons utilisé un plan de Box-Wilson basé sur les composites centrés (CCD) combiné à la méthodologie de la surface de réponse (RSM) pour l'étude de l'effet de 3 facteurs ; temps d'incubation, humidité, inoculum.

L'analyse statistique des résultats a révélé que les valeurs optimales des trois facteurs qui ayant un effet significatif sur la production de l'enzyme (Humidité : 80 %, inoculum $2,08 \times 10^2$ cellule/ml, temps d'incubation : 72h).

Dans la deuxième partie, nous avons étudié les caractéristiques physico-chimiques de la protéase de *Clavispora lusitaniae*. L'effet de la température et du pH sur la production protéasique a été étudié. Et il a été trouvé que le pH optimum et la température optimale de la protéase sont de 4 et de 40°C respectivement. Des informations sur le site actif de l'enzyme sont obtenues après l'étude de l'action des effecteurs sur l'activité protéolytique ; Celle-ci montre que $ZnSO_4$ n'as pas d'effet sur l'activité protéolytique, $BaCl_2$ et $CaCl_2$ ont un faible inhibition sur l'activité protéolytique, et ($CuSO_4$, $FeSO_4$, Na_2SO_3 , KCl , $(NH_4)_2SO_4$, $MnSO_4$ et $MgSO_4$, $NaCl$,) ont un effet inhibiteur sur l'activité protéasique sachant que ($MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_3) ont une forte inhibition . Tandis que l'étude de l'effet des détergents montre que la protéase a été amélioré par le SDS et le Tween 20 et fortement activé par le β -marcaptoéthanol (347,39%), alors que l'éthylène Diamine Tetra Acétate (EDTA), l'urée et le tween 80 inhibe l'activité enzymatique.

Ce mémoire présente la mise au point d'un procédé en FMS pour la production d'une enzyme ayant un intérêt technologique. Ces résultats mettent en relief l'intérêt de recycler les déchets industriels de tomates et les restes de pain par FMS pour la production d'une protéase levurienne acide et à moindre coût.

Enfin, ces résultats exigent d'autres études et ouvrent de nouvelles perspectives :

- il sera intéressant d'étudier la cinétique de la croissance de la levure et de la production de la protéase.
- Etudier la cinétique de la production de la protéase de *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T.
- Purification totale et utilisation de différents types de chromatographies (gel filtration, échangeuse d'ions, HPLC...), l'électrophorèse.
- Réaliser des essais d'application industrielle de l'enzyme.

*Références
bibliographiques*

-A-

Addis. E, Fleet. G. H, Cox J. M, Kolak. D et Leung. T. 2001. The growth properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of camembert and blueveined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69: 25-36.

Adesh.K, Archana.S, Balasubramanyam, Lata. S.A.K.2002 . Optimization of conditions for production of neutral and alkaline protease from species of *Bacillus* and *Pseudomonas* . *International Journal of Food Microbiology*. 42: 233-6.

Adewara. A.O. et Ogunbanwo .S.T. 2013. Effects of processing variables on the production of “*Burukutu*”. A Nigerian fermented beverage. *Natural Sciences*.11:16-28.

Adinarayana. K et Ellaiah. P.2002. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus sp.* *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5, 272- 278.

Ahearn. D.G.1973. Estuarine Microbial Ecology: The Belle W. *In. Marine Science* 1, p: 433-440. University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina.

Ahmad.W, Tayyab.M,Aftab.M.N, Hashmi.A.S, Ahmad. M.D, Firyal. S, Wasim.M, Awan. A.R.2020. Optimization of Conditions for the Higher Level Production of Protease: Characterization of Protease from *Geobacillus SBS-4S* Waste and Biomass Valorization .Springer Nature.

AMFEP.2013.List of enzymes.Association of manufacturers and formulators of enzyme products.

Anaisie.E.J, Ginnis.M.C, Pfaller.M. 2003. Clinical mycology. Churchill Livingstone, Philadelphia.

Anandharaj .M, Sivasankari .B, Siddharthan .N, Rani. R.P, Sivakumar. S. 2016 .Production, purification et caractérisation biochimique de la métallo-protéase thermostable du nouveau *Bacillus alkalitelluris TWI3* isolé des déchets de tannerie. *Applied Biochemistry and Biotechnolgy* 178(8): 1666–1686.

Anisha .G.S, Rojan. P.J, Nicemol. J, Niladevi .K.N, Prema. P.2008. Production and characterization of partially purified thermostable α -galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus* for food industrial applications. Food Chemistry 111: 631–635.

Anonyme. 2007. Développement des biocarburants et formulation des politiques agricoles futures en Afrique de l’Ouest et du Centre. Lettre de politique agricole de la CMA/AOC (LEPAC) - N°4.

-B-

Balachandran.C, Vishali .A, Nagendran .A. N,Baskar.K , Hashem .A, Elsayed Fathi .A.2021.Optimization of protease production from *Bacillus halodurans* under solid state fermentation using agrowastes .Saudi Journal of Biological Sciences, Elsevier,319-562, 4(69).

Banerjee. G et Kumar Ray .A. 2017. Impact of microbial proteases on biotechnological industries, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews: 2046-5556, 56.

Barrios-González. J. 2012. Fermentation à l’état solide : physiologie du milieu solide, sa base moléculaire et ses applications. Processus of Biochemistry. (Oxford, Royaume-Uni), 47(2), 175–185.

Basmaji. M.F. 2005. Caractérisation de la protéine Knr4 et recherche de ses partenaires fonctionnels pour la compréhension de son rôle dans la synthèse pariétale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.

Bessadok .M et Sadok .B. 2017.Characterization of the Crude Alkaline Extracellular Protease of *Yarrowia lipolytica YITun15*. Journal of fisheries and Sciences, 11(4): 019-024.

Binetti .A,Carrasco. M, Reinheimer .J et Suarez .V. 2013.Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. Journal of Applied Microbiology, 115:434-444.

Blin. C.P. 2002. Etude comparative du catabolisme de l’acide ricin oléique chez les levures du genre *Sporidiobolus* : mise en évidence et caractérisation du système béta-oxydase impliqué. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l’Alimentation. Université de Bourgogne, France.

Références bibliographiques

Blom. J, Mattos. M.J.T.D et Grivell. L.A. 2000. Redirection of the RespiroFermentative Flux Distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by over expression of the Transcription Factor Hap4p. Applied and Environmental Microbiology PP : 1970 -1973,24(1).

Boiron. P. 1996. Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P : 13-35-69-79.

Bonaly .R.1991.Morphologie et reproduction asexuée des levures DS : Larpent .J.P., Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p : 4-18,7(3).

Botton. B, Breton .A, Fevre. M, Gauthier. S, Guy. P. H, Larpent. J.P, Reymond. P, Sanglier J.J, Vayssier Y and Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle.2^{ème} édition. Masson. Collection Biothechnologies. P : 34 -381,18(4).

Botton. B. 1991. La physiologie des levures Ds : Larpent J.P., Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. P : 97-127,9(2).

Bouix .M et Leveau J.Y. 1991. Les levures Ds : Bourgeois C.M., Leveau J.Y., Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Technique & Document, Paris. 3, p : 206-229.

