

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université M'hamed Bougarra de Boumerdes



## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en science Biologie

Option : Biotechnologie microbienne

# Thème

Mise en évidence d'une protéase produite par une archée halophile extrême et essai de protéase brut comme ingrédient de détergent à lessive.

Réalisé par :

*M<sup>lle</sup>* Zemmouri Siham

*M<sup>lle</sup>* Zemmouri Nesrine

Devant le jury composé de :

M <sup>me</sup> ALLOUANE R.	Maitre de conférences B (UMBB)	présidente
M <sup>me</sup> KHEMILI S.	Maitre de conférences A (UMBB)	Examinatrice
M <sup>me</sup> AKMOUSSI S.	Maitre Assistante A (UMBB)	promotrice
M <sup>me</sup> MOUDJAHIDE N.	Ingénieur d'analyse (CRD –sonatrach)	Co-promotrice

Année universitaire 2016/2017

## *Remerciements*

*Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier en premier lieu, Dieu tout puissant de m'avoir donné la force et le courage à fin de réaliser cette étude.*

*Nous vifs remerciements vont en particulier à M<sup>me</sup> AKMOUSSI S (promotrice). De m'avoir proposé ce sujet et de diriger mon travail par ses précieux conseils et ses encouragements.*

*J'exprime mes respectueuses reconnaissances à M<sup>me</sup> MOUDGAHED N (Encadreur) pour ses aides techniques et ses orientations.*

*Mes sincères remerciements vont aussi aux membres de jury pour l'honneur qu'elles auront fait en acceptant de juger ce travail à ; M<sup>me</sup> ALLOUANE d'avoir accepté de présider ce travail, à Mme KHEMILI S. qui a consacré son temps pour l'examination de ce travail.*

*Nous tenons aussi à remercier chaleureusement tous nos enseignants de l'université, qui nous ont suivis le long de nos études.*

*Nous tenons à exprimer nos plus vif remerciements à M<sup>r</sup> GANA M.L .chef du département de corrosion qui a bien nous accueillir du laboratoire de corrosion bactérienne de la Division laboratoire / SONATRACH-Boumerdes.*

*Nous tenons à remercier 'ensemble de l'effectif de la division laboratoire /SONATRACH-Boumerdes et laboratoire de biotechnologie microbienne au niveau de l'UMBB.*

*C'est avec un réel plaisir que nous 'adresse nous sincères reconnaissances et nos profonde gratitude à tous ceux qui ont m'aidé de près ou de loin pour réaliser cette étude.*

*Enfin, nous voudrais remercier tout particulièrement nos familles pour leur soutien constant au long de nos études et les personnes que nous aurions oubliés de citer dans ce dernier paragraphe.*

## *Dédicaces*

*Avant tout, je remercie ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui m'aide et me donne le courage de tout faire.*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...?.*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour,*

*Le respect, la reconnaissance...?*

*Ainsi, c'est tout simplement que*

*Je dédie ce mémoire :*

*A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux,*

*A ma mère NOURA qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau .Ni sacrifices, ni privatisations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ces enfants.*

*A mon cher papa BOUEALM qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

*Veillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel.*

*Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur...*

*A mes frères ABDO, Med RAOUF et RABAH que dieu vous garde et vous protège que votre chemin soit plein succès.*

*A toute ma famille*

*A mes chéries LAMYA, SARAH, AMEL, SOUAD, ABIR, SAMIRA, ZINBE, IMANE, MERIEM, NABILA, HIND, SOUMIA, Mr GOURARI MOHAMED, MALIA ,pour leur aide et leur soutien que dieu vous protège et vous préserve*

*A toute l'équipe de laboratoire de CRD : M<sup>r</sup> IKHELAF BOUEALM*

*A MA CHERÈ BINOME NSERINE*

*A tous mes collègues de promotion*

*SIHAM.*

## *Dédicaces*

*Avant tout, je remercie ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui m'aide et me donne le courage de tout faire.*

*Je dédie ce travail à mes chers parents,  
MA MERE NAIMA ET MON PERE LOUNES qu'ils trouvent ici le témoignage de ma  
profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études, que  
DIEU les bénisse.*

*A mes chers sœurs SAFIA ET SON MARIE ABD ET SA PETITE FILLE ALOA ET  
MERIEM ET SON MARIE MOHAMED ET MIRIWA et Mons chers frères NAJIBE tu es  
le meilleur frère qui existe, je te souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.*

*A tous mes amis ET sortant LAMYA, SARAH, AHMED, ABIR, ZINBE, SAMIRA,  
HIND.*

*ET A MA CHERE BINOME SIHAM*

*A toute l'équipe de laboratoire de CRD et Mr IKHELAF BOUEALM*

*A tous mes collègues de promotion*

*A tous ceux que j'aime.*

***NESERINE***

**LISTE  
DES  
FIGURES**

## LISTE DES FIGURES

Figure N°1 : Diagramme représentant l'enchaînement des méthodes utilisées.

Figure N°2 : aspect macroscopique de la souche S2 après 3 jours d'incubation sur milieu SH standard solide à 40°C (originale).

Figure N°3 : Aspect microscopique de la souche S2 observée par microscope photonique à immersion après coloration de Gram modifiée (originale).

Figure N°4 : aspect du résultat positif de protéase par la souche S2 sur milieu SH contenant le lait écrémé.

Figure N°5 : virage de la couleur du milieu de culture du jaune clair au rose pale.

Figure N°6 : Suivi de l'activité de croissance, de production protéique et de pH de la souche halophile extrême S2 sur un milieu SH additionné de lait écrémé à 40°C pendant 7 jours d'incubation.

Figure N°7 : Influence de la température d'incubation sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2.

Figure N°8 : Effet du pH initial du milieu SH modifier sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2 à 40°C.

Figure N°9 : Effet de NaCl initial du milieu SH modifier sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2 à 40°C et pH 7.

Figure N°10 : Effet des différentes sources de carbone du milieu SH modifier sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2 à 40°C et pH 7.

Figure N°11 : Effet des différentes sources d'azote du milieu SH modifier sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2 à 40°C et pH 7.

Figure N°12 : Effet de la température sur l'activité protéolytique.

Figure N°13 : Effet du pH sur l'activité protéolytique.

Figure N°14 : Effet des différents ions métalliques sur l'activité protéolytique.

Figure N°15 : Effet des surfactants et détergents sur l'activité protéolytique.

Figure N°16 : Essai d'application de protéase de la souche halophile extrême S2 comme un additif de détergent.



**LISTE  
DES  
TABLEAUX**

## Liste des tableaux Tableau

Tableau N1 :Classification des protéases (Rao et *al.*, 1998).

Tableau N2 : La liste des équipements ainsi que le matériel utilisés dans la réalisation de ce travail  
composition des milieux SH standard et SH modifié.

# CHAPITRE I SYNTESE BIBLIOGRAPHIQUE

# **SOMMAIRE**

**CHAPITRE II**  
**MATERIELE**  
**ET**  
**METHODES**

**CHAPITRE III**  
**RESULTATS**  
**ET**  
**DISCUSSION**

# CONCLUSION

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

# **ANNEXES**

# **INTRODUCTION**

# SOMMAIRE

---

<b>I Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>II Synthèse bibliographique</b>	
<b>II.1 Les <i>Halobacteriaceae</i> .....</b>	<b>2</b>
<b>II.1.1 Caractéristique des <i>Halobacteriaceae</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>II.1.2. Les mécanismes d'adaptation à la vie en milieu hypersalin .....</b>	<b>4</b>
<b>II.1.3. Application en biotechnologie .....</b>	<b>5</b>
<b>II.1.3.1. Production d'enzymes .....</b>	<b>5</b>
<b>II.1.3.2. Production de biopolymères .....</b>	<b>7</b>
<b>II.1.3.3. Production des substances antibactériennes .....</b>	<b>7</b>
<b>II.1.3.4. Fermentation des aliments .....</b>	<b>7</b>
<b>II.1.3.5. Traitement des eaux usées salines .....</b>	<b>8</b>
<b>II.2. Les protéases.....</b>	<b>8</b>
<b>II.2.1. Définition .....</b>	<b>8</b>
<b>II.2.2. Classification des protéases .....</b>	<b>8</b>
<b>II.2.2.1. Exopeptidases .....</b>	<b>9</b>
<b>II.2.2.2. Endopeptidases .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>II.2.3. Les facteurs influençant la production de protéases .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>II.2.4. Applications industrielles des protéases.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>II.2.4.1. Industrie alimentaire .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>II.2.4.2. Industrie pharmaceutique et médicale .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>II.2.4.3. Détergents.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>II.2.4.4. Tanneries .....</b>	<b>14</b>
<b>II.2.4.5. Traitement des eaux usées industrielles.....</b>	<b>14</b>
<b>II.2.4.6. Autres applications .....</b>	<b>14</b>
<b>III Matériels et méthodes</b>	
<b>III.1 matériel .....</b>	<b>16</b>
<b>III.1.1. Matériel biologiques .....</b>	<b>16</b>

## SOMMAIRE

---

III.1.2. Matériel non biologiques .....	16
III.1.3. Milieu de culture.....	16
<b>III.2. Méthodes .....</b>	<b>17</b>
III.2.1 Revivification de la souche S2 .....	19
III.2.2. Vérification de la pureté de la souche .....	19
III.2.2.1. Etude macroscopique .....	19
III.2.2.2 Etude microscopiques .....	20
III.2.3. Essai de production de protéase par la souche halophile extrême S2.....	21
III.2.3.1. Détermination de l'activité protéolytique : recherche de la caséinase .....	21
III.2.3.2. Préculture .....	21
III.2.3.3. Culture en batch .....	21
III.2.3.4 Suivi de fermentation.....	21
III.2.4 . Optimisation de la production de la protéase par la souche S2.....	23
III.2.4.1. Température .....	23
III.2.4.2.pH .....	23
III.2.4.3.Salinité .....	23
III.2.4.4.Source de carbone .....	23
III.2.4.5.Source d'azote .....	24
III.2.4.6. Temps d'incubation.....	24
III.2.5. Etude des propriétés physicochimiques de l'activité protéasique de l'extrait enzymatique brut .....	24
III.2.5.1. Effet du pH et de la température .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.2.5.2.Effet des ions métallique sur l'activité enzymatique. ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.2.5.3. Effet des surfactants et de détergent sur l'activité enzymatique	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.2.6.Application de la protéase brute comme ingrédient de détergent à lessive.....	25

## **IV résultats et discussion**

<b>IV. 1 Revivification de la souche S2.....</b>	<b>26</b>
<b>IV. 2 vérifications de la pureté de la souche S2.....</b>	<b>26</b>
IV.2.1 Etude macroscopique .....	26
IV.2.2 Etude microscopique .....	27
<b>IV.3. Production de protéase par fermentation liquide.....</b>	<b>28</b>
IV.3.1. Test d'activité protéolytique .....	28
IV.3.2. Préparation de préculture pour la souche S2 .....	29
IV.3.3. Suivi de la fermentation en batch .....	29
<b>IV.4.Optimisation de la fermentation en batch.....</b>	<b>32</b>
IV.4.1. Température optimale d'incubation.....	32
IV.4.2. pH optimal de la production .....	33
IV.4.3. Concentration de Na Cl .....	34
IV.4.4. Source de carbone .....	35
IV.4.5. Source d'azote .....	36
<b>IV.5. Propriétés physicochimiques de l'activité protéasique de l'extrait enzymatique brut .....</b>	<b>38</b>
IV.5.1 Effet de la température.....	38
IV.5.2 Effet de pH.....	39
IV.5.3 Effet des ions métalliques sur l'activité et la stabilité de l'enzyme.....	40
IV.5.4. Effet des surfactants et des détergents sur l'activité enzymatique .....	41
<b>IV.6. Application de la protéase brute comme ingrédient de détergent à lessive .....</b>	<b>41</b>
<b>V. Conclusion .....</b>	<b>42</b>

### **Référence bibliographique**

### **Annexes**

**SOMMAIRE**

---

### I. Introduction générale.

Les *Archaea* halophiles extrêmes (*Haloarchaea*) sont des halophiles obligatoires qui exigent plus de 15% de sel pour une croissance optimale (Grant *et al.*, 2001). La grande diversité métabolique des *Halobacteriaceae* isolées à partir des milieux hypersalins, leur confère un grand potentiel biotechnologique. Leur utilisation est envisagée dans différents domaines (Oren, 2002). Parmi ces *Halobacteriaceae* beaucoup produisent des métabolites précieux tels que les osmorégulateurs, des enzymes, polymères, etc...

La plupart des halophiles produisent des enzymes hydrolytiques extracellulaires telles que: cellulases, amylases, protéases, lipases et les xylanases (Rohban *et al.*, 2009). Parmi ces diverses enzymes d'origine halophiles, les enzymes protéolytiques sont ceux ayant des applications potentielles dans une variété de domaine biotechnologique (Karbalaei-Heidari *et al.*, 2009).

Les protéases sont parmi les enzymes les plus employées en industrie, leur vente compte pour 60% de toutes les ventes d'enzymes au niveau mondial. De celles-ci, les protéases alcalines sont employées principalement comme additifs dans les formulations de détergents. Les protéases d'origine bactérienne sont les plus employées, en comparaison avec les protéases fongiques d'origine végétale. Idéalement, les protéases utilisées dans les formulations de détergents devraient être hautement actives sur une large gamme de pH et de température. Il y a donc un grand intérêt au niveau industriel pour les protéases.

L'objectif principal de ce travail de recherche est de tester la production de la protéase dans un milieu synthétique par une souche halophile extrême S2 suivie d'une évaluation de l'application de cette enzyme dans l'industrie des détergents.

La première partie de notre travail est consacrée à la description des données bibliographiques relatives à l'environnement hypersalin et aux microorganismes halophiles productrices d'enzymes. La deuxième partie, se focalisera sur les différentes techniques utilisées qui ont été mises en œuvre pour étudier l'efficacité de la protéase comme ingrédient à détergent. Les résultats obtenus avec ses différentes méthodes sont comparés et discutés dans la troisième partie. Enfin la dernière partie rassemblera la conclusion finale et mettra en évidence les perspectives de recherche.

## II.1 Les *Halobacteriaceae*

Dans certains écosystèmes, la reconnaissance de la présence des microorganismes halophiles peut être effectuée sans faire appel à un « microscope », vu leur nombre très élevé. La saumure de marais salants est reconnue mondialement par la couleur rose-rouge due aux *Archaea* (*Haloquadratum* et d'autres représentatives des *Halobacteriaceae*), *Bacteria* (*Salinibacter*), et *Eucarya* (*Dunaliellasalina*) (Ma *et al.*, 2010).

Ces microorganismes peuvent être rencontrés dans les lacs hyper-salés, la mer morte (Jordanie), les étangs de distillation solaire et le « *Salt Lake City* » aux U.S.A. Ils sont retrouvés aussi au niveau des sebkhas (sud de l'Algérie), et elles se développent également sur les produits alimentaires conservés par salaison.

