

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAID-TLEMCEN

Institut de Biologie

Thèse

*pour l'Obtention du Diplôme de Magister en Biologie
moléculaire et cellulaire.*

Thème

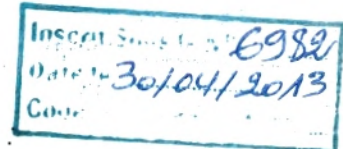
Optimisation de facteurs de production des exoprotéases chez
Bacillus cultivé sur un milieu à base de Corn steep liquor :
Utilisation des plans expérimentaux

Présenté par :

M^r LAKHAL ABDELHAFID.

Soutenu le

devant



Président :	M ^r . CHAABANE SARI, D.	maitre de conférence
Promoteur	M ^r . ABDELOUAHID, D. E.	chargé de cours
Examineurs :	M ^{me} . AOUAR, A.	maitre de conférence
	M ^r . BENSOLTANE, A.	maitre de conférence
	M ^r . BOUCHERIT, K.	chargé de cours

Sommaire

Chapitre 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 1

1. Introduction	1
2. Données taxonomiques	3
2. 1. Famille des Bacillaceae.....	3
2. 2. Problématique de la phylogénie du genre Bacillus	4
3. Aspects généraux de la production de protéases extracellulaires	6
3. 1. Critères de choix.....	6
3. 2. Isolement des souches.....	7
3. 3. Effet des facteurs de production.....	7
3. 3. 1. Effets de la composition du milieu de culture.....	7
3. 3. 2. Effets des conditions de culture	8
4. La synthèse des protéases	9
4. 1. Régulation de la sporulation.....	9
4. 2. Relation entre la synthèse de protéase et la sporulation	10
4. 3. Régulation de la synthèse des protéases	10
5. Extraction et purification	11

Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES..... 14

Problématique et plan de travail.....	14
1. Méthodes microbiologiques.....	15
1. 1. Origines et codifications	15
1. 2. Sources et techniques d'isolement.....	15
1. 2. 1. Sélection par thermisation.....	15
1. 2. 2. Ensemencement et lecture.....	15
1. 2. 3. Purification et identification au genre.....	16
1. 3. Estimation du pouvoir protéolytique	17

1. 4. Sélection des souches non pathogènes	17
1. 5. Identification à l'espèce des souches sélectionnées	17
1. 5. 1. Description morphologique	17
1. 5. 2. Tests biochimiques et physiologiques	18
1. 6. La stabilité de production.....	19
1. 7. Culture mixte.....	19
1. 8. Essai préliminaire de culture et de production sur le corn steep liquor	20
2. Méthodes analytiques	21
2. 1. Courbe de croissance	21
2. 2. Dosage des protéines totales	21
2. 3. Déroulement de la réaction enzymatique.....	21
2. 4. Dosage de la tyrosine.....	22
2. 5. Effet de la nature de la source d'azote.....	23
2. 6. Les caractères du système protéolytique de la souche T ₂₃	23
2. 6. 1. Influence de la température sur l'activité enzymatique.....	23
2. 6. 2. Influence de la température sur la stabilité de l'activité du système.....	23
2. 6. 3. Influence du pH sur l'activité du système protéolytique	23
2. 6. 4. Influence du pH sur la stabilité de l'activité du système protéolytique .	23
2. 6. 5. Effet de l'EDTA	24
2. 7. Essai de purification	24
3. Méthodes statistiques.....	24
3. 1. Matrice d'expériences de Plackett et Burman.....	24
3. 2. Calcul statistique	27
3. 3. Analyse de variance	28
3. 4. Le test de la plus petite différence significative.....	31
3. 5. Comparaison par la méthode de la plus petite différence significative (PPDS)	31

1. L'isolement des souches	33
1. 1. La sélection par thermisation	34
1. 2. Purification et identification au genre	34
2. Détermination du pouvoir protéolytique.....	35
2. 1. Sélection des souches non pathogènes	40
2. 2. Classification des souches actives	41
2. 3. Identification à l'espèce	43
2. 3. 1. Description morphologique.....	43
2. 3. 2. Tests biochimiques et physiologiques	44
3. Stabilité de production	50
4. Résultats des cultures mixtes	52
5. Essai préliminaire	53
6. Sélection des facteurs contrôlés	54
6. 1. Effet de la composition du milieu de culture	55
6. 1. 1. Effet de la quantité de matière sèche du corn steep liquor	55
6. 1. 2. Effet de l'amidon sur la production du système protéolytique	56
6. 1. 3. Effet des ions phosphates.....	56
6. 1. 4. Effet des sels sur la production du système protéolytique.....	56
6. 2. Effet des conditions de culture.....	57
6. 2. 1. Effet de la température.....	57
6. 2. 2. L'effet du pH initial	58
6. 3. Effet spécifique des sels.....	58
7. Optimisation des facteurs influençant la production	60
8. Effet de la source d'azote sur la production du système protéolytique.....	64
9. Cinétique de production et courbe de croissance.....	66
10. Caractéristiques du système protéolytique <i>Bacillus licheniformis</i> T ₂₃	67
10. 1. Effet de la température sur l'activité du système protéolytique.....	67
10. 2. Effet de la température sur la stabilité du système protéolytique	69
10. 3. Effet du pH sur l'activité du système protéolytique de <i>Bacillus licheniformis</i> T ₂₃	70