Bouix.M et Leveau.J.Y.1999. Production des enzymes. In : Scriban R. (Ed) : Biotechnologies. Ed. Lavoisier. P : 344-400.

Boukhalfa .H. 2015. Etude de la production de la protéase par *Aspergillus oryzae* sur milieu solide en fermenteur fujiwara. Utilisation des déchets de tomate comme substrat de fermentation. Doctorat en Sciences. Spécialité : Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université Mentouri, Constantine, Algérie.

Bourgeois .C.M, Larpent J.P. 1996. Microbiologie alimentaire. Vol 11:Aliments fermentés et fermentation alimentaire. (Ed).Lavoisier.Paris:523.

Brahim .A.S.S, Salamah.A.A.A, Elbadawi.Y.B, Tayeb.M.A.E, Ibrahim.S.S.2015. Production de protéase alcaline extracellulaire par un nouveau *Bacillus sp* alcaliphile halotolérant *NPST-AK15* isolé à partir de lacs de soude hyper salins. Électron. Journal of Biotechnolgy. 18, 236-243.

Buzzini .P.2000.An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* *DBVPG 3853* from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 24: 41-45.

-C-

Calk.P, Takaç. S, Calk. G et Ozdamar .T. H. 2000. Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbiology Technology*. 26 (1): 45-60.

Castro.R. J. S, Sato. H. H. 2014. Production and Biochemical Characterization of Protease from *Aspergillus Oryzae*: An Evaluation of the Physical-Chemical Parameters Using Agroindustrial Wastes as Supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 3(3), 20–25.

Chi. Z, Ma. C, Wang .P, Li .H.F. 2007. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*, 98; 534–538.

Chung. D, Yu .W-J, Lim. J-Y, Kang .N-S, Kwon. Y-M, Grace.C, Seung-Sub. B, Cho .K et Lee. D-S. 2022. Characterization of the Proteolytic Activity of a Halophilic *Aspergillus reticulatus* Strain *SK1-1* Isolated from a Solar Saltern .*Microorganisms*, 10, 29.

Chunling.M, Xiumei.N, Zhenming.C, Liyan.M,Lingmei.G .2007. Purification and of an Alkaline Protease from the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans* for Bioactive Peptide Production from Different Sources. *Springer Marine Biotechnology*; 9, 343–351.

Cochran .W.G,Cox .G.M. 1992. *Experimental designs*, 2^{ème} ed., New York, John Wiley & sons, Inc., p. 244-292; 317-334.

Cofalec. 2006. Caractérisation des levures de boulangerie. Adopté par Comite de Fabrication de levures de panification de l'union européenne. Paris. P: 1-10.

Colwell. R.R et Grigorova. R. 1989. *Methods in microbiology*, (Ed)1St E dimundsbert press limited. Great Britain. P. 133-138.

Contesini. F. J, Rodrigues de Melo .R et Harumi .S .H. 2017. An overview of Bacillus proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*: 38:321– 334.

Contrera Gimenes. N, Silveira. E et Tambourgi .E .B. 2019. An Overview of Proteases: Production, Downstream Processes and Industrial Applications, *Separation & Purification Reviews*, 50(3) :223–243.

-D-

Dakhmouche.S .2016 . Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides.72.

Delia .P.M, Susana. L.G, Balatti. A.ÿ. 2001. Production de protéases à l'aide de *Bacillus subtilis* 3411 et d'un milieu de farine de graines d'amarante à différentes Ca_2^+ 133 taux d'aération. Brazilian Journal of Microbiology. 32, 6–9.

Dhayalan.A, Balasubramanian .V, Balasubramani .G,Ramalingam. K.R, Dilipkumar. A et Pachiappan. P.2022. Isolation of a bacterial strain from the gut of the fish, *Systomus sarana*, identification of the isolated strain,optimized production of its protease, the enzyme purification, and partial structural characterization Journal of Genetic Engineering and Biotechnology Springer; 20:24.

Do Nascimento . A .W .C et Martins. M .L. L. 2003. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *bacillus sp.* Brazilian Journal of Microbiology 35:91-96.

Dos Santos .A. J.G, Sato .H.H .2018. Protéases microbiennes : production et application dans l'obtention d'hydrolysats de protéines. Food Research International 103 :253–262.

-E-

Edelstein. S.J. 2002. Des gènes aux génomes. Edition ODILE JACOB.Paris :28.

Encyclopaedia Universalis. S. A. 1985. Encyclopaedia,Universalis. ed. Encyclopaedia Britannica Inc. p1158.

-F-

Feroz. K. 2013. Nouvelles protéases microbiennes dans les industries du cuir et des détergents. Innovation et Ressources Chimique 1, 1–6.

Frazier. W.C.1967. Food microbiology, Academic presses, London. P. 3-429.

-G-

Ganesh Kumar. C, Malik. R.K, Tiwari. M.P.1998. Novel enzyme-based detergents: an Indian perspective. Current Sciences (Bangalore) 75: 1312-1318.

Références bibliographiques

García-Gómez.M.J, Huerta-Ochoa. S, Loera-Corral. O, Prado-Barragán L.A. 2009. Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. Food Chemistry, 112 : 604–608.

Geethanjali. S et Subash. A. 2011. Optimization of protease production by *Bacillus subtilis* isolated from mid gut of fresh water fish *Labeo rohita*. World Journl of Fisheries and Marine Sciences; 3:88-95.

Goupy. J.L.1990. Étude comparative de divers plans d'expériences, Revue de statistique appliquée tome 38, no°4, p 6; 22.

Greppi. A et al. 2013. Yeast dynamics during spontaneous fermentation of mawè and tchoukoutou, two traditional products from Benin. Internatinal Journal of Food microbiology. 165 : 200-207.

Guiraud .J. P. 2016. Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. p : 311-330.

Guiraud. J.P .1998 . Microbiologie alimentaire. (Ed). Dunod.Paris:310-321.

Guiraud .J.P. et Rosec J.P. 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. p : 228-235.

Gupta. A, Khare .S.K. 2007. Amélioration de la production et de la caractérisation d'une protéase stable aux solvants à partir de *Pseudomonas aeruginosa* tolérant aux solvants. Enzyme. Technologie microbienne. 42, 11-16.

-H-

Hajji. M, Rebai. A, Gharsallah. N, Nasri .M. 2008. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ESI in Mirabilis jalapa tuber powder using statistical experimental design. Applied of Microbiology and Biotechnology, 79 ; 915–923.

Hölker. U, Hofer .M, Lenz .J. 2004 .Avantages biotechnologiques de la fermentation à l'état solide à l'échelle du laboratoire avec des champignons. Applied of Microbiology and Biotechnology. 64(2), 175–186.

-J-

Jabalia .N, P.C. Mishra et Chaudhary .N. 2014. Applications, Challenges and Future Prospects of Proteases: An Overview. *Journal of Agroecology and Natural Resource Management*: pp. 179-183.

Jacob. A, Rendleman. J. 1997. Enhancement of cyclodextrin production through use of debranching enzymes, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 26(1):51-61.

Jacobsen.T, Poulsen.O.M.1995. Comparison of lipases from different strains of the fungus *Geotrichum candidum*. *Biochimica et Biophysica Acta-Lipids* 1257:96-102.

Jacques .N et Serge. C, 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 321-326.