Selon Leclerc *et al.* (1984) les *Archaea* halophiles ou les *haloarchaea* peuvent être réparties en trois groupes écophysiologiques en fonction de l'exigence en ions  $Mg^{2+}$  et du pH. On distingue :

**Les *haloneutrophiles*:** Elles poussent à une concentration en  $Mg^{2+}$  inférieur ou égale à 5mM et un pH optimum de croissance allant de 5 à 8. On peut citer les genres suivants : *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Halorubrum*, *Natrinema* et *Natronorubrum* (KissPappo et Oren, 2000).

**Les *haloalcalophiles*:** Elles poussent à une concentration en  $Mg^{2+}$  inférieur ou égale à 1mM et un pH optimum de croissance allant de 8,5 à 11,5, comme : *Natronococcus*, *Natronobactérium*, *Halorubrobactérium*, et *Natrialba* (Matsubara *et al.*, 1994).

**Les *haloacidophiles*:** qui poussent à un pH inférieure à 4,5 comme : *Haloferaxvolcanii*, *Haloferaxmediterranii* (Dassarma et Arora, 2001).

### II.1.1 Caractéristique des *Halobacteriaceae*

#### Caractères culturels :

- Sur un milieu solide les *Halobacteriaceae* forment des colonies de couleur rouge, rose, rouge mauve et très rarement incolores. Cette coloration est due à la présence de la bactériorubine (pigment caroténoïde qui joue le rôle de protecteur contre les rayons solaires) et de la bactériorhodopsine qui participe à la synthèse d'ATP et au transport actif (Pelmont, 1995).

**Caractères morphologiques :**

- Pléomorphisme : les cellules peuvent avoir diverses formes (cocci, bacille, disque, triangle , sphère , etc) (Prescott *et al.*,1995).
- Elles sont Gram négatif (Grant *et al.*, 2001).
- Elles peuvent être immobiles ou mobiles grâce à des flagelles polaires (Prescott *et al.*, 2003).

**Caractères physiologique et biochimiques :**

- Aérobie ou anaérobie facultative (Grant *et al.*, 2001).
- Elles présentent un optimum de température entre 35 et 50°C (Prescott *et al.*, 2003).
- Forte exigence en sel : elles nécessitent au minimum 1.5 M de Na Cl, l'optimum de salinité varie entre 3.5 et 4.5 M, certains peuvent croître à concentration plus élevée (5.2 M) représentant la saturation.
- L'osmorégulation : est effectuée par accumulation d'une forte concentration de K Cl dans les cellules et de Na Cl du côté extracellulaire.
- Les halophiles sont résistants à certains antibiotiques tels que la pénicilline, le chloramfinicol .
- Les haloarchaea possèdent aussi un système de vésicules à gaz qui leur permet de flotter à des profondeurs favorables à leur croissance. Ce système apparaît comme des inclusions claires à l'intérieur de la cellule.
- Présence d'une catalase et d'une oxydase (Prescott *et al.*,2003).
- Chimioorganotrophes : utilisent les acides aminés et les carbohydrates comme source de carbone (Grant *et al.*,2001 ).
- L'ADN contient de 61 à 71% de CG. Les plasmides sont des composants mineurs représentant 10 à 30 % de l'ADN total .
- Les haloarchaea possèdent une paroi inhabituelle composée de polysaccharides et protéines mais notée par une absence de peptidoglycane. On trouve à la place de ce dernier des

composés de pseudomuréine, des glycoprotéines, ou encore d'autres protéines (Prescott *et al.*, 2003).

### II.1.2. Les mécanismes d'adaptation à la vie en milieu hypersalin

Une diversité considérable existe également dans les mécanismes d'adaptation des microorganismes halophiles et halotolérants à la forte pression osmotique exercée par leur milieu environnant fortement salin. Comme les membranes biologiques sont perméables pour l'eau, tous les microorganismes doivent maintenir leur cytoplasme au moins isoosmotique avec leur environnement (Oren, 2002).

#### Régulation de la pression osmotique

À faible concentration, le sel (NaCl) est indispensable au fonctionnement cellulaire, mais à forte dose, il entraîne la mort cellulaire par sortie d'eau. Cette stratégie implique de compenser la pression osmotique du milieu hypersalin environnant par l'accumulation des ions  $K^+$  et  $Cl^-$ . Elle est adoptée par les *Archea* aérobies halophiles extrêmes de l'ordre des *Halobacteriales* et par les bactéries halophiles anaérobies fermentatives ou homoacétogènes de l'ordre des *Halanaerobiales* (Oren, 2002). *Bacteria*. Il existe une large variété de solutés compatibles à savoir le glycérol, les sucres alcools, la glycine, glutamate, proline, bétaïne, l'ectoïne et son dérivé 5-hydroxy, les sucres simples, etc... Ces composés sont synthétisés par l'organisme ou importés de l'environnement externe sans interférer avec son métabolisme. Plusieurs études ont prouvé que les osmolytes tels que les ectoïnes protègent l'organisme de différents stress (thermique et salin) (Bursy *et al.*, 2008).

Dans les environnements hypersalés, la pression ionique est importante et due à l'excès de KCl ou de NaCl. Les micro-organismes halophiles stricts, accumulent dans leur cytoplasme le potassium (jusqu'à 100 fois plus de  $K^+$  que celle de l'extérieur), alors que le chlore reste dans le compartiment extracellulaire (Kalman, 2000).

#### Accumulation des solutés compatibles

Cette stratégie consiste à exclure le sel du cytoplasme, et à accumuler ou synthétiser des solutés organiques pour assurer l'équilibre osmotique. Elle est adoptée par les membres du domaine.

### II.1.3. Application en biotechnologie :

La grande diversité métabolique des bactéries halophiles et halotolérante isolées à partir des milieux hypersalins, leur confère un potentiel biotechnologique largement exploré depuis quelques

années. Ainsi certains d'entre elles produisent des protéines halophiles utiles dans les transformations spécifiques, d'autres des produits comme les solutés compatibles et les polymères à grand intérêt dans différentes industries. De plus, ces microorganismes pourraient être utilisés dans les procédés de bioremédiation de l'environnement ainsi que moyennes de lutte biologique contre certaine microorganismes phytogènes .

### II.1.3.1. Production d'enzymes :

Les bactéries halophiles se sont révélées être productrices d'une grande variété d'enzymes hydrolytiques telles que les protéases, les amylases, les xylanases, les cellulases, les lipases et les DNases. Ces enzymes sont couramment utilisées dans la production d'aliments fermentés et comme compléments alimentaires dans l'alimentation animale, dans les détergents à lessive et dans les industries de textiles. Plusieurs études ont montré que les enzymes provenant des eubactéries halophiles et halotolérantes ne sont pas seulement halostables mais peuvent aussi être thermostables et alcalistables. Ces caractéristiques rendent les enzymes candidates dans divers domaines de la biotechnologie, ce qui pourrait ouvrir de nouvelles possibilités d'application (Setati ,2010). Bien que ces enzymes halophiles effectuent les mêmes fonctions que leurs homologues non halophiles, elles peuvent catalyser des réactions dans des conditions différentes, telles que les environnements de forte salinité, donc la production d'enzymes résistantes aux sels.

#### A. Proteases :

Les protéases microbiennes sont les enzymes les plus étudiées et sont très utilisées dans les processus industriels. Elles sont couramment employées comme additifs dans les détergents à lessive, la transformation des aliments et des produits pharmaceutiques, et les réactifs dans les traitements de cuir et de déchets (Karbalaei-Heidari *et al.*, 2009).

Les bactéries extrêmophiles présentent donc des potentialités biotechnologiques intéressantes et prometteuses. L'amélioration des connaissances sur les mécanismes biologiques de ces bactéries de l'extrême devrait, dans un proche avenir, permettre l'amélioration de nombreux procédés industriels.

#### B. Amylases :

Sont des enzymes qui coupent les liaisons -glycosidiques des polysaccharides tel que l'amidon, glycogène, etc. et hydrolyse de cette liaison à fin de produire différents gluco-oligosaccharides de longueurs variables (Om *et al.*, 2010). Les amylases sont très utilisées dans

différentes applications biotechnologiques, et surtout dans l'industrie alimentaire, comme par exemple l'industrie du pain, pour améliorer le volume, la couleur et la douceur de la pâte (Gupta *et al.*, 2003).

### **C. lipases :**

les lipases sont des enzymes atypiques par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. En tant qu'hydrolases, elle sont responsables du catabolisme des triglycérides en acide gras et en glycérol. Pour l'instant de nombreuses études ont permis de révéler plusieurs activités lipolytiques dans le monde des halophiles. Elle ont beaucoup d'applications dans les industrie alimentaire(laiterie et boulangerie) ,médicales et pharmaceutique(synthèse des médicaments ou dans la préparation d'intermédiaire homochiral optiquement actif) et dans la fabrication de détergents (comme additifs ) (Ghanem *et al.*, 2007).

### **D. Cellulases :**

Les cellulases se distinguent des autres glycosides hydrolases par leur capacité à hydrolyser les liaisons -osidiques entre les résidus glycosyliques .les cellulases sont thermostables et également stables à l'alcalinité et à la salinité ce qui fait d'elle des candidats idéaux pour différentes application industrielles (wang *et al.*,2009). Ce sont principalement appliquées dans l'industrie du textile pour le bioblanchiment des tissus, aussi bien que dans les détergents de blanchisserie pour ramollir les tissus (Aygan et Arikan ., 2008).

### **II.1.3.2. Production de biopolymères**

Les biopolymères produit par les microorganismes halophiles (tels que exopolysaccharides (EPS), les protéines, glycoprotéine ou d'autres substances ) ont d'excellentes propriétés rhéologiques et résistent à des températures, salinités ,et pH extrêmes .Il ont de large applications dans les industries pharmaceutiques et alimentaires (Prescott *et al.*,2003).

### **II.1.3.3. Production des substances antibactériennes**

Les halophiles produisent des substances antibactériennes appelées «halocines» ou bactériocines.Ce sont des protéines bactériennes qui détruisent d'autres bactéries (Prescott *et al.*, 2003). Elles peuvent présenter un large aspect d'application dans le domaine agro-alimentaire, notamment dans la conservation des produits alimentaires par salaison .

### **II.1.3.4. Fermentation des aliments :**

La production de certains aliments fermentés traditionnels en Extrême-Orient, tel que la sauce à poissons et la sauce de soja, implique l'activité d'une variété de microorganisme halophiles et /ou

fortement halotolérant (Oren, 2002a). Dans certains cas, la concentration en sel pendant le procédé de fermentation est suffisamment haute pour le développement des Archea de la famille *Halobacteriaceae*.

#### **II.1.3.5. Traitement des eaux usées salines :**

Les halobactéries peuvent être des agents dépolluants. En effet, certaines bactéries halophiles utilisent les hydrocarbures tels que le pétrole comme seule source de carbone. Cette biodégradation n'a aucune conséquence négative sur les écosystèmes salins, contrairement au traitement par des agents chimiques (Margesin et Schinner, 2001). Elles sont utilisées aussi pour la biodégradation des phénols contenus dans les saumures. Ainsi, plusieurs études ont montré la dégradation bactérienne des composés aromatiques en conditions salines.

## **II.2. Les protéases**

### **II.2.1. Définition :**

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolase (Sekar A. *et al.*, 2016). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites extracellulairement comme intracellulairement. Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux. L'activation du zymogène en enzyme active nécessite une modification covalente irréversible. La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysate de protéines ou d'un mélange d'acides aminés. Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulateurs plus spécifiques (Drouin M., 2005).

### **II.2.2. Classification des protéases :**

Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur site d'action, soit les protéases intracellulaires et extracellulaires. Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques comme la sporulation et la différenciation, la maturation d'hormones et d'enzymes, et la maintenance du pool de protéines cellulaires. Ce type de protéase est moins intéressant à utiliser en industrie car ces enzymes nécessitent une étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Les protéases extracellulaires, excrétées à l'extérieur de la cellule, sont

importantes pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement extérieur de la cellule et aident ainsi la cellule à absorber et à utiliser les produits de cette hydrolyse (Drouin M., 2005). Ces enzymes sont plus intéressantes à utiliser en industrie car elles ne nécessitent pas d'étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Une centrifugation suffit pour les séparer des cellules. Les protéases se différencient également selon leur mode d'action: les endopeptidases et les exopeptidases. Les deux types de protéases sont divisés en plusieurs classes et sous-classes.

**Tableau N°2** présente les classes et sous-classes de protéases.

**Tableau N°2:** Classification des protéases (Rao *et al.*, 1998).

Type de protéase	Classes et sous-classes
<b>Exopeptidases</b>	<p><b>Aminopeptidases</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptidyle peptidases</li> <li>• Dipeptidyle peptidases</li> <li>• Tripeptidyle peptidases</li> </ul> <p><b>Carboxypeptidases</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Métallo carboxypeptidases</li> <li>• Sérine carboxypeptidases</li> <li>• Cystéine carboxypeptidases</li> </ul>
<b>Endopeptidases</b>	<p>Protéases sérines</p> <p>Protéases cystéines ou protéases thiols</p> <p>Protéases aspartiques ou protéase acide</p> <p>Métallo protéases</p>

### II.2.2.1. Exopeptidases

Les exopeptidases sont des protéases qui hydrolysent les liens peptidiques près des extrémités N ou C- terminales des protéines. Il existe deux classes d'exopeptidases: les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Ces enzymes sont très peu utilisées en industrie.

## 1. Aminopeptidases

Les aminopeptidases sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité N-terminale des protéines. Elles libèrent ainsi un seul acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide, d'où les sous-classes. Beaucoup d'aminopeptidases sont spécifiques aux protéines ayant un résidu méthionine en position N-terminale, qui est alors libéré sous l'action de ses protéases .

## 2. Carboxypeptidases

Les carboxypeptidases sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité C-terminale des protéines. Elle libère ainsi un seul acide aminé ou un dipeptide. Les carboxypeptidases sont divisées en trois sous classes, soit les sérines carboxypeptidases, les métallo carboxypeptidases et les cystéines carboxypeptidases, selon la nature des acides aminés présents au site actif de l'enzyme et selon leur mécanisme catalytique .

### II.2.2.2. Endopeptidases

La plupart des enzymes utilisées en industrie sont des endopeptidases. Elles sont caractérisées par leur action hydrolytique à un site spécifique de la chaîne polypeptidique loin des extrémités N-terminale et C- terminale. La présence d'un groupement amino ou carboxyl libre peut avoir un effet répresseur sur l'activité de ces protéases. Les endopeptidases sont divisées en 4 classes selon leur mécanisme catalytique : les protéases cystéines, les métallo-protéases, les protéases aspartiques et les protéases sérines .