Jimoh. S.O, Ado .S.A, Ameh. J.B et Whong .C.M.Z. 2012. Characteristics and diversity of yeast in locally fermented beverages sold in Nigeria. *World Journal Engineering of Pure and Applied Sciences* 2: 40-44.

Jin-Beom. S, Jang .E-J, Charalampopoulos. D et Young-Jung. W. 2018. Purification and Characterization of Microbial Protease Produced Extracellularly from *Bacillus subtilis* FBL-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering Springer*.23: 176-182.

Jisha.V N,Smitha.R.B, Pradeep.S, Sreedevi.S, Unni.K.N, Sajith .S, Priji. P, Sarath .J .M, Benjamin .S. 2013. Versatility of microbial proteases .*Advances in Enzyme Research*, 39-51.

Johnson .E. A et Echavarri .C. Erasum. 2011. Part 11, Chapter 3: Yeast biotechnology in Kurtzman C. P., Fzll J. W. and Boekhout T. (eds); *The yeast .A taxonomic study*, Volume 1. Fifth edition. Elsevier, p. 21-45.

-K-

Kammoun. R, Naili.B, Bejar. S. 2008. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72, Grown on gruel . *Bioresource Technology*; 99; 5602–5609.

Kasana. R.C, Salwan. R, Yadav .S.K .2011. Protéases microbiennes : détection, production et amélioration génétique. *Critical Reviews in Microbiology* 37(3):262–276.

Koenig H. 1995. *Guide de Mycologie Médicale* Ellipses. Paris;284 p.

Kreger-Van Rij. N.J. 1984. The yeast .A taxonomic study, Elsevier Biomedical.

Kresze .G.B, 1991. Proteases during purification. Bioprocess-technology. 12 : 85-120.

Kuan Ooi .C, Rasit .N, Wan A .Wan R. 2021. Optimization of Protease from *Aspergillus Niger* under Solid-State Fermentation Utilizing Shrimp Shell Substrate .Biointerface research in applied chemistry; 11, Issue 6.

Kuddus. M .2019 . Enzymes dans la biotechnologie alimentaire : production, applications et perspectives d'avenir. Academic Press, New York, p. 909.

Kumar. C.G,Takagi. H. 1999. Microbial alkaline proteases from a bioindustrial viewpoint. Biotechnology Advances, 17, 561-594.

Kurtzman Cletus. P. 2011 b. Jack W. Fell, Teun Boekhout and Vincent Robert. Chapter 7: Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In Kurtzman C. P., Fell J. W. and Boekhout T. (Eds).The yeasts, a taxonomic study; Volume 1; Fifth edition. Elsevier, p. 87-111.

-L-

Lachance .M.A, Bowles. J.M, Wiens. F, Dobson. J, Ewing .C.P. 2006. *Metschnikowia orientalis* sp. nov, an Australasian yeast from nitidulid beetles. Internatinal Journal of Systematic and Evolutionary microbiology, 56: 2489-2493.

Lachance. M.A, Starmer. W.T., Rosa. C.A., Bowles. J.M. 2001. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. FEMS Yeast Research, Elsevier B.V. pp1-8.

Lachance .M-A. 2011a. Yeast .Encyclopedia of Life Sciences, Wiley John Wiley and sons. P: 12-56.

Lachance. M-A. 2011b. Chapitre 21: *Clavispora Rodrigues* de Miranda (1979) in Kurtzman C; P., Fzll J. W. and Boekhout T.The yeast. A taxonomic study ; Vol 2.Fifth edition, Elsevier.

Lai .Q. P. 2010. Utilisation des levures non-*Saccharomyces* en œnologie: étude des interactions entre *Torulasporea delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en culture mixte. Thèse de Doctorat, Université Toulouse.

Références bibliographiques

- Laiche. A.T. 2011** .Contribution à la valorisation du lactosérum par l'étude de l'influence des conditions de stockage sur la microflore lactosérique bovine. Mémoire de Magister. Université Kasdi Merbah- Ouargla. 129p.
- Larcher. C. 2011**. Les levures. Cours sur les levures, site personnel de Biochimie Microbiologie-Biologie humaine-Physiopathologie. p2.
- Lario. L.D, Chaud .L, Almeida .M, Converti .A, Sette. D.L et Pessoa. A .2015**. Fongique Biology. 119, 1129–1136.
- Larpent. J.P. 1991**. Biotechnologie des levures, Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p : 97-121:426.
- Larpent .J.P. et Larpent-Gourgaud . M. 1997**. Mémento technique de microbiologie. 3^{ème} édition, Lavoisier-Technique et Document, Paris. 8, p : 217-240.
- Larpent-Gourgaud.M, Sanglier.J.1992** .Biotechnologies. Principes et méthodes: 574-581.
- Le Blanc A. 2007-2008**. La fermentation panaière. ENSMIC – Alimentation humaine.
- Leclerc .H, Meyer .A et Deiana .J. 1995**. Cours de microbiologie générale. Nouveau.
- Leclerc. H .1975** . Microbiologie générale, doin éditeurs, Paris. P : 28.
- Leclercq-Perlat .M.N, Buono .F, Lambert .D, Spinnler .H. E. et Corrieu. G. 2004**. Production of camembert-type cheeses: Part I. Microbiological and physicochemical evolutions. Journal of Dairy Research 71:346-354.
- Lehninger. A. 1982**. Principles of Biochemistry. USA : Worth Publisher.
- Leveau .J.Y et Bouix .M .1979** . Etude des conditions extrêmes de croissance des levures osmophiles Ind. Alim. Agric, 11, p: 1147-1151.
- Leveau. J.Y. et Bouix. M. 1993**. Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier Technique et Document, Paris. 08, p : 2-92.
- Leyral. G. et Vierlin. E. 2007**. Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire, edit. Wolters Kluwer, Amsterdam, 287p.
- Liese .A, Weelbach. K et Wandrey. C. 2000**. Industrial Biotransformations, 2nd Ed, Wiley VCH Verlag, Weinheim,.

Références bibliographiques

Lodder .J. 1971. The yeasts. A taxonomic study, North Holland Publishing Company Amsterdam .London; P: 1385.

Lopandic .K, Zelger. S, Banzky .L. K, Eliskases-Lechner .F et Prillinger H. 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. Food Microbial, 23: 341-350.

Lowry .O. H, Rosebroughi .N. J, Farr A.L et Randall. R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193 (1), p: 265-275.

-M-

Machado. A.R.G.M, Teixeira. M.F.S, et de Souza Kirsch. L, Campelo .M, de Aguiar Oliveira. I.M. 2016. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. Saudi Journal of Biology and Sciences 23:621–627.

Madigan .M, Martinko .J. 2007. Brock-Biologie des micro-organismes.11^{ème} édition. Pearson Education.France.1047p.

Magliani .W, Conti. S, Gerloni .M, Beretolotti .D et Polonelli. L. 1997. Yeast killer systems. Clinical Microbiology Reviews 10:369-400.

Mahajan. R.T, Badgujar. S.B. 2010. Biological aspects of proteolytic enzymes .Journal of Pharmacy Research. 3(9): 2048-2068.

Mamo. J et Assefa. F. 2018. The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries .Hindawi Journal of Food Quality.

Mathieu. D.2005. Etude de la production des protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maîtrise. INRS-Eau Université du Québec, Canada.

Mercier. C.1997. Transgènes et modification quantitative et/ou qualitative de la composition de lait à de fins nutritionnels. In : Frened G. (Ed), intérêts nutritionnels et diététique du lait de chèvre.Nord-France. p: 169-177.

Miglani Sharma. K, Kumar.R, Panwar. S, Kumar. A, 2017.Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. Academy of Scientific Research

& Technology and National Research Center, Egypt .Journal of Genetic Engineering and Biotechnology Elsevier ,15;115-126.

Monttinen. H.A.M, Ravantti .J.J, Poranen .M.M. 2019. Structural comparison strengthens the higher-order classification of proteases related to chymotrypsin. *Polsona*, 14: (5).

Mota de Oliveira. J, Fernandes. P, Benevides. R. G, de Assis .S.A. 2020. Production, characterization, and immobilization of protease from the yeast *Rhodotorula oryzoicola*. *Biotechnology and Applied Biochemistry International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 0, Number 0, Pages 1–11.

Mukhtar. H, Haq. I. 2013. Évaluation comparative des sous-produits agro-industriels pour la production de protéase alcaline par des souches sauvages et mutantes de *Bacillus subtilis* en fermentation submergée et à l'état solide. *Sciences Monde Journale*, 1–6.

-N-

Naveed . M, Nadeem. F, Mehmood .T, Bilal. M et Anwar. Z, Amjad. F .2021. Protease-a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review *Catalysis Letters* 151(2):307–323.

Nisha. N, Divakaran. J .2014 . Optimisation de la production de protéase alcaline à partir de *Bacillus subtilis* NS isolé de l'eau de mer. *Afrique Journal of Biotechnology*13:1707–1713.

Nobel .E-M. 2004. Nobel Prize. Eduard Buchner.

-O-

Oteng-Gyang .K.1984 : Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Edition Technique et documentation, Paris

Ouédraogo .N, Savadogo .A, Zongo .C, Somda. K. M. A. et Traoré .S. 2012. High performance amylolytic yeast strains isolation and identification for valorization of potatoes waste available in Burkina Faso. *International Food Resource Journal* 19(4): 1463-1469.

Oxenboll. K.M, Pontoppidan .K, Nji .F.F. 2011. L'utilisation d'une protéase dans l'alimentation des volailles offre des avantages environnementaux prometteurs. *International Journal of Poultry and Science* 10, 842–848.

-P-

- Pandey .A. 2003.** Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13 ; 81–84.
- Pandey .A, Webb. C, Coccol. C.R et Larroche C. 2006.**(Eds).*Enzyme Technology*, Springer, Asiatech Publishers New Delhi.
- Pelmont .J .1995 .** *Enzymes : catalyseurs du monde vivant*. Presse universitaire de Grenoble.
- Perry .J.J.S, Staley .J.T et Lory. S. 2004.** *Microbiologie*. Edition Dunod.Paris.891p.
- Pol. D. 1996.** Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire. Ellipses édition marketing S.A, Paris. 15, p: 20-38, 42-57, 141-151.
- Prillinger .H, Molnar .O, Eliskases- Lechner .F et Ksenga .L. 1999.** Phenotypic and genotypic identification of yeast from cheese. *Antonie Van Leewenhock.*, 75: 267-283.
- Pushpam. L.P, Rajesh .T et Gunasekaran. P. A.M.B. Express. 2011.**1(3):1-10.

-Q-

- Qureshi. A .S, Bhutto. M.A, Khushk. I, Dahot. M.U. 2011.** Optimization of cultural conditions for protease production by *Bacillus subtilis* EFRL 01. *Afrique Journal of Biotechnology*, 10, 5173–5181.

-R-

- Ramkumar .A, Sivakumar.N, Gujarathi .A et Victor .R. 2018.** Production of thermotolerant, detergent stable alkaline protease using the gut waste of *Sardinella longiceps* as a substrate: Optimization and characterization. *Scientific Reports* 8:12442.
- Rao. M, Tanksale .A, Ghatge .M, et Deshpande .V. 1998.** Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. American Society for Microbiology, Division of Biochemical Sciences, National Chemical Laboratory, Pune India, 62 (3): p. 597–635.
- Ravel. H, Banerjee .S.E. 2003.** Effet des prétraitements enzymatiques et chimiques sur les propriétés de la soie. *Journal of Texte and Association*. 64, 65–69.
- Razzaq. A, Shamsi. S, Ali .A, Ali. Q, Sajjad .M, Malik. A, Ashraf. M .2019.** Microbial proteases applications. *Frontiers Bioengineering and Biotechnology* 7:110.

Références bibliographiques

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

Rezki-Bekki .M. A. 2014. Production des métabolites par les levures: caractérisation et identification des arômes et des alcools. Thèse de doctorat en biotechnologie. Université d'Algérie. Page 20-36.

Rezki-Bekki. M. A, Benbadis .L, DeBillerbeck. G, Benbayer .Z et François.J.M . 2013. Isolation and physiological characterization of indigenous yeasts from some Algerian agricultural and dairy products. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 4(6): 75-83.

Ripert. C. 2013. Mycologie médicale. Technique & document-Lavoisier. Paris; 690 p.

Rivière .J. 1970. Microbiologie industrielle et génie biochimique, (edn) Masson et Cie.

Robinson. E, Mason .H, Iqbal. S, Garrod .A, Evans. G.S, Elms. J. 2006. Exposition aux enzymes dans l'industrie britannique de la boulangerie. *Annule Occupation et Hygiène* 50, 379–384.

Romero .C. G. 2012. Étude des mécanismes physiologiques et moléculaires permettant la prise en charge des substrats hydrophobes par la levure *Yarrowia lipolytica* au niveau pariétal. Thèse de doctorat en Sciences de l'alimentation, Option Biotechnologie, Biochimie microbienne, Microbiologie. Université de Bourgogne.

-S-

Sajo Mienda .B, Yahya. A, Galadima. I et Shamsir . M .S. 2014.An Overview of Microbial Proteases for Industrial Applications. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5 ;(1): 388.

Satyanarayana. T et Kunge .G. 2009. Yeast Biotechnology: Diversity and Application. Springer Science, New Delhi. 744p.

Scherr .G.H, Weaver. R.H. 1953.The dimorphism phenomenon in yeast. *Bacterial Review* 17:51-92.

Schlender. M, Ute. D, Stefan .T, Eckhard. T et Harald. C. 2017. Purification and Properties of Yeast Proteases Secreted by *Wickerhamomyces anomalus* 227 and

Metschnikovia pulcherrima 446 during Growth in à White Grape Juice. International Journal of Wine Resource, 3(1): 2.

Scriban .R. 1993. Biotechnologie. 4^{ème} édition. Techniques et Documentation-Lavoisier. Paris. Pp: 39; 42; 351- 356.

Scriban .R. 1984. Biotechnologies. 2^{ème} édition. Techniques et Documentation-Lavoisier. Paris. p : 531.

Shankar. S, More. S.V, Seeta .L.R. 2010. Récupération de l'argent à partir de déchets de films radiographiques par la protéase alcaline de *conidiobolus coronatus kathmandu*. Universal Journal of Science and Ingestive Technology. 6, 60–69.