#### 1. Protéases cystéines

Les protéases cystéines, ou thiols, sont très peu utilisées en industrie. Ces protéases sont présentes autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. La plupart des protéases de cette classe sont activées seulement en présence d'agents réducteurs comme la cystéine ou l'acide cyanhydrique. La papaïne, d'origine végétale, est la seule protéase de cette famille employée de façon significative en industrie.

#### 2. Métallo-protéases

Les métallo-protéases forment un groupe de protéases très variées. Ces enzymes contiennent un ion métallique divalent, le plus souvent le  $Zn^{2+}$ , nécessaire à leur activité. Les métallo-protéases sont habituellement des protéases dites neutres, ayant un pH optimum se situant près de 7.

Toutefois, certaines métallo-protéases sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de 10. Les métallo-protéases sont formées par plusieurs espèces du genre *Bacillus*, comme *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium* et *B. stearothermophilus* (Drpoin, 2005). Elles sont également produites par des moisissures comme *Aspergillus oryzae*.

### 3. Protéases aspartiques :

les protéases aspartiques, également connues sous le nom de protéases acides, sont des protéases dont l'activité catalytique dépend d'un résidu acide aspartique présent au site actif de l'enzyme. La plupart des protéases aspartiques ont une activité maximale à de faibles pH, généralement entre 3 et 4. Leur masse moléculaire se situe généralement entre 30 et 45 kDa. Ces enzymes présentent un intérêt industriel dans les secteurs où l'hydrolyse des protéines à faible pH est désirée.

### 4. Protéases sérines :

Les protéases sérines sont une sous-classe d'endopeptidases d'une grande importance au niveau industriel. La très grande majorité des protéases alcalines, très employées en industrie, sont des protéases de type sérine. Ces protéases sont caractérisées par la présence d'un résidu sérine au niveau de leur site actif, ainsi que de résidus aspartate et histidine formant le complexe actif avec le résidu sérine. Elles sont présentes chez les virus, les bactéries et les eucaryotes. Ces protéases ont généralement un pH optimal de 10, mais il peut varier entre 7 et 11.

## II.2.3. Les facteurs influençant la production de protéases :

- > **Effet de la salinité (NaCl) :** Comme indiqué plus haut, les protéines des halophiles et haloalcalophiles ont besoin de sel (Na Cl / K Cl) pour leur activité et leur stabilité. Toutefois, l'exigence de sel varie fortement. La plupart des protéines halophiles est actifs et stables jusqu'à 4 M de sel, l'optimum étant à 1 – 2 M (Joshi *et al.*, 2008) et inactivées et dénaturées à des concentrations inférieures à 1 M de Na Cl ou de la perte de l'activité en l'absence de sel.
- > **Effet de pH :** Le pH est un facteur important qui influence la croissance des microorganismes. Le pH a également une forte influence sur la production de protéases. et Hameed *et al.* (1999) ont démontré que la production de protéases par *B. subtilis* est maximale lorsque le pH est contrôlé durant la culture microbienne.

- **Effet de la température** : Enzymes thermostables sont d'un intérêt particulier pour les applications industrielles en raison de leur stabilité sous des températures élevées et la large gamme de pH. Les protéases thermophiles catalysent la réaction et maintiennent la stabilité à haute température. En outre, des températures plus élevées peuvent accélérer les vitesses de réaction, augmenter la solubilité des gaz non - réactifs et produits et réduire l'incidence de la contamination microbienne par des germes mésophiles (Vikram H *et al.*, 2016).
- **Effet des solvants organique** : Ces dernières années, une classe de solvants microbes tolérants ont attiré l'attention. Ces organismes sont attrayants pour les applications dans la biorestauration solvant et biotransformation dans les milieux non aqueux et constituent une source riche de solvants enzymes stables (Thumar et Singh 2009). Le plus grand rôle des enzymes tolérants solvants est dans le secteur pharmaceutique, où son exquise régiosélective et stéréo sélective propriétés permettent difficult synthèse. Seuls les rapports limités sont disponibles dans la littérature sur les micro-organismes qui produisent des protéases de stable à solvant organiques.
- **Effet d'ions métalliques** : Les ions métalliques protègent l'enzyme contre la dénaturation et jouent un rôle vital dans le maintien de la confirmation actif de l'enzyme à des températures plus élevées et des concentrations en sel.  $\text{Ca}^{+2}$  est connu pour activer la protéase et augmenter la thermo stabilité. D'autre part les forts effets inhibiteurs des ions  $\text{Hg}^{2+}$  et de la  $\text{Cu}^{2+}$  sur les protéases alcalines de certains *Bacillus sp.* sont également connus (Gupta 2003).

## II.2.4. Applications industrielles des protéases

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Cette section trace donc un portrait des principaux secteurs industriels employant des protéases.

### II.2.4.1. Industrie alimentaire

Mis à part le cas de la protéase alcaline dans les détergents, les industries alimentaires constituent aujourd'hui encore le principal domaine d'application des technologies enzymatiques, qui à partir d'un nombre limité de types de réactions catalysées donnent lieu à une grande diversité d'application (Drouin M., 2005). Les principales industries alimentaires utilisant les protéases sont :

#### ❖ Fromageries

L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages. Les protéases employées sont surtout des protéases acides. La majorité des protéases employées sont produites par *Mucor sp.*, *Bacillus subtilis* et *Endothica parasitica*. Elles sont utiles pour la coagulation des protéines du lait. La présure de veau a longtemps été l'enzyme utilisée à cette fin. Cependant, elle est de moins en moins utilisée car elle provient du système digestif de très jeunes veaux. Comme il n'est pas économiquement viable de tuer les veaux aussi jeunes, elle tend à être remplacée par des protéases microbiennes. Les protéases fongiques acides, alcalines et neutres produites par *A. oryzae* ont également été utilisées en industrie laitière (Aguilar *et al.*, 2008).

### ❖ Boulangeries

La farine de blé est grandement utilisée en boulangerie. Cette farine contient du gluten, une protéine insoluble, qui est responsable des propriétés de la pâte. Les protéases de *Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten, à un degré plus ou moins important, selon les caractéristiques désirées de la pâte. Le traitement de la pâte facilite sa manipulation et permet la production d'une grande variété de produits. Également, des protéases d'origine bactérienne sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte .

### Produits à base de soja :

Des protéases neutres et alcalines sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Les modifications des protéines du soja par les protéases aident à augmenter leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, le traitement de ces protéines par la protéase alcaline alcalase à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats de protéines solubles avec des propriétés nutritives très intéressantes. Ces hydrolysats sont utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans les formulations d'aliments diététiques (Rao *et al.*, 1998).

### Synthèse de l'aspartam :

Biens que les protéases soient des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse. Sous certaines conditions cinétiquement contrôlées, une préparation de thermolysine provenant de *Bacillus thermoprotolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartam (un édulcorant à basse calorie) à partir de l'acide *L*-aspartique et de la *L*-phénylalanine méthyle ester. Il est produit industriellement par Toya Soda (Japon) (Leisola *et al.*, 2001).

#### II.2.4.2. Industrie pharmaceutique et médicale :

La grande diversité et spécificité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement des agents thérapeutiques efficaces. Par exemple, des protéases d'*A. oryzae* (Luizim et Nortase) sont utilisées comme aide à la digestion ; des collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des brûlés, plaies et des ulcères dermiques; la « Brinase » (une protéase acide *plasmin-like*) permet l'hydrolyse de la fibrine et la fibrinogène chez les patients souffrant d'une hémodialyse (Sumantha *et al.*, 2006) ; une élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes .

#### II.2.4.3. Détergents

À l'heure actuelle, l'industrie des détergents est la plus grande utilisatrice de protéases. Le marché des détergents est aujourd'hui un marché très large qui englobe les détergents pour usage domestique (détergents à lessive, détergents à vaisselle), les produits de nettoyage pour usage industriel et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le marché le plus important au niveau de détergents est de loin celui des détergents à lessive (Kumar *et al.*, 2008b). Dans les procédés de lavage, la chaleur, les conditions alcalines et la présence de surfactants et d'agents séquestrant vont suffire pour dissoudre ou disperser la plupart des saletés incrustées dans les tissus. Une protéase détergente idéal doit avoir une large spécificité de substrat et stable dans l'environnement hostile de la machine à laver (température élevée et pH alcalin). Bien que la pepsine soit utilisée depuis 1913 (Hajji *et al.*, 2007).

#### II.2.4.4. Tanneries

Dans la tannerie, le délainage enzymatique est utilisé depuis le début du siècle dernier et plusieurs souches microbiennes et diverses méthodes ont été suggérées. Les protéases sont utilisées pour leur capacité à libérer les poils et la laine des peaux. Cette opération se fait à des pH élevés, et nécessite donc des protéases alcalines, comme celles produites par *Bacillus licheniformis*. Après l'enlèvement des poils, les peaux subissent le reverdissage, étape essentielle afin de rendre la peau douce et élastique. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients, dont des impacts majeurs sur la sécurité des travailleurs et sur l'environnement. De plus, le traitement des eaux usées de ces industries cause de sérieux problèmes. Par conséquent, l'emploi d'enzymes dans les procédés est maintenant privilégié. De plus, l'amélioration des procédés, la découverte et la mise au point de nouvelles protéases plus performantes permettent l'emploi grandissant des enzymes dans cette industrie (Gupta *et al.*, 2002a).

**II.2.4.5. Traitement des eaux usées industrielles**

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

**II.2.4.6. Autres applications**

La protéase neutre comme les protéases de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale. Une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir les films photographiques par hydrolyse de la gélatine (Sumantha *et al.*, 2006).

## Chapitre III: matériel et méthodes

Notre travail de recherche est réalisé au sein de laboratoire de BTM situé au niveau de l'université M'HAMED BOUGARA de Boumerdes (UMBB) et du laboratoire de corrosion bactérienne situé au niveau de Centre de Recherche et Développement de Sonatrach (CRD) de Boumerdes. Nous avons tracé pour objectif la mise en évidence d'une protéase produite par une archée halophile extrême et essai de protéase brut comme ingrédient de détergent à lessive.

### III.1 Matériel

#### III.1.1. Matériel biologiques

La souche bactérienne S2 Utilisée durant cette étude est une souche halophile extrême isolé à partir de sebkha algérienne. Elle a été identifiée comme étant une archaebactérie appartenant à la famille des *Halobacteriaceae*. La conservation de cette souche a été faite à 4°C dans un milieu liquide SH standard, additionné de 25% de NaCl.

#### III.1.2. Matériel non biologiques

La liste des équipements ainsi que le matériel utilisés dans la réalisation de ce travail est présentée dans l'annexes I.

#### III.1.3. Milieu de culture

Deux milieux de culture ont été utilisés dans ce présent travail:

- 1- Le milieu SH standard : utiliser pour la revivification de la souche halophile extrême S2. Se milieu présente une forte salinité, sa composition est donnée dans le tableau N° 4.
- 2- Le milieu SH additionné de lait écrémé pour essai de production de protéases à partir de la souche halophile extrême S2 sur le lait écrémé comme inducteur. Sa composition est donnée dans le tableau N° 4.

**Tableau N°4:**Composition des milieux SH standard et SH additionné de lait écrémé .

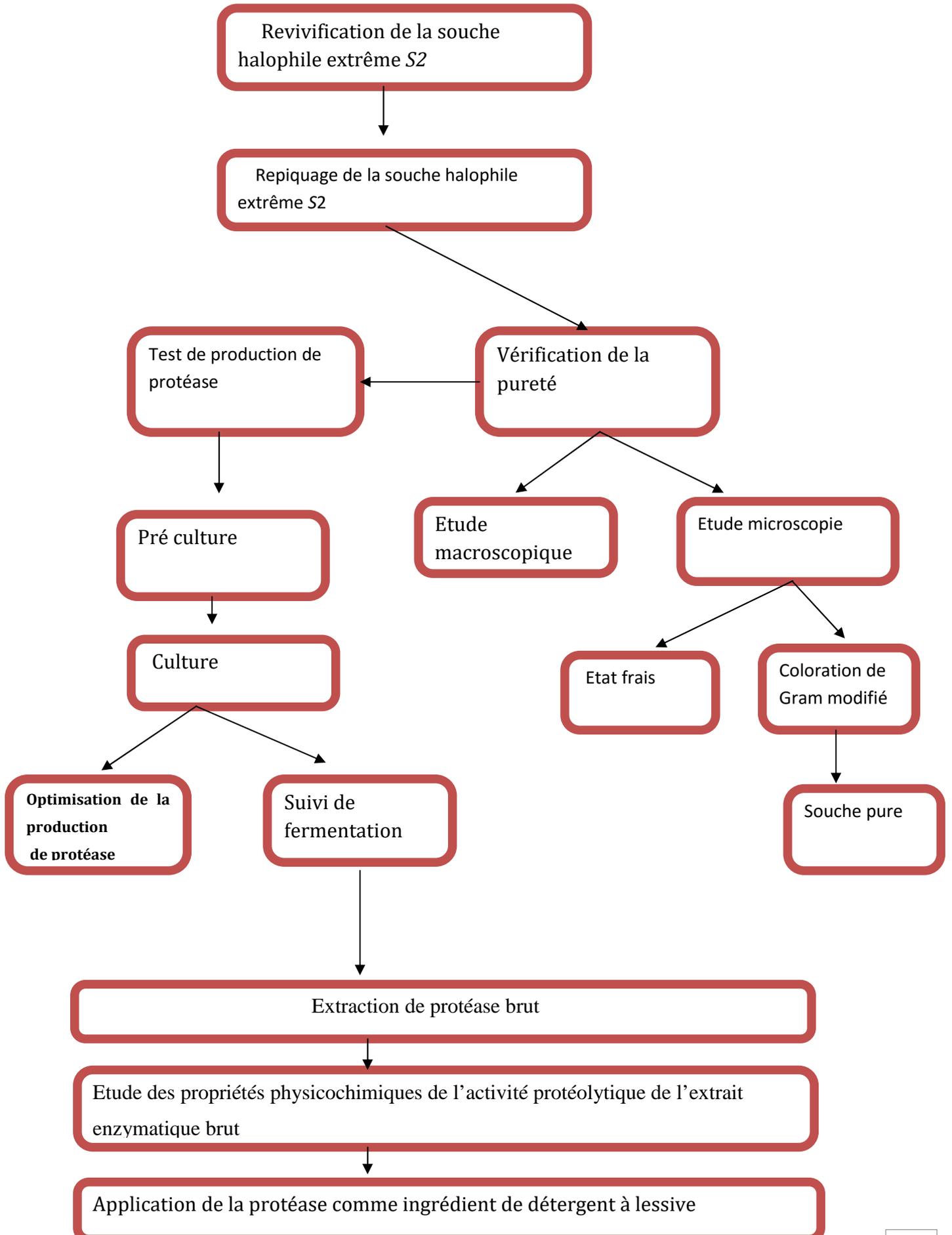
Composition	Milieu SH standard	Milieu SH modifié
Na Cl	150g	150g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	160g	160g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5g	5g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.1g	0.1g
Extrait de levure	1g	1g
Amidon	2g	-
Lait écrémé stérile	-	10 ml
Eau distillée	1L	1 L
pH	7	7

Lait écrémé stérile a été ajouté au milieu préparé après l'autoclavage.