Sicard .P. 1982. Applications industrielles des enzymes. In : Durand G. & Monson P. (Ed):Les enzymes production et utilisation industrielles. Ed. Gauthier-Villars. p: 121-164.

Signoret.E et Bergler.G.2021. Les marronniers de la vigne et du vin, La lettre du Labo n°56.

Silva .R.R .D. 2017. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. Applied of Biochemistry and Biotechnology, 183 : 1–19.

Simon. P. et Meunier. R. 1970. Microbiologie industrielle et génie biochimique. Masson ET Cie, Editeurs. Paris VIe. p : 31-47, 385-411.

Singhania. R.R, Patel .A.K, Soccol .C.R, Pandey .A.2009. Progrès récents dans la fermentation à l'état solide. Biochemistry Engineering Journal 44(1) :13–18.

Solanki .P, Putatunda .C, Kumar .A.I, Bhatia .R, Walia .A. 2021. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses.King Abdulaziz City for Science and Technology, Springer.

Starmer .W.T, Lachance .M.A.2011. Yeast ecology. In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), the Yeasts, a Taxonomic Study. Elsevier, London, pp. 65-83.

Stratford. M. 2006. Food and beverage spoilage yeasts. In: Querol A, Fleet GH (Eds), Yeasts in Food and Beverage. Springer, Berlin, pp. 335–379.

Sugumaran. K.R, Ponnusami. V. 2015. Modélisation statistique de la production de pullulan et son application à la synthèse de nanoparticules d'acétate de pullulan. International Journal of Biological Macromolecules 81, 867-876.

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

-T-

Talhi. I, Dehimat .L, Jaouani. A, Radia .C, Berkani. M, Almomani. F, Vasseghian. Y, Chaouche .N. K . 2021. Optimization of thermostable proteases production under agro-wastes solid-state fermentation by a new thermophilic *Mycothermus thermophiles* isolated from a hydrothermal spring Hammam Debagh, Algeria Contents . Elsevier, Chemosphere. Science Direct 286.

Tamaki .N, Hama. T. 1982. Methods in enzymology. (Wood W.A., ed.), Academic Press, London: 285,306.

Tobe. S, Takami .T, Ikeda .S, Horikoshi .K. 1976. Production of some enzymatic properties of alkaline protease of *Candida lipolytica*. Agricultural and Biological Chemistry, 40; 1087–1092.

Trehan. N. 2018. Microbial proteases: A review .World Journal of Pharmaceutical Research, 8 ;(1): 358-373.

Troncoso .F. D, Sánchez . D.A et Ferreira .M. L. 2022. Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review Chemistry Open.

-U-

Ul-Haq. I, Mukhtar. H, Daudi .S, Sikander. A et Quadeer .M.A. 2003. Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. Biotechnology 2 (1): 30-36.

Unni .S, Prabhu. A.A, Pandey. R, Hande. R, Veeranki. V.D .2016. Optimisation du milieu basée sur l'algorithme génétique de réseau neuronal artificiel (ANN-GA) pour la production d'interféron gamma humain (hIFN- γ) dans l'usine de cellules de *Kluyveromyces. lactis*. Canadian Journal of Chemistry Engineering 97:843–858.

Usman .A, Said .M et Mamo .J. 2021. Production, Optimization, and Characterization of an Acid Protease from a Filamentous Fungus by Solid-State Fermentation .Hindawi International Journal of Microbiology.

-V-

Van Behen .J. B et Li .Z. 2002. Enzyme technology: an overview. *Cuitent Opinion in Biotechnology*, 13:338-344.

Van Dyk .J.S, Gama. R, Morrison. D, Swart. S, Pletschke. B.I. 2013. Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilization of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 26: 521–531.

Van Uden .N, Fell. J.W. 1986. *Advances in Microbiology of the sea*. Academic Press, New York. 1:167-201.

Velooralappil .N.J, Robinson .B.S, Selvanesan. P et al. 2013. Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research* 1(3):1–13.

Vimal. S.Prajapati, Ujjval .B, Trivedi and Kamlesh. C. Patel.A. 2015. Statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens KCP2* under solid-state fermentation. *3 Biotechnology*, 5 (2): 211-220.

Vishniac .H.S et Hempfling .W.P. 1979. *Journal of General Microbiology*. P: 112:301.

Vishwanatha .K. S, Appu Rao. A. G, Annapurna Singh .S. 2009. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae MTCC 5341*: optimization of process parameters. *Society for Industrial Microbiology, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*; 37:129-138.

-W-

Walker .G.M, Wiley . J et Chihhster. S. 1997. *Yeast Physiology and Biotechnology*.

Walker. G. M. 2009. Yeast. In M. Schaechter, ed. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. 2nd ed. London: Elsevier/ Academic Press, p. 1174-1187.

Ward. O.P .1985. Proteolytic enzymes. In: Moo-Young, M. Ed., *Comprehensive biotechnology, the practice of biotechnology current commodity products*, Pergamon Press, Oxford, 3, 789-818.

-X-

Xiaoguang .L, Zhang .Q, Xu. Z,Jiang . G, Gan .L, Tian .Y , Shi .B.2021. High-expression and characterization of a novel serine protease from *Ornithinibacillus caprae* L9T with eco-friendly applications, Springer Nature Environmental Science and Pollution Research.

Site web:

Web1: My Blog ,structure et caractéristiques des bactéries et levures,site : <https://tamtamtimtim.wordpress.com/2014/05/20/structure-et-caracteristiques-des-bacteries-et-levures/> ,consulté le 29/04/2022.

Web2: Benchmark six sigma, One Factor At a Time (OFAT) Experimentation, Site : <https://www.benchmarksixsigma.com/forum/topic/35533-one-factor-at-a-time-ofat-experimentation> , consulté le 16/05/2022.

Web3: Assistance de Minitab 18, Que sont les plans de surface de réponse, les plans composites centrés et les plans de Box-Behnken ?,Site : <https://support.minitab.com/fr-fr/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/>,consulté le 18/05/2022.

Web4: PTC Mathcad Prime 8.0.0.0, Plans d'expériences de Box-Behnken et Box-Wilson ; Site:https://support.ptc.com/help/mathcad/r8.0/fr/index.html#page/PTC_Mathcad_Help/box_behnken_and_box_wilson_designs.html , consulté le 16/05/2022.

Annexes

Annexe 1

1. Yeast Extract Peptone Glucose Agar (YPGA)

Il s'agit du milieu précédent gélosé à 2%. Dissoudre dans 1 litre d'eau distillé:
 20 g glucose.
 10 g de peptone.
 5 g d'extrait de l'extrait de levure.

En agitant Le mélange sur un agitateur jusqu'à dissociation complète de tous les ingrédients. Après en ajoute 20 g d'agar (chaque flacon de 200 ml 4g) Le milieu est autoclavé, La répartition du milieu de culture dans des boites de Pétri s'effectue dans une zone stérile devant le bec pour éviter la contamination du milieu et celles des boites.

2. Le taux de matière sèche(%)

Est donné par la formule suivante :

$$Ms(\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Ms : Matière sèche(%). **m₁** : poids de boite pétrie contenant la prise d'essai avant séchage.

m₀ : poids de boite pétrie vide. **m₂** : poids de boite contenant la prise d'essai après séchage.