Les milieux solides sont préparés en rajoutant 20g /l d'agar.

### III.2. Méthode

Le diagramme de la Figure N°1 représente l'enchaînement des méthodes utilisées lors de la réalisation de notre travail.



**Figure N° 1:** Diagramme représentant l'enchaînement des méthodes utilisées

### III.2.1 Revivification de la souche halophile extrême S2:

La revivification de la souche halophile extrême S2 s'est faite dans des boîtes de Pétri contenant le milieu SH solide. Ce milieu de culture a été ensemencé stérilement à partir du tube de conservation, préalablement retiré du réfrigérateur. Les boîtes ensemencées ont été scellées par du para film, puis mises dans des sacs en plastique afin de réduire la dessiccation précoce du milieu puis mises dans l'étuve à 40°C pendant 7 à 14 jours (Kebbouche-Gana *et al.*, 2009).

### III.2.2. Vérification de la pureté de la souche :

Au quatrième jour de l'incubation à 40°C, les boîtes de pétri ont retirées de l'incubateur et soumises à deux types d'observation (macro et microscopique) afin de vérifier la pureté de la souche. selon les recommandations de «Bergy's Manual of systematic Bacteriology».

#### III.2.2.1. Etude macroscopique :

C'est la première étape qui oriente le processus d'identification des bactéries. Elle porte sur la description des colonies obtenues sur les milieux solides en se basant sur les caractères morphologiques. . L'observation à l'œil nue est basée sur les éléments d'identifications données par Thomas *et al.*, (1970) :

La forme des colonies : circulaire, filamenteuse, ondulée

La taille des colonies : punctiforme (<1mm de diamètre), non punctiforme (>1mm).

La chromogènes : couleur de pigment.

L'opacité : transparente, translucide ou opaque.

L'élévation : colonie plate, convexe ou concave.

L'aspect de la surface : lisse, sèche, rugueuses, brillant ou émoussée

L'aspect de contour : régulier ou non (denté, étoilé...).

La consistance : visqueuse ou non visqueuse.

### III.2.2.2 Etude microscopiques :

La pureté des souches est vérifiée sous microscope photonique en deux étapes : observation à l'état frais et coloration de Gram modifiées

➤ **Observation microscopique a l'état frais :**

L'observation de la souche halophile extreme S2 à l'état frais ce fait en absence de toute fixation ou coloration.

Selon Marchal et Bourdon (1982), cette méthode permet d'observer la morphologie des microorganismes, leur taille, leur mode de regroupement, ainsi que leur mobilité.

La procédure consiste à déposer entre lame et lamelle une goutte de la suspension microbiennes (à partir d'une culture jeune et pure) à l'aide d'une pipette pasteur, puis observer au microscope photonique au grossissement x40.

➤ **Coloration de Gram modifiées :**

Décrite par Dussault (1955), cette technique permet de mettre en évidence le type de Gram de la bactérie étudiée. Elle est appliquée aux microflore extrêmes. La coloration de Gram modifiée se déroule en deux étapes :

- **Préparation de frottis :** le frottis bactérien représente l'état fixe des bactéries. Pour le préparer, on dépose au centre d'une lame 2 à 3 gouttes de la suspension bactérienne. Puis, on l'étale à l'aide d'une pipette Pasteur de façon à réaliser un étalement mince et homogène. Le frottis est ensuite séché et fixé par des passages rapides sur la flamme bleue de bec benzen.
- **Coloration de frottis :** le frotte est traité avec de l'acide acétique à 2% pendant 5 min, suivi d'une coloration au cristal violet de Gentiane (colorant de base) pendant une minute, puis rincé à l'eau, recolorer par la fuchsine pendant une minute et 30 secondes. Cette dernière étape engendre l'aspect différentiel de la coloration de Gram. La lame est rincée par l'eau distillée et séchée, puis observée au microscope photonique à immersion au grossissement x100.

### III.2.3. Essai de production de protéase par la souche halophile extrême S2

#### III.2.3.1. Détermination de l'activité protéolytique : recherche de la caséinase

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu SH gélosé contenant 1 % de lait écrémé. Après 48 heures d'incubation à 40°C, la présence de cette activité est détectée par un halo clair autour de la strie indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (De VOS et al., 2009).

#### III.2.3.2. Préculture :

Cette étape permet l'adaptation de la souche halophile extrême S2 aux conditions du milieu et le résultat servira comme inoculum pour lancer la culture dans le fermenteur. Pour un volume de travail de 1 litre du fermenteur, nous avons préparé une préculture dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture SH liquide est additionné 1 % de lait écrémé comme source de carbone. L'erlenmeyer a étéensemencé à partir d'une boîte de pétri issue de l'étape de purification. Le milieu de culture SH liquide est additionné de lait écrémé a été autoclavé et le pH ajusté à 7. La préculture a été incubée dans un agitateur-incubateur pendant 4 jours à une température de 40 C° et sous une agitation de 120 rpm. (De VOS et al., 2009).

#### III.2.3.3. Culture en batch:

Après quatre jours d'incubation, 10 % de chacune des précultures ont été transvasés dans 100 ml de milieu de culture neuf pour chaque erlen-Meyer. L'agitation de 150 tours/min facilite l'accès des souches au substrat et à l'oxygène.

#### III.2.3.4 Suivi de fermentation

Des prélèvements ont été effectués tous les jours pour un suivi régulier des paramètres suivants :

Suivi de la croissance cellulaire (DO 600nm),

Suivi de pH ,

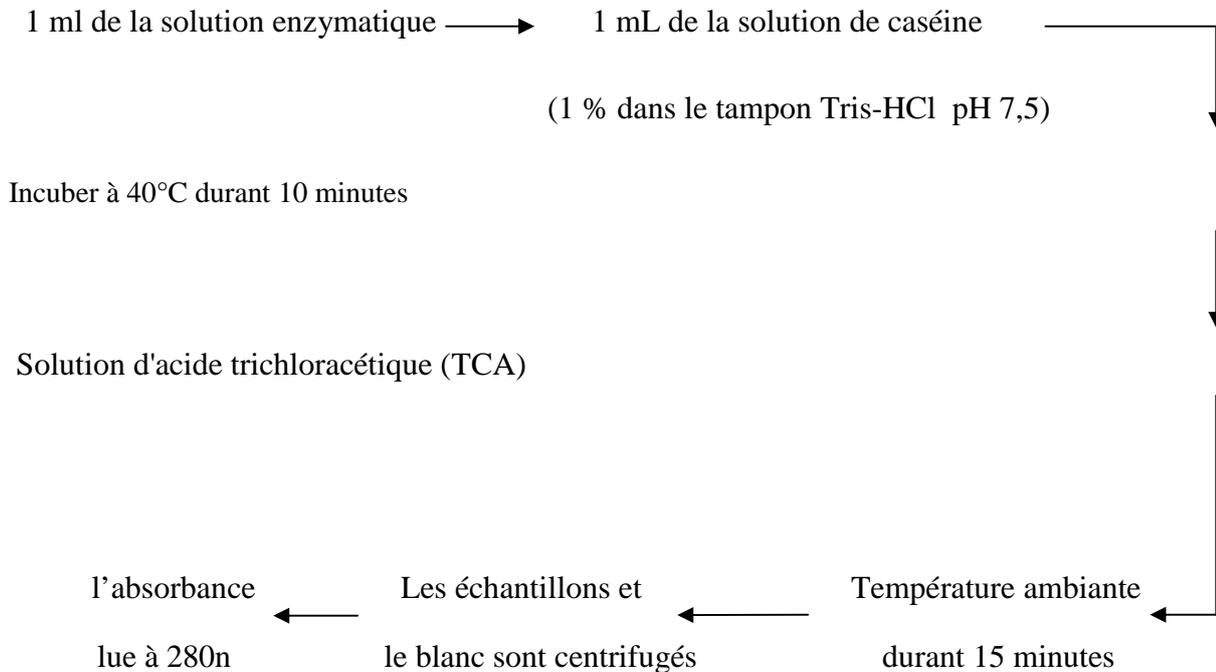
Suivi de l'activité protéolytique.

##### a- Suivi de la croissance cellulaire:

Le suivi de la croissance cellulaire a été effectué en mesurant la densité optique cellulaire chaque jour pour chaque prélèvement à une longueur d'onde de 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

**b- Suivi de pH:**

La variation du pH a été mesurée en fonction de temps (pendant 7 jours) à l'aide d'un pH mètre.

**c- Dosage de l'activité protéolytique****III.2.4. Optimisation de la production de la protéase par la souche halophile extrême S2**

Il est très connu que la production des protéases microbiennes extracellulaires est fortement influencée par la composition du milieu de fermentation ( source de carbone, d'azote et les sels minéraux), les facteurs physicochimiques (température, pH) (Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006).

Après chaque étape d'optimisation la mesure de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques sont déterminés dans les conditions standards ( Température 40C°, pH 7, concentration de NaCl 12.5% , l'amidon comme source de carbone et l'extrait de levure comme source d'azote avec incubation de 3 jours.

**III.2.4.1. Température :**

L'effet de la température de fermentation sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2 a été étudié sur milieu SH liquide additionné de lait écrémé incubé à des températures allant de 20 à 45°C pendant 3 jours sous une agitation de 120 rpm. avec pH 7,

concentration de NaCl 12.5% , l'amidon comme source de carbone et l'extrait de levure comme source d'azote .

#### **III.2.4.2.pH :**

Afin d'étudier l'influence du pH sur la production de la protéase par la souche halophile extrême S2, des fermentations sont conduites à la température optimale mais à différents pH variant de 5 à 10 pendant 3 jours. L'ajustement du pH est effectué avec une solution d'HCl et /ou du NaOH (1N). avec concentration de NaCl 12.5% , l'amidon comme source de carbone et l'extrait de levure comme source d'azote.

#### **III.2.4.3.Salinité :**

L'effet de la concentration de NaCl a été optimisé par incubation de la souche halophile extrême S2 à différentes concentrations; 5%, 10%,12.5%, 15%, 20%, 25%, 30%. La fermentation est conduite à la température optimale et au pH optimum pendant 3 jours. avec l'amidon comme source de carbone et l'extrait de levure comme source d'azote.

#### **III.2.4.4.Source de carbone :**

L'effet de la source de carbone sur la production de la protéase par la souche halophile extrême S2 a été étudié sur des milieux de culture SH additionné dz lait écrémé contenant différents types de substrats (Glucose, maltose, xylose, fructose, saccharose). La fermentation est conduite à 40 °Cà pH 7 pendant 3 jours. Avec concentration de NaCl 12.5% , l'extrait de levure comme source d'azote .

#### **III.2.4.5.Source d'azote :**

Afin d'étudier l'influence de la source d'azote sur la production de la protéase par la souche halophile extrême S2, des fermentations sont conduites sur des milieux de culture SH additionné de lait écrémé contenant différents types de source d'azote (peptone, urée, nitrate de potassium, caseine et l'extrait de levure) à la température et pH optimale pendant 3 jours. Avec concentration de NaCl 12.5% , l'amidon comme source de carbone.

#### **III.2.4.6. Temps d'incubation**

Le profil de production de la protéase par la souche halophile extrême S2 et la détermination du temps d'incubation optimum, ont été déterminés par incubation des cultures dans les conditions optimales préalablement établies à différents temps allant de 1 à 7 jours avec un écart de 24h.

Afin d'estimer tous ces optimums, le suivi de la cinétique de croissance a été fait par le contrôle régulier de trois paramètres suivants : dosage de l'activité protéique, pH et la densité optique à 600 nm.

#### III.2.4.7. Agitation

### III.2.5. Etude des propriétés physicochimiques de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut :

#### a- Effet du pH et de la température

L'effet du pH sur la protéase a été déterminé en incubant le mélange réactionnelle à différentes valeurs de pH variant de 4 à 10 pendant 1h. L'activité de la protéase est déterminée selon le test d'activité cité ci-avant.

Afin de déterminer la température optimale pour l'activité enzymatique, l'expérience s'est déroulée à différentes températures balayant un intervalle de 30 à 70°C. Le mélange (enzyme-tampon) a été incubé pendant 1h et l'activité a été déterminée par la méthode standard.

#### a- Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique.

Pour examiner les effets de différents ions métallique sur l'activité protéolytique, l'extrait enzymatique brut a été incubé à 40 C° pendant 1h avec divers ions métallique (CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>). À déférente concentration (1, 5et 10 mM).

#### b. Effet des surfactants et de détergent sur l'activité enzymatique

L'effet d'inhibiteuret d'activateur sur l'activité protéasique a été déterminé par l'addition de EDTA1mM, cystéine 1mM et SDS, 0.1% pendant 1 h avec agitation 120 rpm à 40 °C.

### III.2.6. Application de la protéase brute comme ingrédient de détergent à lessive

L'utilisation de l'enzyme comme un additif de détergent a été étudiée sur des morceaux de tissu de coton blanc (5 cm × 5 cm). Tachés avec des taches de sang et d'encre afin de simuler l'état de lavage, et de déterminer l'efficacité de notre enzyme brut produite par la souche halophile extrême S2 en tant qu'additif biodégradant. Les protéases endogènes contenues dans le détergent à lessive ARIEL et LE CHAT ont été inactivées en chauffant les détergents pendant 1 h à 60°C avant l'addition de l'enzyme à tester. et ISIS qui ne contienne pas des protéases endogènes.

Les morceaux de tissus colorés ont été incubés à (250 trs / min) dans différents traitements de lavage à 40°C pendant 1 heure dans des béciers contenant les détergents seuls (ISiS, ARIEL et LE CHAT) et le détergent additionner de l'enzyme produit par la souche halophile extrême S2.

Après le traitement, les morceaux de tissu ont été rincés à l'eau, séchés et soumis à une observation visuelle pour examiner les effets d'élimination des taches. Les morceaux de tissu non traités, tachés de sang et d'encre ont servi de contrôle (Sekar *et al.*, 2016).



## IV. Résultats et discussions

### IV. 1 Revivification de la souche halophile extrême S2:

Après 3 jours d'incubation des cultures sur milieu SH standard liquide (15% NaCl) à 40°C sous une agitation de 120 rpm, nous avons constaté un virage de couleur du milieu de culture (d'origine jaune) vers le rose clair. A ce stade, nous pouvons conclure qu'il y a une croissance favorable sur ce milieu, et ceci avec apparition du trouble et de la pigmentation rose pâle de la souche halophile extrême S2. La pigmentation rose-rouge est une caractéristique de certaines souches halophiles extrêmes appartenant à la famille des *Halobacteriaceae*, qui est due à la présence du pigment bactériorhodopsine, un composé caroténoïde (Larpent, 2000).

### IV. 2 Vérifications de la pureté de la souche halophile extrême S2

#### IV.2.1 Etude macroscopique :

Une observation macroscopique a été effectuée pour la souche halophile extrême S2 après une incubation de 3 jours à 40°C sur milieu SH standard solide (figure N°2).



**Figure N°2:** Aspect macroscopique de la souche halophile extrême S2 après 3 jours d'incubation sur milieu SH standard solide à 40°C (originale).

Cette observation nous permet de déduire les caractères macroscopiques suivants : Forme Circulaire ; Taille >1mm ; Chromogènes Rose-pâle ; Opacité Opaque ; Consistance Visqueuse ; Contour Régulier ; Surface Lisse Brillante ; Elévation Convexe.

### IV.2.2 Etude microscopique :

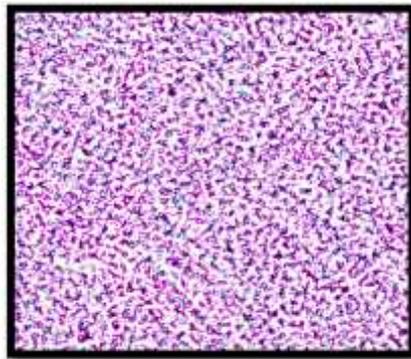
La pureté de la souche halophile extrême S2 étudiée est l'une des exigences qu'il faut prévoir avant de lancer une fermentation. Dans notre travail, l'étude microscopique (méthode direct et rapide) nous a permis de vérifier la pureté de notre souche par une observation à l'état frais suivie d'une coloration de Gram modifiée.

#### Observation à l'état frais :

L'observation directe de la souche halophile extrême S2 sur une lame sous microscope photonique grossissement x40 nous a montré que la souche S2 est immobile.

#### ✓ Coloration de Gram modifié :

Le résultat de la coloration de Gram modifié de la souche S2 observée sous microscope photonique à immersion (figure N3), présente un Gram négatif (-) et de forme cocci avec un arrangement isolé ou en paire. D'après la littérature, tous les membres de la famille des *Halobacteriaceae* sont des bactéries Gram négatif mais leurs formes, regroupements, pigmentation et mobilité changent suivant les espèces (Oren *et al.*, 1995).



**Figure N°3 :** Aspect microscopique de la souche halophile extrême S2 observée par microscope photonique à immersion après coloration de Gram modifiée (originale).

Les résultats obtenus des études macroscopique et microscopique confirment la pureté de la souche halophile extrême S2 (absence de tout autre contamination).

### IV.3. Production de protéase par fermentation liquide

Dans la présente étude nous avons procédé à la fermentation discontinue de la souche halophile extrême S2 dans des earlen Meyer de 250 ml. Avant de procéder à la première étape de

fermentation (préculture), nous avons jugé utile et très important de vérifier la production de la protéase par notre souche étudiée halophile extrême S2.

#### IV.3.1. Test d'activité protéolytique

L'activité protéolytique de la souche halophile extrême S2 a été détectée sur un milieu SH solide additionné de lait écrémé en tant que seule source de carbone. Cette activité a été observée par l'apparition des zones de protéolyse (anneau transparente) autour des colonies (figure N°4).



Témoin négative .



teste positive

**Figure N°4:** Aspect du résultat positif de protéase par la souche halophile extrême S2 sur milieu SH additionné de lait écrémé stérile.

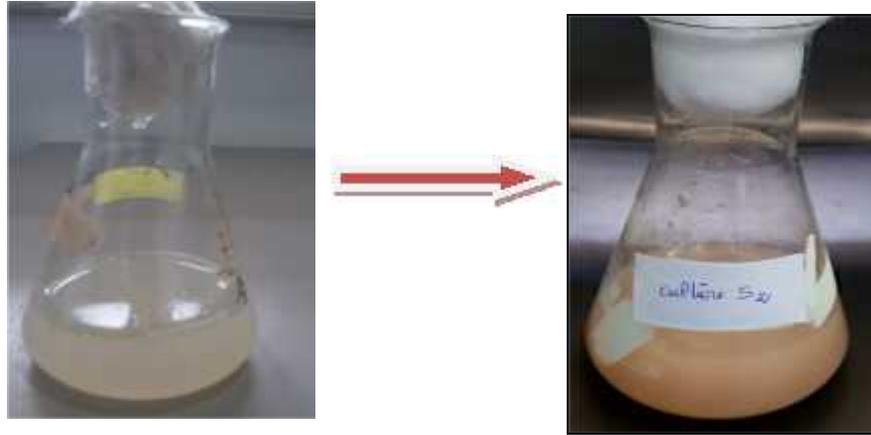
#### IV.3.2. Préparation de préculture pour la souche halophile extrême S2 :

Nous avons préparé une préculture de 100 ml. Cette dernière a été incubée dans les conditions favorables de croissance de notre souche (température 40C°, pH 7, et 120rpm). Après 3 jours d'incubation le milieu SH liquide additionné de lait écrémé vire de jaune clair en rose claire pour la souche halophile extrême S2 ce qui indique une croissance cellulaire. Le milieu de culture SH liquide est additionné de 10 ml de lait écrémé comme inducteur de protéase.

#### IV.3.3. Suivi de la fermentation en batch :

Après revivification et vérification de la pureté de la souche halophile extrême S2, nous avons procédé à l'inoculation des cultures en *Batch* contenant le lait écrémé dans le milieu SH et dès le 2

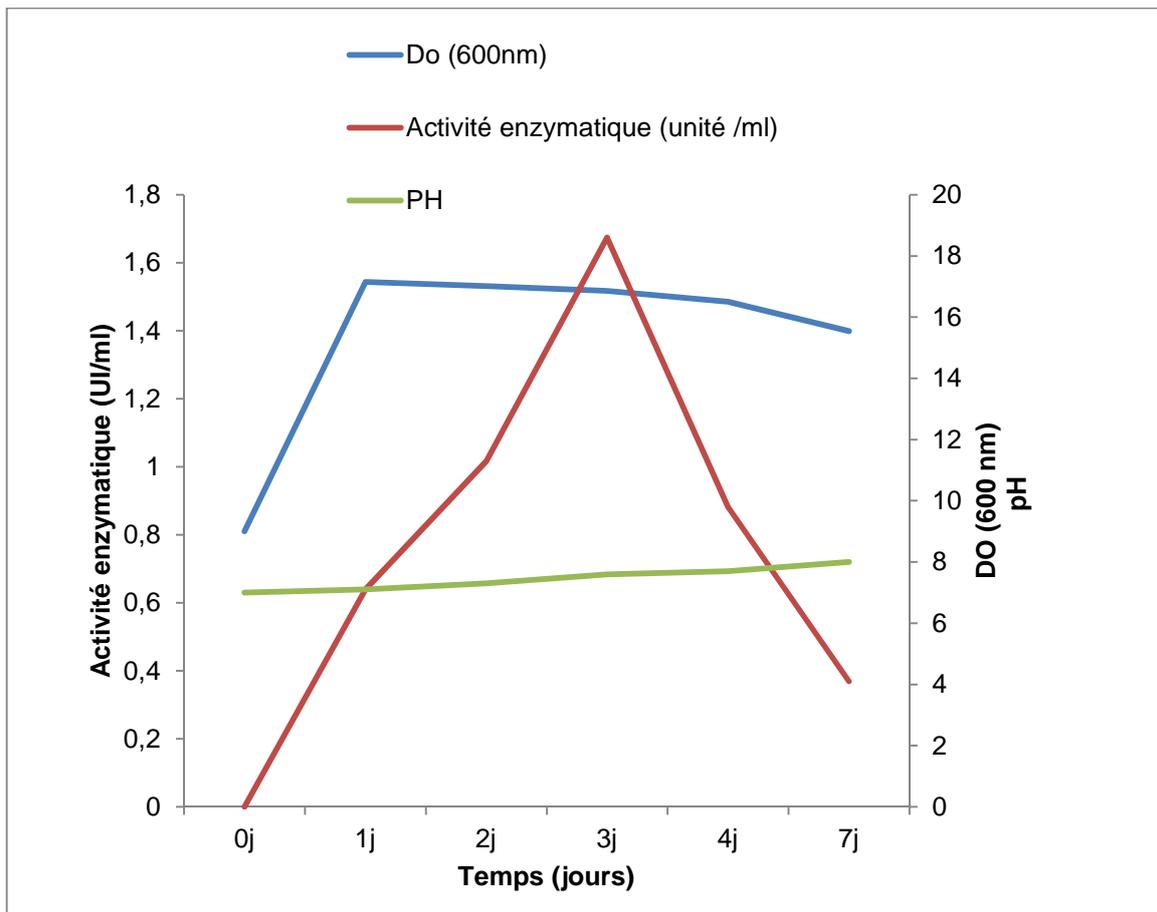
jours d'incubation nous avons constaté l'apparition du trouble bactérien et le début de virage de la couleur du milieu de culture du jaune clair au rose pale (figure N°5 ). La coloration rose pale du moût de fermentation est due à la synthèse de la bactériorhodopsine, par la souche halophile extreme S2 .



**Figure N°5 :** Virage de la couleur du milieu SH additionné de lait écrémé du jaune clair au rose claire après incubation.

Le suivi de l'évolution de la biomasse, pH et l'activité enzymatique en fonction du temps d'incubation à travers les prélèvements journaliers recueillis lors de fermentation, nous ont permis de tracer la courbe représentée dans la figure N°6.

La cinétique de croissance en fonction du temps se traduit par une courbe de croissance classique avec ses quatre phases : de latence, exponentielle, stationnaire et de déclin (Scriban, 1999). La phase de latence dans notre cas est absente et cela est due à l'adaptation de la pré-culture aux constituants de milieu SH additionné de lait écrémé comme seule source de carbone. La souche halophile extrême S2 a synthétisé son équipement enzymatique nécessaire constitué principalement de protéases afin de pouvoir dégrader son substrat et procéder à la division cellulaire.



**Figure N°6** : Suivi de la cinétique de croissance, de production protéique et de pH de la souche halophile extrême S2 sur un milieu SH additionné de lait écrémé à 40°C pendant 7 jours d'incubation.

La cinétique de croissance et de la production de la protéase en fonction du temps (figure N° 6) montre que la souche halophile extrême S2 entre directement dans une phase exponentielle qui a duré 24 h; elle est caractérisée par une croissance rapide où la densité optique atteint une valeur maximale de 1.544. Selon Kebbouche-Ganaet *al.* (2009) la phase exponentielle est assurée par la dégradation du substrat, avec une production de protéase s'amorce au 1<sup>er</sup> jour, puis elle augmente tout au long des phases de croissance exponentielle et stationnaire; elle atteint un pic de 18.6 UI/ml au 3<sup>ème</sup> jour.

La phase stationnaire s'étale du 1<sup>er</sup> au 7<sup>ème</sup> jours et se caractérise par une densité optique presque constante (1,544 à 1,399); celle-ci correspond à l'égalité du nombre des cellules viables et des cellules mortes par autolyse cellulaire. A partir de 3<sup>ème</sup> jours, la production de protéase diminue jusqu'à 4,1 U/ml au 7<sup>ème</sup> jour. Cette diminution pourrait être causée par une limitation des nutriments dans le milieu suite à leur consommation par les microorganismes (Yezza *et al.*, 2005).

Tandis que, le pH était de 7. Durant les premiers jours de fermentation, il augmente jusqu'à une valeur de 8 au septième jour. L'augmentation du pH peut être corrélée avec l'activité de protéolytique qui donne de l'ammoniac dans le milieu qui provoque une hausse de pH (Freire, 1996).

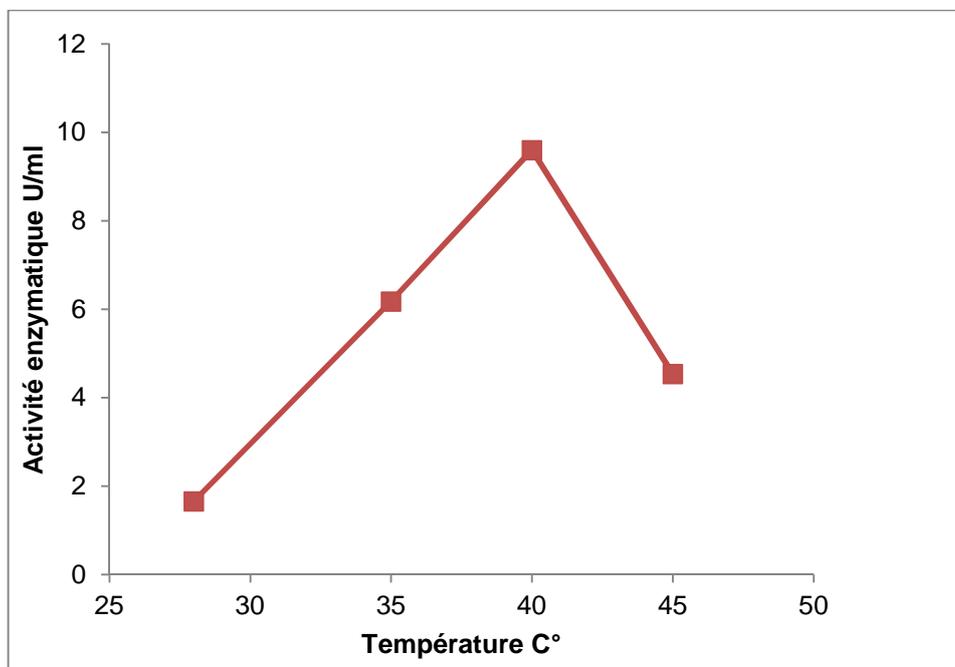
Les travaux de Beg *et al.* (2002) et de Puri *et al.* (2002) suggèrent que la production de protéases diminue lorsque la concentration en nutriments devient limitante. Également, la diminution de l'activité protéolytique pourrait s'expliquer par une désactivation des protéases produites. Selon Chu *et al.* (1992), cette désactivation pourrait être causée par un phénomène d'auto-digestion ou par la digestion des protéases extracellulaires par certaines protéases intracellulaires larguées dans le milieu suite à la lyse cellulaire. Ces résultats indiquent que la production de la protéase est de type associé à la croissance, ce qui prouve que c'est un métabolite primaire (Scriban, 1999).

La production maximale de l'enzyme est observée après 3 j d'incubation ; c'est le temps retenu pour la suite de l'étude.