3. Activité protéolytique(U)

$$AE(U) = [Tyr] \times V_R \times F_C$$

AE : Activité enzymatique (U : µg/h/ml). **[Tyr]** : Concentration de tyrosine (µg/ml).

V_R : Volume réactionnel (7,5ml). **F_C** : facteurs de conversion de temps et volume d'extrait(4).

4. L'activité spécifique (U/mg)

$$AS (U/mg) = AE (U) / P_t (mg)$$

AS: L'activité spécifique (U/mg). **P_t** : Protéines totales (mg). **AE** : Activité enzymatique(U).

Annexe 2

1. Dosage des protéines

✓ Préparation des solutions

- Solution A : Na_2CO_3 à 2% dans le NaOH 0,1N (0,4% dans l'eau distillée).
- Solution B : Tartrate à 2% dans l'eau distillée.
- Solution C : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 1% dans l'eau distillée.
- Solution D : 0,5 ml C + 0,5 ml B + 50 ml A Ce mélange doit être préparé juste avant utilisation.
- Folin-Ciocalteu diluée 3 fois (2ml d'eau distillée et 1ml de folin).
- Solution mère : de BSA (sérum albumine bovine) à 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour la courbe d'étalonnage.

✓ Protocole de dosage

Le milieu réactionnel est préparé comme suit (Tableau 9) :

Tableau 9: Protocole de dosage des protéines.

0.5 ml extrait enzymatique (dilué à 1/10 ^{ème} dans l'eau distillée) 2.5 ml de solution D
Agitation et Incubation à température ambiante pendant 10 minutes
0.25 ml de folin-ciocalteu dilué (1/3) à 50%
Agitation et Incubation à température ambiante et à l'obscurité 30 minutes puis Lecture de l'absorbance à 650 nm

✓ Préparation de la courbe d'étalonnage(BSA)

La gamme-étalon est établie à partir d'une solution mère de BSA dont les concentrations sont comprises entre 0 et 500 µg/ml. Le mélange réactionnel de différentes concentrations est préparé selon le même protocole décrit ci-dessus et comme l'indique le (tableau 10) suivant :

Tableau 10: Protocole de Préparation de la courbe d'étalonnage.

Tube	Blanc	1	2	3	4	5
BSA (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Solution D (ml)	5	5	5	5	5	5
Agitation et Incubation à température ambiante pendant 10 minutes						
Folin (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Agitation et Incubation à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes						
Lecture de l'absorbance à 650 nm						

✓ Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines

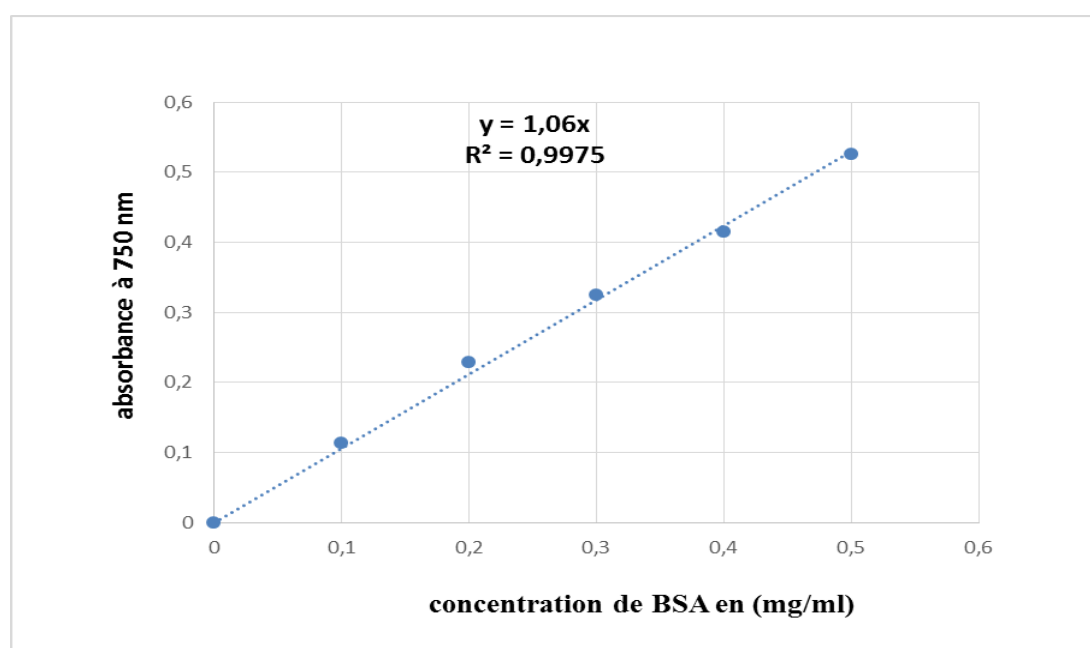


Figure 17 : Courbe étalonnage pour le dosage des protéines

2. Dosage de l'activité :

✓ Solution nécessaires

- Solution de caséine 2.5% dissoute dans du citrate de sodium 0.02M.
- Tampon citrate / sodium, (0,1M / 0,2 M), pH =5.
- Solution de TCA à 4%.
- Solution de Na₂CO₃ à 2% dans le NaOH 0,1N.
- Réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 50%.
- Solution mère de la tyrosine avec une concentration de 100µg/ml (0,01%) dissout dans le TCA Solution d'acide trichloracétique à 4% pour l'étalonnage

- ✓ **Le dosage de l'activité protéolytique** : est réalisé en deux étapes, et Chaque dosage est effectué 4fois :

Etape 01 : la réaction enzymatique; dont le mélange réactionnel est constitué de (Tableau 11).

Tableau 11 : protocole de l'étape01 de dosage de l'activité enzymatique.

<ul style="list-style-type: none"> o 0,375 ml du Tampon citrate / sodium (0,1M / 0,2 M), pH =5. o 0,25ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage et dilué (1/10^{ème}). o 0,625ml substrat caséine à 2.5% dissoute dans un tampon citrate de sodium (0.02M), pH=7.
Agitation et Incubation dans le bain marie à 40C° pendant 30 minutes
o 2,5 ml TCA à 4%, pour arrêter La réaction
Agitation et repos pendant 10 minutes pour permettent la précipitation totale de la caséine non hydrolysée
Filtration sur papier Whatman

NB : Les blancs sont préparés de la même manière que l'échantillon sauf qu'ici le TCA est ajouté avant le substrat et sans incubation dans le bain marie.

Etape 02 : Dosage colorimétrique de l'activité : Après filtration les composés azotés non protéiques qui se trouvent dans la phase soluble, sont dosés (Tableau 12) :

Tableau 12 : protocole de l'étape 02 de dosage de l'activité enzymatique.

<ul style="list-style-type: none"> o 2,5 ml Na₂CO₃ 2% dans du NaOH 0.1N. o 0,5 ml Filtrat. o 0,25 ml Folin dilué 1/4 dans l'eau distillée .
Agitation et Incubation à température ambiante, à l'obscurité pendant 30 minutes.
Lecture de l'absorbance à 750 nm au spectrophotomètre.