#### IV.4.Optimisation de la fermentation en batch

##### IV.4.1. Température optimale d'incubation

L'effet de la variation de la température d'incubation sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2 et variation de pH sont représentés dans les figure N°7 et N°8



**Figure N° 7:** Influence de la température d'incubation sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2.

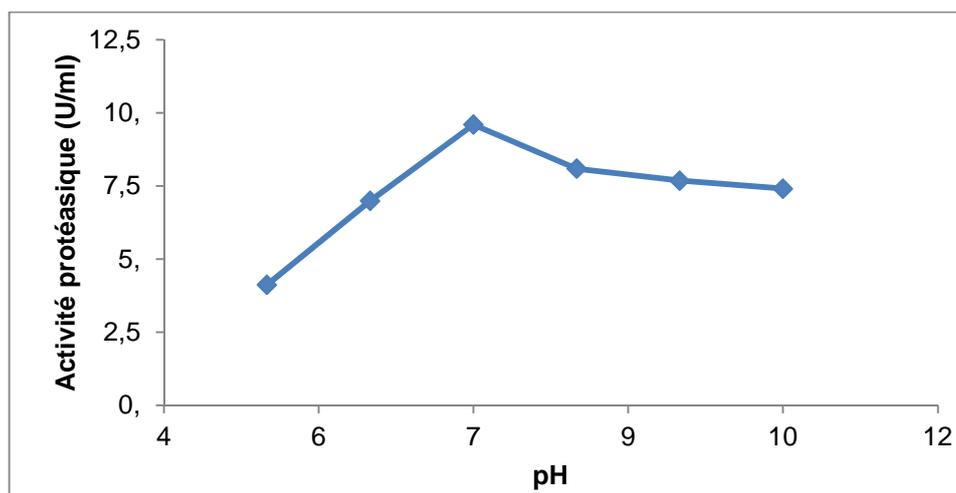
La fermentation réalisée à 40 °C représente l'optimum de la production d'enzyme avec une activité de (9.602 UI/ml); ce qui reflète la nature thermotolérante de l'espèce utilisée. Une production plus faible a été observée à des températures plus basses et plus élevées associées à une moindre production de la biomasse.

Cette température optimale est presque similaire à celle de la protéase produite par *Bacillus* Mk22 qui présente un optimum de température de 45°C (Sekar A.2016). Alors que Rehman R.2016 ont signalés que la production maximale de protéase était à 55°C pour la souche *Bacillus subtilis* KT004404.

Par contre Sharmin et coll (2005) ont signalés un optimum de production de protéase par *Bacillus subtilis* BLK-1.5 de 37 °C.

#### IV.4.2. pH optimal de la production

Des tests similaires à ceux de l'effet de la température ont été réalisés afin de déterminer le pH optimum de l'activité protéolytique. Le profil de pH est présenté dans la figure N°8. Différentes valeurs de pH ont montré un effet différent sur la production de protéase de la souche halophile extrême S2. Un taux maximal de protéase (9.602 UI/ml) a été observé à pH 7. Une baisse de la productivité en enzyme est observée si le niveau de pH est supérieur ou inférieur par rapport à cette valeur.



**Figure N°8 :** Effet du pH initial du milieu SHaddtionné de lait écrémé sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2 à 40°C.

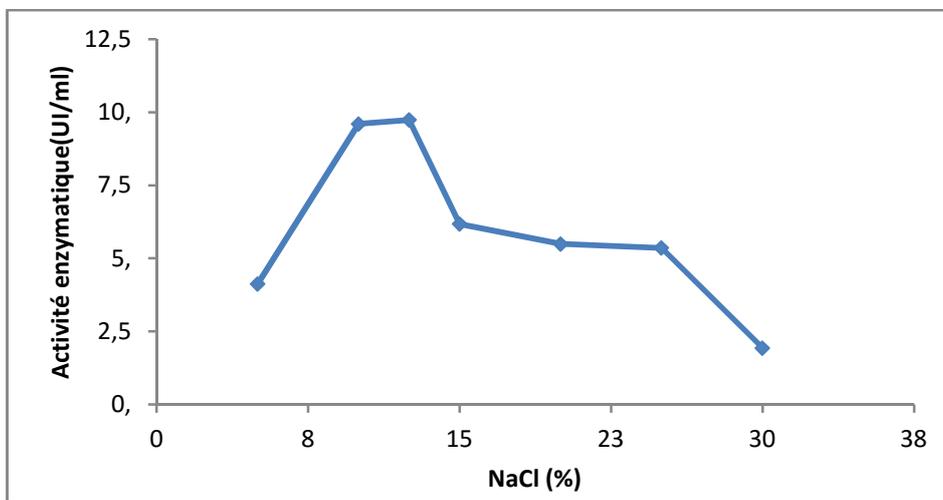
D'après Rehman R.(2016) la souche *Bacillus subtilis* KT004 était capable de croître dans une plage de pH de 5 à 7 et atteint le maximum d'activité à pH 6, alors que *Bacillus* MK22 l'optimum

de production à été signalée à un pH 8. Par contre *Bacillus subtilis* BLK-1.5 présenté un maximum de production à un pH 10 (Ali N. et al., 2016).

#### IV.4.3. Concentration de Na Cl :

A fin d'étudier l'influence de NaCl initial du milieu de culture SH, sur la production de protéase par la souche halophile extrême S2, des fermentations sont conduites à température 40°C et pH 7, et à différentes concentrations de NaCl (5 ; 10 ; 12,5 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30 %).

La figure N° 9 montre que la production de protéase de la souche halophile extrême S2 est maximale a 12.5 % de NaCl. Une baisse de la productivité en enzyme est observer si la concentration de NaCl est supérieur ou inférieur par apport à cette valeur.



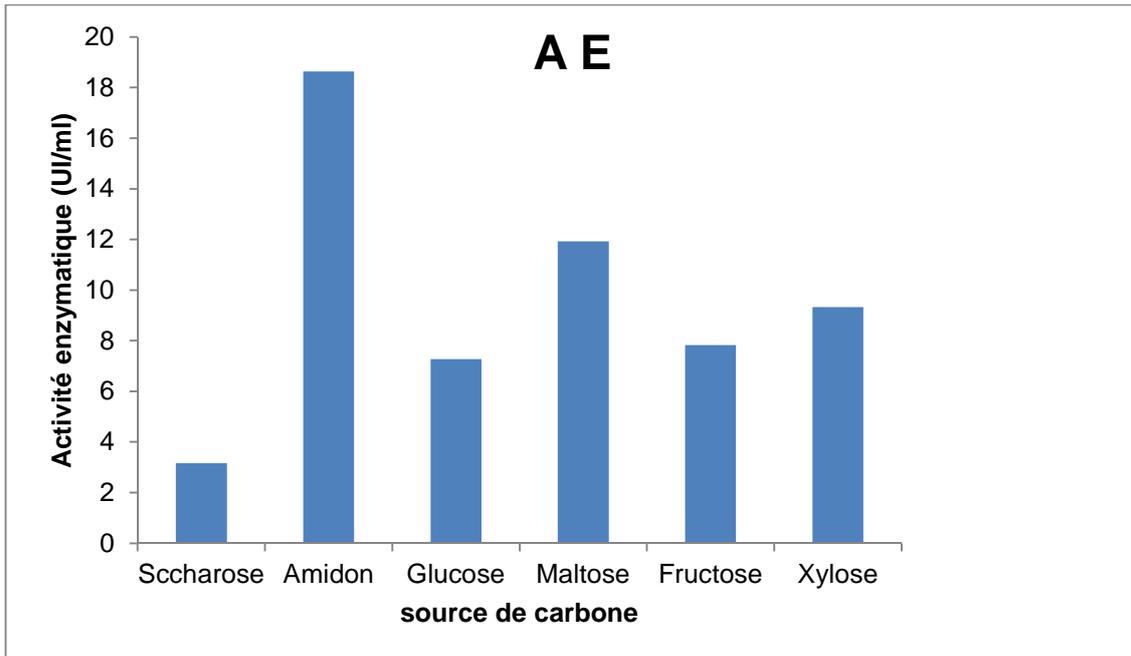
**Figure N°9 :** Effet de NaCl initial du milieu SH additionné de lait écrémé sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2 à 40°C et pH 7.

Des résultats similaires a été obtenu par *Bacillus* MK 22 qui présenter un optimum à 12 % de Na Cl (sekar A. 2016). Par contre Ali N. *et al.*, (2016) ont signalés que l'activité protéasique a été observée à 7 % de Na Cl produite par la souche *Bacillus subtilis* BLK-15.

#### IV.4.4. Source de carbone :

L'influence des sucres comme seul source de carbone, du milieu culture SH additionné de lait écrémé sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2, a été évaluée par l'utilisation de six différents substrats: lait écrémé ,saccharose, amidon, glucose, maltose, fructose et xylose.

Les résultats obtenus dans cette étude sont représenté sous forme d'un histogramme.



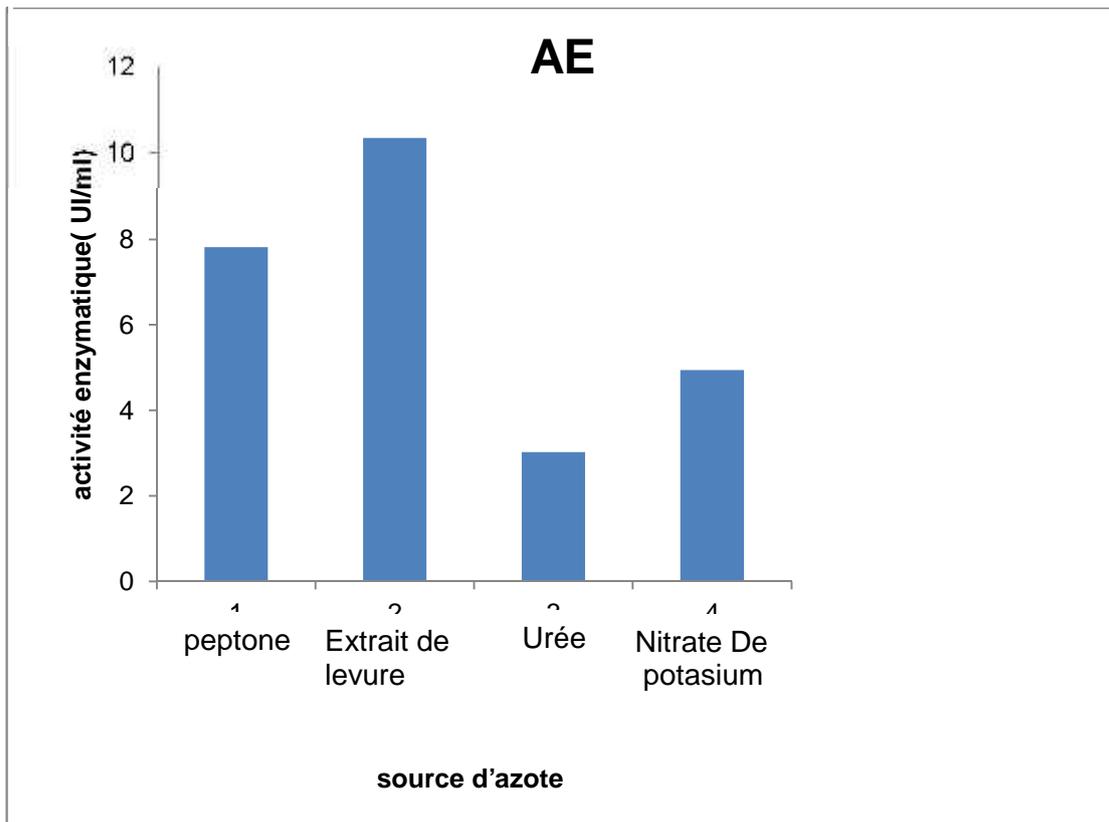
**Figure N°10 :** Effet des différents source de carbone du milieu SH additionné de lait écrémé sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2 à 40°C et pH 7, après 3 jours d'incubation.

Selon la courbe obtenue, nous avons remarqué que le sucre le mieux consommé pour la production de protéés est l'amidon, avec un activité enzymatique égale à 18.643 U/ml. Par contre le saccharose présente une faible activité enzymatique avec 3.164 U/ml par apport aux autres soucres .

D'après kumar *et al.*, (2016) ont signalésque l'activité protéasique produit par la souche *bacillus MK22* est maximale en présence de glucose.

#### IV.4.5. Source d'azote :

Les résultats obtenus dans cette étude sont représenté sous forme d'un histogramme (figure N°11).



**Figure N°11** :Effet des différents source d'azote du milieu SH additionné de lait écrémé sur la production de la protéase de la souche halophile extrême S2 à 40°C et pH 7 ,après 3 jours d'incubation.

Nous avons constaté d'après l'allure de la courbe de production de protéase que la souche halophile extrême S2 consomme faiblement l'urée et le nitrate de potassium mais dans le cas de de l'extrait de levure elle a montré un maximum d'activité avec une valeur de 10.369 U/ml.

D'après kumar *et al.*, (2016) ont signalé que l'activité protéolytique produit par la souche *Bacillus MK22* est maximale en présence de lait écrémé.

Dans l'ensemble des résultats obtenus, on déduit que la meilleure production de l'enzyme protéase de la souche halophile extrême S2 a été obtenue en fermentation en batchs ous les conditions optimales résumé dans le tableau suivant:

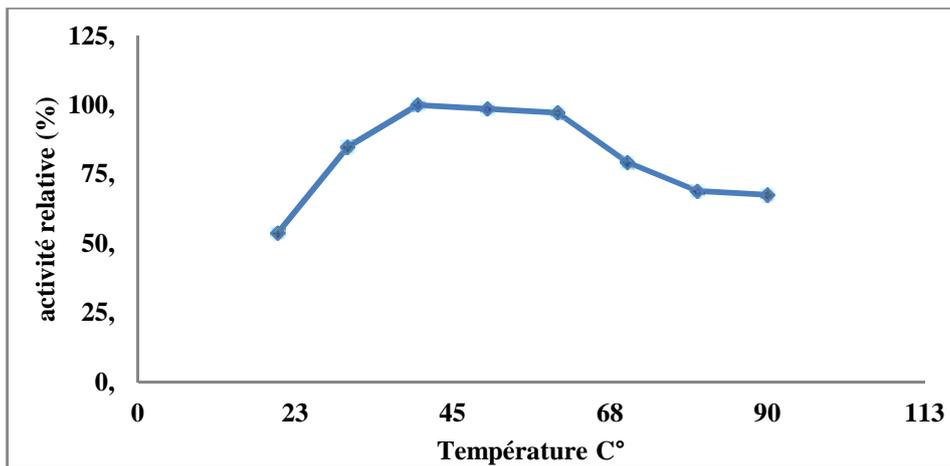
**Tableau N°12:** Les conditions maximales et minimales pour la production de protéase.

<b>Paramètres</b>	<b>Production</b>	<b>Condition</b>	<b>Activité de protéase (U/ml)</b>
<b>Température (C°)</b>	Maximum	40°C	9.602
	Minimum	28°C	1.662
<b>pH</b>	Maximum	7	9.602
	Minimum	5	4.123
<b>Na Cl(%)</b>	Maximum	12.5	9.739
	Minimum	30	1.931
<b>Source de carbone</b>	Maximum	amidon	18.643
	Minimum	Saccharose	3.164
<b>Source d'azote</b>	Maximum	Extrait de levure	10.369
	Minimum	Urée	3.027

## **IV.5. Propriétés physicochimiques de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut**

### **IV.5.1 Effet de la température**

Afin de déterminer la température optimale de l'activité protéolytique, l'extrait enzymatique a été incubé à différentes température variant de 20 à 90 °C pendant 60 minutes, les tests d'activité ont montré que l'extrait enzymatique présente un optimum entre 40 et 60°C avec un maximum d'activité à 40°C , ce qui coïncide avec la température optimale de croissance de la souche S2 . Elle garde 80% de son activité à 70 °C et d'environ 69 % de l'activité maximale à 80 et 90°C par rapport son activité maximale (figure N°12).

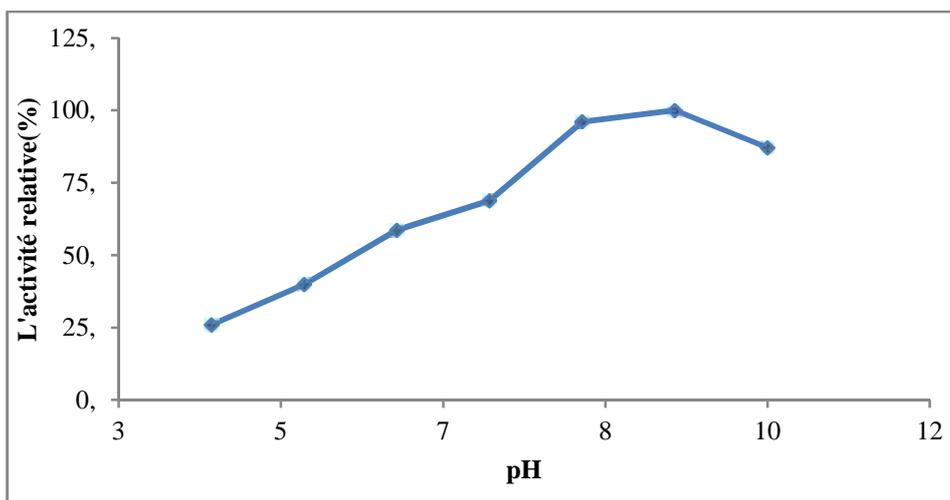


**Figure N° 12 :** Effet de la température sur l'activité protéolytique.

Cette gamme est presque similaire à celle de la protéase produite par *Halobiforma sp. strain BNMIITR* qui présente un optimum de température de 55 °C (Gupta et al., 2015)

#### IV.5.2 Effet de pH

Des tests similaires à celles de l'effet de la température ont été réalisés afin de déterminer l'effet de pH sur l'activité protéasique de notre extrait enzymatique. Le profil de pH est présenté dans la figure N°13. L'activité a été déterminée après pré-incubation de l'extrait enzymatique à 40°C pendant 1 heure et à différentes valeurs de pH allant de 4 à 10.

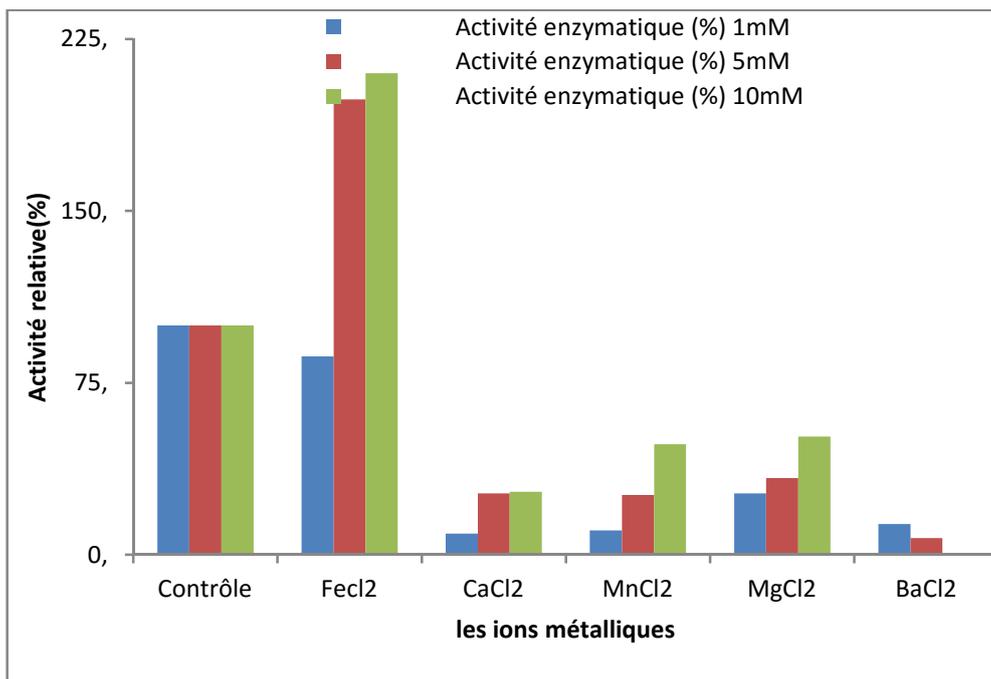


**Figure N° 13 :** Effet du pH sur l'activité protéolytique.

Les résultats indiquent que cette enzyme présente une activité optimale à pH 9.0. Ces données sont en accord avec celles de Gupta et al. (2015), qui ont signalé un maximum d'activité de la protéase extrait à partir de *Halobiforma sp. strain BNMIITR* avec un pH 9.

### IV.5.3 Effet des ions métalliques sur l'activité et la stabilité de l'enzyme:

L'activité enzymatique de la protéase a été étudiée en présence des ions métalliques par rapport au témoin qui ne les contient pas, Ce dernier a été considérée comme 100% d'activité relative. Les résultats obtenus de l'effet des ions métalliques étudiés sur l'activité protéasique de notre extrait enzymatique brut ont été comparés et représentés dans la figure N°14.



**Figure N°14** : Effet des différents ions métalliques sur l'activité protéolytique de la souche halophile extrême S2.

Après incubation des mélanges réactionnels en présence de différentes concentrations d'ions métalliques, les tests d'activité ont montré que l'extrait enzymatique brut présente un maximum d'activité avec 5 mM ou plus de FeCl<sub>2</sub>. L'activité de l'extrait a été améliorée de 198 et 210% quand il été incubé avec 5 et 10 mM du FeCl<sub>2</sub>, respectivement, par rapport à la concentration de 1mM. Par contre l'activité a été significativement influencée, avec des activités relatives réduites de 26,8 %, 10,7 % et 9,3 % après addition de 1mM de Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup> respectivement. La protéase a été complètement inhibée par une concentration de 10 mM en ions Ba<sup>2+</sup>.

La protéase d'*Alkalibacillus sp. NM-Da2* était actif en présence de CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> et FeCl<sub>2</sub> 2 mM, mais l'activité a été inhibée en présence de 5 mM de BaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> et CuCl<sub>2</sub>. Aucune activité

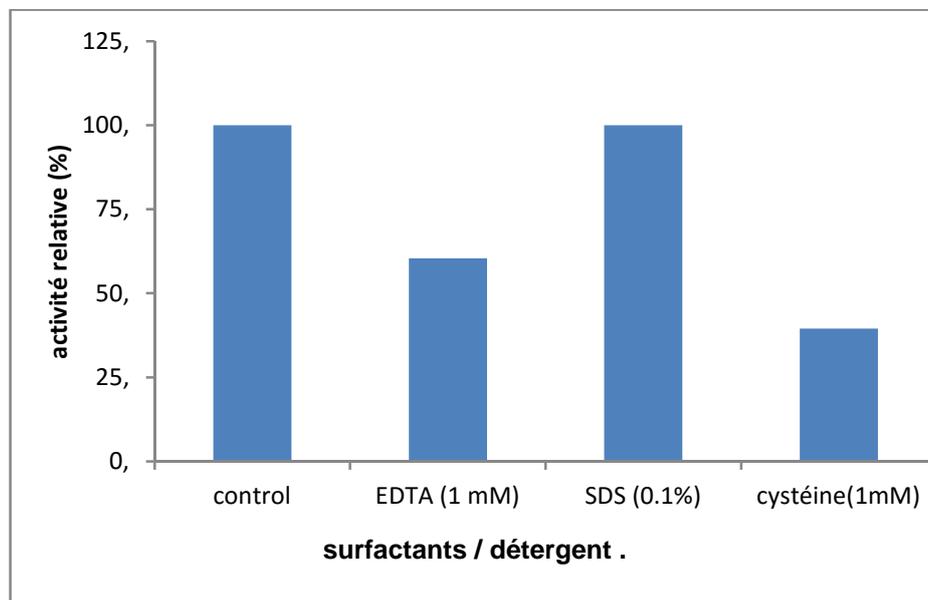
n'a été présentée en présence de HgCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, SrCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub>, CsCl<sub>2</sub> et NH<sub>4</sub>Cl (à la fois 2 et 5 mM) (Asmaa *et al.*, 2016).

kumar *et al.* (2016) ont signalé que Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> peuvent stimuler l'activité de protéase de *Bacillus MK22*. De l'autre côté, les ions de Hg<sup>2+</sup> possèdent un effet inhibiteur. Alors que Rehman *et al.* (2016) démontrent que Ca<sup>2+</sup>, CO<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> et Ni<sup>2+</sup> améliorent l'activité protéolytique, tandis que Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> et en particulier Hg<sup>2+</sup> avait un effet inhibiteur.

L'effet inhibiteur de ces métaux peut être associé à leur pouvoir de liaison aux acides aminés impliqués dans le site catalytique de l'enzyme (Shafiei, *et al.*, 2006) qui sont des acides aminés chargés négativement (deux aspartates et un glutamate).

#### IV.5.4. Effet des surfactants et des détergents sur l'activité enzymatique :

Les résultats obtenus de l'effet de surfactant et détergent sur la protéase de la souche halophile extrême S2 sont comparés à un témoin ne contenant pas l'agent de traitement et a été considéré comme 100% et représenté dans la figure N° 15.



**Figure N°15** : Effet des surfactants et détergents sur l'activité protéolytique.

Dans cette étude, l'ajout de SDS (1Mm) n'a pas modifié l'activité enzymatique relative. Tandis que la cystéine à la concentration de 1mM l'activité est retenue de 60 %. Alors que l'ajout de l'inhibiteur à l'extrait enzymatique à la concentration de 1mM pour EDTA inhibe partiellement

l'activité de l'enzyme. Ceci est en accord avec les travaux de Kumar *et al.* (2016) qui ont observé une légère stimulation de l'activité enzymatique en présence de SDS (103 %) par *Bacillus MK 22*.

#### IV.6. Application de la protéase brute comme ingrédient de détergent à lessive :

La protéase produite par la souche halophile extrême S2 était considérablement stable dans une large gamme de pH et de température et a même montré une bonne compatibilité avec les surfactants commerciaux. Donc, il a été testé comme un additif avec du détergent, pour vérifier la performance de lavage du détergent avec cette protéase additive. Lorsque la préparation de protéase a été combinée avec un détergent commercial, les performances de lavage du détergent ont été améliorées en éliminant la tache de sang et d'ancre du tissu de coton blanc (figure N°16).

Les taches de sang et d'ancre ont été retirées de différents morceaux de tissu de coton en utilisant un détergent avec une extrait enzymatique brute. L'élimination complète de la tache de sang et d'ancre ont été obtenues lorsque le détergent a été utilisé en combinaison avec une protéase brute. D'autre part, le traitement du tissu avec le détergent seul a entraîné une tache pâle de sang et d'ancre, comme le montre la figure N°16. Ces résultats ont démontré la stabilité et la compatibilité de la protéase avec les détergents disponibles dans le commerce. Ces résultats sont conformes à certaines expériences antérieures menées par Rehman *et al.*, (2016), Bezawada *et al.*, (2011) et Tambekar S. et Tambekar D., (2013) qui ont montrés l'efficacité de différentes protéases en tant qu'additifs aux détergents.

	CONTRO L	ARIEL	ARIEL+ ENZ	LE CHAT	LE CHAT+ ENZ	ISIS	ISIS+EN Z
ANCRE (1)							
SANG (2)							

**Figure N16:** Essai d'application de protéase de la souche halophile extrême S2 comme un additif de détergent.

De même, les protéases de *Bacillus subtilis* (Kunamneni *et al.*, 2013) et *Streptomyces fungicidicus* (Ramesh *et al.*, 2009) ont éliminé efficacement les taches de sang des morceaux de coton blanc combinés avec des détergents commerciaux. Bien que les protéases alcalines de *Bacillus spp.* sont stables à haute température et pH alcalin, la plupart sont incompatibles avec les matrices de détergents (Gupta *et al.*, 2002; Saeki *et al.*, 2007). La protéase produite par *Bacillus sp. Mk22* a significativement éliminé les souches de sang, d'encre et de café à 40 ° C (Sekar *et al.*, 2016).

## Conclusion

---

L'objectif de cette étude a été l'optimisation et l'extraction d'une protéase à partir d'une souche halophile extrême S2, ainsi que l'application de la protéase brute comme ingrédient de détergent à lessive. L'optimisation et l'extraction de l'enzyme visé différents paramètres à savoir l'influence de la température, pH, salinité, source de carbone et source d'azote, effet des ions métalliques, des surfactants et détergents sur l'activité catalytique.

La première étape a commencé par une revivification de la souche halophile extrême S2 dans un milieu SH modifié, les colonies obtenues soumises à l'observation macroscopique et microscopique ont révélé que la souche S2 était de forme cocci, immobiles de Gram négative.

La production de la protéase par fermentation liquide a été suivie pendant 7 jours de culture dans un milieu liquide SH additionné de lait écrémé, ce dernier semble être un bon inducteur de production de protéase.

La mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm en fonction de temps d'incubation nous a permis de tracer une courbe de croissance sans une phase de latence Avec production de protéase qui a atteint un maximum au bout de 3 jours de fermentation avec une valeur de 9.602 U/ml. En outre, la production de protéase se trouve associée à la croissance bactérienne, ce qui prouve que c'est un métabolite primaire.

Cette étude nous a permis de constater que l'optimisation de production présente un optimum de température de 40°C, avec une concentration de Na Cl égale à 12.5% avec un pH 7, l'activité de la protéase était élevée en présence de l'amidon comme source de carbone et de l'extrait de levure comme source d'azote.

Cette étude nous a permis de constater que l'extrait enzymatique brut présente un optimum de température de l'activité protéolytique entre 40 et 60°C et une activité optimale à pH 9.0.

L'étude des propriétés physicochimiques de l'extrait enzymatique liée à son activité protéolytique a montré que la protéase issue de la souche halophile extrême S2 a été stimulée par l'ion métallique Fe<sup>2+</sup>, et une diminution de l'activité en présence des sels minéraux CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> et MgCl<sub>2</sub>. Alors qu'une inhibition de l'activité a été noté pour les ions BaCl<sub>2</sub> dans une gamme de concentration allant de 1 à 10 mM.