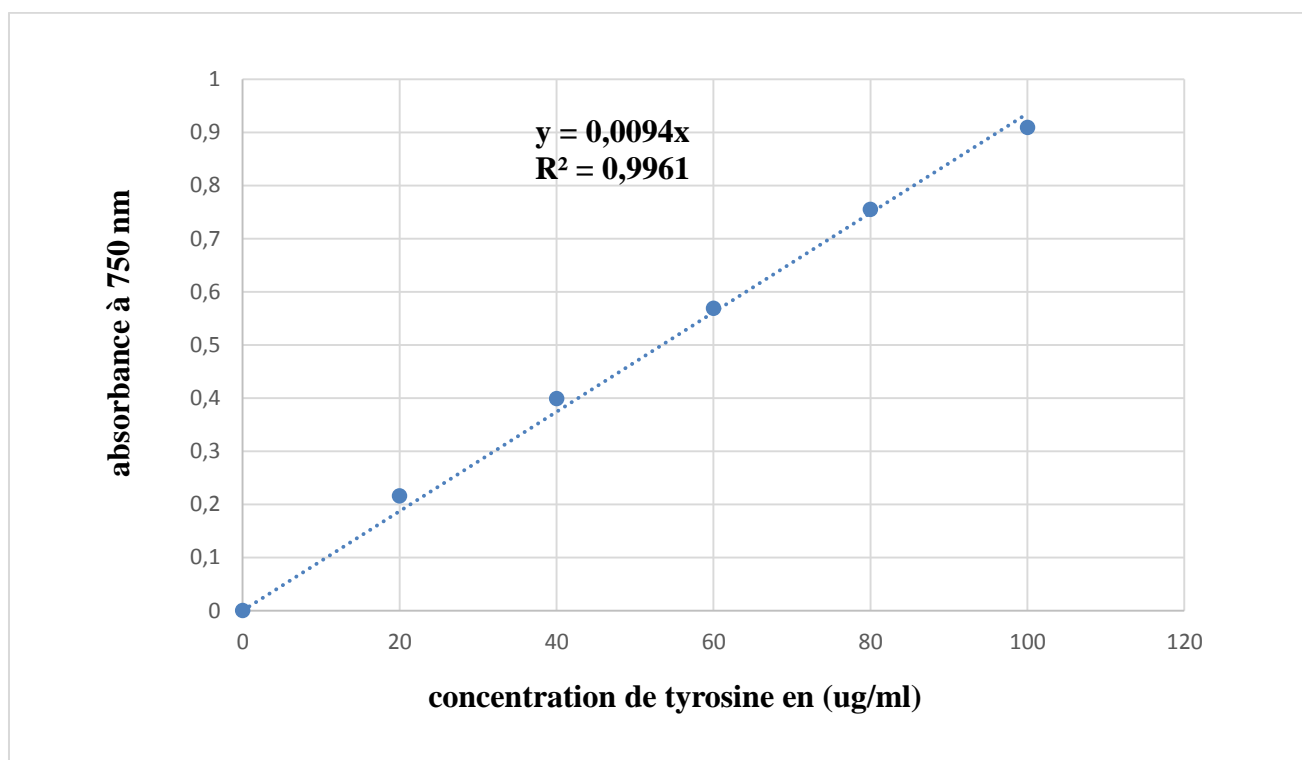
✓ Préparation de la courbe d'étalonnage(Tyr)

La gamme étalon est établie à partir d'une solution de tyrosine, les concentrations sont comprises entre 0 et 100 µg/ml selon le tableau suivant (Tableau 13) :

Tableau 13 : Protocole de Préparation de la courbe d'étalonnage.

Concentrations des dilutions (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Solution de tyrosine (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
TCA (ml)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Na ₂ CO ₃ (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Agitation et incubation pendant 10 minutes à température ambiante.						
Réactif dilué à ½ (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agitation et incubation à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes.						
Lecture de l'absorbance à 750 nm.						

✓ Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines

**Figure 18** : Courbe d'étalonnage de la tyrosine.

Annexe 3

- **Préparation des solutions tampon**

- 1. Tampon Citrate de Sodium (pH de 3 jusqu'à 9)**

- Solution A: acide citrique $C_6H_8O_7$ (0,1M).
- Solution B: le dissodique Na_2HPO_4 (0,2M).

Le pH est déterminé par le pH-mètre.

- 2. Tampon glycine (pH de 9 jusqu'à 12)**

- Solution A : Glycine (0,1M) dans NaCl (0,1N).
- Solution B : NaOH (0,1N) (0,4%).

Le pH est déterminé par le pH-mètre.

Résumés

ملخص

الهدف من عملنا هو دراسة تحسين إنتاج خميرة البروتياز من سلالة *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T عن طريق التخمير الصلب باستخدام نفايات الطماطم وبقايا الخبز كركيزة تخمير ومصدر للكربون لهذا ، يعتمد الجزء الأول من هذا البحث على طريقة Box and Wilson لتحديد القيم المثلى للعوامل الثلاثة المختارة لإنتاج البروتياز في FMS ، وهي: الرطوبة ، اللقاح ووقت الحضانة ، أتاح تحليل النتائج تحديد قيم العوامل الثلاثة التي لها تأثير معنوي على إنتاج الإنزيم (الرطوبة: 80% ، اللقاح $10^2 \times 2.08$ خلية / مل ، مدة الحضانة: 72 ساعة). في ظل الظروف المثلى ، يكون النشاط الأنزيمي 7264.70 وحدة دولية وهو ما يتوافق مع القيمة المتوقعة في النموذج التربيعي 5978.89 وحدة دولية. كما تم إجراء توصيف الإنزيم الناتج عن سلالة الخميرة *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T ، وأظهر البروتياز المنتج درجة الحموضة المثلى 4 ودرجة الحرارة المثلى 40 درجة مئوية. كما تم دراسة تأثيرات بعض المؤثرات. في حالة الأملاح ، يوضح نشاط الأنزيم البروتيني المتبقي الذي تم الحصول عليه أن $ZnSO_4$ ليس له أي تأثير على نشاط التحلل ، $BaCl_2$ و $CaCl_2$ لهما تثبيط ضعيف على نشاط التحلل للبروتين ، و ($CuSO_4$ ، $FeSO_4$ ، Na_2SO_3 ، KCl ، $(NH_4)_2SO_4$ ، $MnSO_4$ و $MgSO_4$) ، لهما تأثير مثبط على نشاط البروتياز مع العلم أن ($MgSO_4$ ، $(NH_4)_2SO_4$ ، Na_2SO_3) لها تثبيط قوي. بينما في حالة المنظفات، تحسن الإنزيم بواسطة SDS (101.89%) و توين (105.68%) 20 ويتم تنشيطه بقوة بواسطة بيطا ميركابتوايثانول (347.39%) ،بالإضافة إلى Ethylene Diamine (86.72%) (Tetra Acetate (EDTA) ، اليوريا (95.26%) ، توين 80 (96.20%) تثبط نشاط الإنزيم.

الكلمات المفتاحية: التحسين ، الإنتاج ، البروتياز ، الخميرة ، سلالة *Clavispora lusitaniae* CBS 6936 T ، التخمير الصلب ، التوصيف ، نفايات الطماطم ، بقايا الخبز.

Abstract

The objective of our work is the study of the optimization of yeast protease production from *Clavispora lusitaniae strain CBS 6936 T* by solid fermentation using tomato waste and bread remains as fermentation substrate and carbon source. For this, the first part of this research work based on the Box and Wilson method for determining the optimal values of the three factors selected for the production of protease in FMS, namely: Humidity, inoculum and incubation time, The analysis of the results made it possible to determine the values of the three factors which have a significant effect on the production of the enzyme (Humidity: 80%, inoculum 2.08×10^2 cell/ml, incubation time: 72 h). Under optimal conditions, the enzymatic activity is 7264.70 IU which is in agreement with the value predicted by the quadratic model 5978.89 IU. Also the characterization of the enzyme produced by the yeast strain *Clavispora lusitaniae strain CBS 6936 T* was carried out, the protease produced showed an optimum pH of 4 and an optimum temperature of 40°C. Also the study of the effects of some effectors has been carried out; in the case of the salts, the residual protease activity obtained demonstrates that $ZnSO_4$ has no effect on proteolytic activity, $BaCl_2$ and $CaCl_2$ have a weak inhibition on proteolytic activity, and ($CuSO_4$, $FeSO_4$, Na_2SO_3 , KCl , $(NH_4)_2SO_4$, $MnSO_4$ and $MgSO_4$, $NaCl$,) have an inhibitory effect on the protease activity knowing that ($MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_3) have a strong inhibition. While in the case of detergents, the enzyme improved by SDS (101.89%) and Tween 20 (105.68%) and strongly activated by β -mercaptoethanol(347.39%),in addition to the Ethylene Diamine Tetra Acetate (EDTA) (86.72),urea(95.26),tween80(96.20%) inhibits enzyme activity.

Keywords: optimization, production, protease, yeast, *Clavispora lusitaniae strain CBS 6936 T*,solid fermentation, characterization, tomato waste, bread scraps.

Résumé :

L'objectif de notre travail est l'étude de l'optimisation de la production de protéase levurienne de la souche *Clavispora lusitaniae strain CBS 6936 T* par fermentation solide utilisant des déchets de tomates et les restes du pain comme substrat de fermentation et source de carbone. Pour cela, la première partie de ces travaux de recherche basée sur la méthode de Box et Wilson pour la détermination des valeurs optimales des trois facteurs sélectionnés pour la production de protéase en FMS, à savoir : Humidité, inoculum et temps d'incubation, l'analyse des résultats a permis de déterminer les valeurs des trois facteurs qui ayant un effet significatif sur la production de l'enzyme (Humidité : 80 %, inoculum $2,08 \times 10^2$ cellule/ ml, temps d'incubation : 72h). Dans les conditions optimales, l'activité enzymatique est de 7264,70 UI ce qui est en accord avec la valeur prédite par le modèle quadratique 5978,89 UI. Egalement la caractérisation d'enzyme produite par la souche levurienne *Clavispora lusitaniae strain CBS 6936 T* a été effectuée, la protéase produite montre un pH optimum de 4 et une température optimale de 40°C. aussi L'étude des effets des quelques effecteurs a été réalisée ; dans le cas des sels l'activité résiduelle de protéase obtenus démontre que $ZnSO_4$ n'a pas d'effet sur l'activité protéolytique, $BaCl_2$ et $CaCl_2$ ont une faible inhibition sur l'activité protéolytique, et ($CuSO_4$, $FeSO_4$, Na_2SO_3 , KCl , $(NH_4)_2SO_4$, $MnSO_4$ et $MgSO_4$, $NaCl$) ont un effet inhibiteur sur l'activité protéasique sachant que ($MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_3) ont une forte inhibition. Alors que dans le cas des détergents l'enzyme amélioré par le SDS (101,89%) et le Tween 20(105,68%) et fortement activé par le β -marcaptoéthanol (347,39%) ,on outre l'éthylène Diamine Tetra Acétate(EDTA) (86,72), l'urée (95,26), tween 80(96,20%) inhibe l'activité enzymatique.

Mots-clés : optimisation, production, protéase, levure, *Clavispora lusitaniae strain CBS 6936 T*, fermentation solide, caractérisation, déchets de tomates, restes du pain.

Année universitaire : 2021-2022	Présenté par : TLILANI Meissoune. ZEHIOUA Narimene.
Optimisation de la production de la protéase levurienne et Caractérisation de l'enzyme	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie appliquée.	
Résumé :	
<p>L'objectif de notre travail est l'étude de l'optimisation de la production de protéase levurienne de la souche <i>Clavispora lusitaniae strain CBS 6936 T</i> par fermentation solide utilisant des déchets de tomates et les restes du pain comme substrat de fermentation et source de carbone. Pour cela, la première partie de ces travaux de recherche basée sur la méthode de Box et Wilson pour la détermination des valeurs optimales des trois facteurs sélectionné pour la production de protéase en FMS, à savoir : Humidité, inoculum et temps d'incubation, l'analyse des résultats a permis de déterminée les valeurs des trois facteurs qui ayant un effet significatif sur la production de l'enzyme(Humidité : 80 %, inoculum $2,08 \times 10^2$ cellule/ ml, temps d'incubation : 72h). Dans les conditions optimales, l'activité enzymatique est de 7264,70 UI ce qui est en accord avec la valeur prédite par le modèle quadratique 5978,89 UI .Egalement la caractérisation d'enzyme produite par la souche levurienne <i>Clavispora lusitaniae strain CBS 6936 T</i> a été effectuée, la protéase produite montrent un pH optimum de 4 et une température optimale de 40°C. aussi L'étude des effets des quelques effecteurs a été réalisé ; dans le cas des sels l'activité résiduelle de protéase obtenus démontre que $ZnSO_4$ n'as pas d'effet sur l'activité protéolytique, $BaCl_2$ et $CaCl_2$ ont un faible inhibition sur l'activité protéolytique, et ($CuSO_4$, $FeSO_4$, Na_2SO_3, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, $MnSO_4$ et $MgSO_4$, $NaCl$,) ont un effet inhibiteur sur l'activité protéasique sachant que ($MgSO_4$,$(NH_4)_2SO_4$,Na_2SO_3) ont une forte inhibition. Alors que dans le cas des détergents l'enzyme amélioré par le SDS (101,89%) et le,Tween 20(105,68%) et fortement activé par le β-marcaptoéthanol (347,39%) ,on outre l'ethylène Diamine Tetra Acétate(EDTA) (86,72), l'urée (95,26), tween 80(96 ,20%) inhibe l'activité enzymatique.</p>	
Mots-clés : optimisation, production, protéase, levure, <i>Clavispora lusitaniae strain CBS 6936 T</i> , fermentation solide, caractérisation, déchets de tomates, restes du pain.	
Laboratoires de recherche :	
Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications (Université Frères Mentouri,Constantine 1).	
<p>Encadreur : M^{me} Dakhmouche S. (M.C.B - ENS Assia Djébar, Constantine). Examineur 1 : M^{me} Bennamoun L. (M.C.B - Université Frères Mentouri, Constantine 1). Examineur 2 : M^{me} Lahneche M. (M.C.B - ENS Assia Djébar, Constantine 1).</p>	