L'ajout de SDS n'a aucun effet sur l'activité enzymatique relative. Tandis que l'enzyme a été partiellement inhibée en présence d'EDTA, la cysteine présente une activité relative est qui est retenue de 60 %.

Dans cette étude, la protease de la souche halophile extrême S2 est une protéase thermo-alcalostable car elle est stable à pH alcalin et à haute température. La protease thermostable alcaline

## *Conclusion*

---

peut être exploitée dans l'industrie des détergents en tant qu'additif car elle montre une excellente stabilité à large gamme de température et compatibilité avec les détergents commerciaux. Plus important encore, la supplémentation de la préparation enzymatique au détergent a éliminer remarquablement les taches de sang et d'ancre de tissu de coton blanc.

L'originalité des résultats présentés dans ce travail, nous pousse à valoriser encore ces derniers par une détermination de la nature chimique de cette enzyme, une caractérisation moléculaire de la protéase et détermination de son poids moléculaire, ainsi que la caractérisation de sa structure tridimensionnelle par cristallographie ou *in silico*

## A

Aguilar C.N., Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán P.A., Rodríguez-Herrera R., Martínez-Hernandez J.L et Contreras-Esquivel J.C., 2008. Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American J. Biochem. Biotechnol.* 4(4). 354-366.

Ali N., Nimat U., Muhammad Q., Hazir R., Shahid N. K., Abdul S et Muhammad A., 2016. Molecular characterization and growth optimization of halo-tolerant protease producing *Bacillus Subtilis* Strain BLK-1.5 isolated from salt mines of Karak, Pakistan. *Extremophiles.* 20. 395- 402.

Asmaa R., Abdel-Hamed., Dina M., Abo-Elmatty et Juergen W., 2016. Biochemical characterization of a halophilic, alkalithermophilic protease from *Alkalibacillus* sp. 885-894.

Aygan A., Arikan B., Korkmaz H., Dinçer S et Çolak Ö., 2008. Highly thermostable and alkaline -amylase from a halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Brazilian Journal of Microbiology.* 39. 547-553.

## B

Beg Q.K., Saxena R.K. et Gupta G., 2002. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. *Process Biochemistry.* 37. 1103-1109.

Bezawada J., Yan S., John R.P., Tyagi R et Surampalli R., 2011. Recovery of *Bacillus licheniformis* alkaline protease from supernatant of fermented wastewater sludge using ultrafiltration and its characterization. *Biotechnology research international.*

Boudabous A ., 2008. Ability of moderately halophilic bacteria to control grey mould disease on tomato fruits. *Journal of Phytopathology.* 156. 42–52.

Bursy J., Kuhlmann A.U., Pittelkow M., Hartmann H., Jebbar M., Pierik A.J. et Bremer E., 2008. Synthesis and uptake of the compatible solute ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. *Applied and Environmental Microbiology.* 74. 7286-7296.

## C

Chu L.M., LEE C et LI T.S., 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbiological Technology*. 14. 755-761.

## D

Dassamrma S et Arora P., 2001. *Encyclopaedia of life science*. Nature Publishing Group. London. Halophiles. 1-9.

De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K.H et Whitman W.B., 2009. *Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edition., Volume Three, The Firmicutes. Springer, New York, USA.

Djekrif-Dakhmoche S., Gheribi-Aoulini Z., Meraihi Z et Bennamoun L., 2006. Application of statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*. 73. 190-197.

Drouin M., 2005. Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître en sciences (M. Sc.). Université du Québec. 142.

Dussault H.P., 1955. An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of Bacteriology*. 70. 484-485.

## F

Freire D. M. G., 1996. PhD thesis, PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil.

## G

Ghanem A., 2007. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/ enriched compounds. *Tetrahedron*. 63(8). 1721-1754.

Grant W. D., Kamekura M., McGenity T. J et Ventosa A., 2001. Order I. Halobacteriales Grant and Larsen, A989b, 495vp ( effective Publication: Grant and Larsen, 1989 a, 2216 ). *In Bergy's Manual of Systematic bacteriology*, 2<sup>nd</sup> end, vol, 1,. Edited by D. R. Boone et R. D. Castenholly. New. York : Springer.299.

Gupta M., Aggarwal S., Navani N. K. et Choudhury B., 2015. Isolation and characterization of a protease-producing novel haloalkaliphilic bacterium *Halobiforma* sp. strain BNMIITR from Sambhar lake in Rajasthan, India. *Ann Microbiol*. 65. 677–68.

Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V et Chauhan B., 2003. Microbial -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem*. 38. 1599-1616.

## H

Hajji M., Kanoun S., Nasri M et Gharsallah N., 2007. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Proc. Biochem*. 42. 791–797

Hameed A., Keshavarz t. et Evans C., 1999. Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *Journal of Chemical technology and Biotechnology*.74. 5-8.

## J

Joshi R.H., Dodia S et Singh S.P., 2008. Production and optimization of a commercially viable alkaline protease from a haloalkaliphilic bacterium. Thèse de Doctorat. Université de Rajkot 13.552–559.

## K

Kalmen Z., 2000. DNA replication in the third domain (of life ) Cur protein Sci. 1. 139-154.

Karbalaei-Heidari H.R., Amoozegar M.A. et Ziaee A.A., 2009. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 36. 21- 27.

Kebbouche-Gana., Khemili S. Fazouane-Naimi., Bouanane N.A. Penninckx M et Hacène H., 2009. Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. Journal of industrial microbiology and biotechnology. 727-738.

Kiss papoo T et Oren A., 2000. Halocins can they involved in the Competition between halobacteria, in Saltern. Ponde *Extremophiles*. 4. 35-41.

Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G et Sekaran G., 2008b. Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. Bioresour. Technol. 99. 2364–2372.

Kunamneni A., Poluri E et Davuluri SP., 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *B. subtilis* PE-11. AAPS Pharm SciTech. 4 (4). 56.

## L

Lapent J.P., 2000. Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens. Edition Techniques et Documentation. 28.

Leclerc H.J. , Gaillard L et M. Simonet., 1984. Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Dion. Ed, paris. 392-399.

Leisola M., Jokela J., Pastinen O et Turunen O., 2001. Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc. Eng.*, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.

## M

Ma L et Zhang N., 2010. Measurement of outflow rate and degradation from rumen of commonly used feeds for roe deer. *J. Jilin Agricultural University*. 32 (1). 95-99

Margesin R et Schinner F., 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 56. 563–650.

Matsubara T., Iida-Tanaka M., Kamekura N., Moldoveanu I., Ishizuka H., Onishi A., Hayashi et M. Kates ., 1994. Polar lipids of a non-alkaliphilic extremely halophilic archaeobacterium strain 172, A novel bisulfated glycolipid. *Biochim. Biophys. Acta*. 1214. 97-108.

## O

Om P et Nivedita J., 2010. « alpha amylase : an ideal representative of thermostable enzyme ». , *Appl Biochem ed*. 2401-2414.

Oren A., 2002a. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 28. 56–63.

Oren A., Gurevich P., Gemmell R.T et Teske A., 1995. *Halobaculum gomorrense* gen.nov., sp. Nov. a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 45. 747-754.

## P

Pelmont J., 1995. bactéries de l'environnement ,adaptation physiologique . Ed .press universitaire de gernoble. 633-668.

Prescott I., Harley J.P. et Klein D.A., 1995. Microbiologie, 2e Édition. DeBoeck-Wesmael, Bruxelles, Belgique. 1014.

Prescott M. J. Harley P et Klein D. A., 2003. <<Biologie. 2ème Edition.>> Boeck Université, Paris. 493-1015.

Puri S., Beg Q.K et Gupta R., 2002. Optimisation of alkaline protease production from *Bacillus sp.* by response surface methodology. CUITent Microbiology. 44. 286-290.

## R

Ramesh S, Rajesh M, Mathivanan N., 2009. Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicides* MML1614. Bioprocess Biosyst Eng. 32.791-800.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S et Deshpande V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62. 597–635.

Rehman R., Ahemd M., Siddique A., Hasan F., Hameed A et Jamal A., 2016. Catalytic Role of Thermostable Metalloproteases from *Bacillus subtilis* KT004404 as Dehairing and Destaining Agent. Appl Biochem Biotechnol.

Rohban R., Amoozegar M.A., Ventosa A., 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. Ind Microbiol Biotechnol. 36. 333-340.

## S

Saeki K., Ozaki K et Kobayashi T., 2007. Ito S. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *J Biosci Bioeng.* 103. 501-8.

Scriban R., 1999. *Biotechnologie. 5ème édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris.* 149-159.

Sekar A., Mayavu P et Keun K., 2016. Halophile isolation to produce halophilic protease, protease production and testing crude protease as a detergent ingredient . *10(36).* 1540-1547.

Setati M.E., 2010. Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *Afr J Biotechnol.* 9 (11). 1555-1560.

Shafiei M., Ziaee A-A., Amoozegar M.A., 2006. Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic  $\alpha$ -amylase from a moderately halophilic bacterium, *Nesterenkonia* sp. strain F. *Process Biochemistry* . 1-36. 694-699.

Sharmin S., Hossain M.T et Anwar M.N., 2005. Isolation and characterization of a protease producing bacteria *Bacillus amovivorus* and optimization of some factors of culture condition for protease production. *J Biol Sci* 5.358–362

Sumantha A., Larroche C et Pandey A., 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol. Biotechnol.* 244. 211–220.

## T

Tambekar S et Tambekar, D., 2013. Compatibility and wash performance analysis of alkaline protease from *Bacillus pseudofirmus* (JQ337958) with commercial detergents. *International Journal of Pharmaceutical, chemical and biological sciences.*

Thumar J.T et Singh S.P., 2009. Organic solvent tolerance of an alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36. 211–218.

## V

Vikram H.R., Megha K., Purohit et Satya P.S., 2016. Extracellular proteases from Halophilic and Haloalkaliphilic Bacteria: Occurrence and Biochemical Properties. 422-449.

## W

Wang X., Yu X., Xu Y., 2009. Enzyme Microb. Technol. 45- 94.

## Y

Yezza A., Tyagi R.D., Valéro J.R et Suramp Alli R.Y., 2005. Protease synthesis and entomotoxicity potency in *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using sludge as a raw material. Article soumis pour publication à: Enzyme and Microbial Technology.

## Annexes

---

### Annexe I

#### Annexe II: Matériel non biologiques

**Tableau N3** : La liste des équipements ainsi que le matériel utilisés dans la réalisation de ce travail est présentée dans le tableau suivant :

Appareillages et équipements	Verreries et différents matériel	Solutions et réactifs
Agitateur-Plaque chauffante	Bécher de 5ml, 25ml, 50ml, 1000ml	Eau distillée.
Autoclave	Boite de pétri en Plastique	L'acide acétique à 2%
Bain- marie thermostaté	Eprouvette graduée	Solution de HCL
Balance électronique	Erlenmeyer de 100ml, 200ml, 500ml, 1000ml	Solution de NaOH
Bec Bensen	Firole jaugée 100ml,1000ml	Eau physiologique.
Etuve	Flacons	Tampon tris-Hcl
Hotte bactériologique	Lames et lamelles	Fhusine
Incubateur-agitateur	Papier aluminium	TCA (trichloracétique acide )
Microscope photonique	Pincés (à bois et métallique)	Huile à immersion
pH mètre	Pipette pasteur	—

## Annexes

---

Réfrigérateur	Micropipettes.	-
Spectrophotomètre	Tubes à essai	-
Vortex	Verre à montre	-
-	Spatule	-

## Annexes

---

## Résumé :

Dans le présent document, une souche archéenne halophile *S2* appartenant à la famille des halobacteriaceae, isolée à partir d'une sebkha algérienne, a produit de grandes quantités de protéase alcaline et thermostable.

La production de protéase débute lorsque la cellule bactérienne est en phase de croissance exponentielle et stationnaire avec une activité maximale au bout de 3 jours avec un optimum de température de 40°C, une concentration de Na Cl égale à 12.5% et un pH 7.L'activité protéasique était élevée en présence de l'amidon et d'extrait de levure comme source de carbone et d'azote respectivement.

Les protéases produites par la souche halophile extrême *S2* sont stables sur une large gamme de pH et de température avec un optimum de 9 et 40°C respectivement, plus actives en présence d'ions Fe<sup>2+</sup> et de SDS (1Mm), et démontrent une excellente compatibilité avec les différentes préparations commerciales de détergent testées. Les protéases ont donc été utilisées comme additifs aux détergents, afin d'évaluer leur capacité à augmenter leur pouvoir détachant. L'ajout d'enzymes dans le détergent (ARIEL, LE CHAT et ISIS) permet d'augmenter significativement le pouvoir du détergent à détacher les tâches de sang et d'ancre. Dans l'ensemble, la protéase produite par la souche halophile extrême *S2* a affiché un certain nombre de propriétés attrayantes qui en font un candidat prometteur pour les applications futures en tant qu'additif dans les formulations de détergents.

**Mots clé:** halophile extrême, Halobacteriaceae, protéase, détergent.

## Abstract:

In the present document, a halophilic *S2* archean strain belonging to the halobacteriaceae family, isolated from an Algerian sebkha, produced large amounts of alkaline and thermostable protease.

The production of protease begins when the bacterial cell is in an exponential and stationary growth phase with maximum activity after 3 days with a temperature optimum of 40 ° C., a concentration of Na Cl equal to 12.5% and a pH of 7.L The protease activity was high in the presence of starch and yeast extract as a source of carbon and nitrogen respectively.

The proteases produced by the *S2* extreme halophilic strain are stable over a wide range of pH and temperature with an optimum of 9 and 40 ° C respectively, which are more active in the presence of Fe<sup>2+</sup> and SDS ions (1Mm), and demonstrate Excellent compatibility with the various commercial detergent preparations tested.

The proteases were therefore used as detergent additives in order to evaluate their ability to increase their stain-removing power. The addition of enzymes to the detergent (ARIEL, LE CHAT and ISIS) significantly increases the detergent's ability to detach blood and anchor stains

Overall, the protease produced by the *S2* extreme halophilic strain has displayed a number of attractive properties which make it a promising candidate for future applications as an additive in detergent formulations.

**Key words:** extreme halophilic, Halobacteriaceae, protease, detergent.

## المخلص :

هذه الوثيقة، الأركيا *S2* البكتيريا جزائرية. تنتج كمية كبيرة البروتياز . البروتياز  
البروتياز البكتيرية 3 أيام.  
باز يعتمد التالية: 40 تركيز كلوريد الصوديوم يعادل 12,5% , 7 ,  
البروتياز *S2* الخميرة للتتروجين. 40  
البروتياز التجارية. 9, ايونات Fe<sup>2+</sup> (SDS(mM1), يظهر  
البروتياز , لتقيم قدرتها .  
الإنزيمات (EL ATHC , LIERA ISIS) يمكن تزيد كبير  
البروتياز تنتجه *S2* يتميز منه للتطبيقات المستقبلية تركيبات  
الكلمات المفتاحية: أليف , البكتريا المملحة, البروتياز, .