10. 4. Influence du pH sur la stabilité du système protéolytique.....	72
10. 5. Effet de l'EDTA	73
11. Purification par précipitation.....	73
<hr/> <hr/>	
Conclusion générale	76
<hr/> <hr/>	
Bibliographie.....	79
<hr/> <hr/>	
Annexes.....	92
<hr/> <hr/>	

Revue bibliographique

1. Introduction :

La sécurité relative à l'utilisation des protéases extracellulaires est un critère primordial pour leur exploitation dans différents secteurs de biotechnologie (**Chandrasekan et Dhar, 1982; Pero et Sloma, 1993**).

A l'exception de *Bacillus anthracis*, pathogène pour certains animaux et certaines espèces comme *Bacillus Thuringiensis*, *Bacillus larvae*, *Bacillus popilliae* et *Bacillus sphaericus* qui sont pathogènes pour les insectes; seulement certaines espèces de *Bacillus cereus* peuvent provoquer des gastro-entérites (**Brafoed, 1981**), sinon, le reste des espèces sont saprophytes et ne produisent pas de toxines (**Ward, 1983**).

Les études fondamentales qui s'intéressaient le plus souvent aux phénomènes de la sporulation (**Losick, 1973; Brevet, 1973; Chambliss et al., 1973**) et la relation qui peut exister entre ce phénomène et la sécrétion de ces protéases (**Brafoed, 1981; Ward, 1983; Doi, 1991; Sietske de Boer et Diderchsen, 1991; Pero et Sloma, 1993**); ainsi qu'à la régulation d'une façon générale étaient prédominantes, ceci revient au fait que ce genre contient un grand nombre de microorganismes remarquablement hétérogènes et produisant une variété d'enzymes extracellulaires (**Priest, 1977; Claus et Berkely, 1986**).

Par conséquent ces microorganismes montrent une diversité d'habilité physiologique (**Wolf et Barker, 1968; Priest et Grigorova, 1990**). Ils cultivent bien et parfois sous des conditions extrêmes de pH et de température (**Priest, 1981**).

Leurs protéases extracellulaires sont facilement récupérables et purifiables, (**Fogarty et al., 1974**); pour être utilisées dans la panification et l'attendrissement de la viande (**Turgeon et al., 1991**), dans la fabrication fromagère comme substituants de la présure (**Mc Kellar et Nichols-Nelson, 1984; El Mayda et al., 1986; Lopez-Frandino et al., 1991; Castro et al., 1993**). Leurs domaines d'utilisation ne cessent de se diversifier et de s'élargir.

Par ailleurs, l'équipe de **Fijuwara, (1989, 1991)** a réussi un processus industriel utilisant les protéases de *Bacillus* pour la récupération de l'argent des films photographiques usés.

L'adoption d'une méthode d'amélioration, pour l'optimisation des facteurs de production de ces protéases se révèle, dans chaque cas, nécessaire. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail.

2. Données taxonomiques :

2. 1. Famille des *Bacillaceae* :

La famille des *Bacillaceae* se distingue par un caractère taxonomique qui est la formation de l'endospore, mais des mutants non sporogènes sont trouvés dans les laboratoires; apparemment ils ne survivent pas longtemps dans la nature (Sneath, 1986).

Priest et Grigorova (1990) en se basant sur leurs formes, les classent en trois groupes :

I. Cellules bacillaires :

I. 1. *Aérobies*, catalase positive

Genre 1 : *Bacillus*.

I. 2. *Microaérophiles*, catalase négative

Genre 2 : *Sporolactobacillus*.

I. 3. *Anaérobies strictes*

I. 3. 1. Sulfate non réduit en sulfite

Genre 3 : *Clostridium*.

I. 3. 2. Sulfate réduit en sulfite

Genre 4 : *Désulfatamaculum*.

II. Cellules sphériques en amas.

Aérobies

Genre 5 : *Sporosarcina*.

III. Formation de mycelium

Genre 6 : *Thermotinomycès*.

2. 2. Problématique de la phylogénie du genre *Bacillus* :

Le genre *Bacillus* est à présent défini comme un ensemble de bactéries en forme de bâtonnets, Gram positive, ou positive seulement au début de leur croissance, sporulant en aérobiose en produisant une catalase (**Claus et Berkely, 1986**); critères qui les différencient du genre *Clostridium* (**Sneath, 1986; Claus et Berkely, 1986**).

Selon la morphologie de la spore et de sa disposition au sein de la cellule, le genre est divisé en trois groupes (tableau 1).

Tableau 1 : Classification selon la morphologie de la spore et de sa disposition au sein de la cellule (**Gordon et al., 1973**).

Groupes	Forme et disposition de la spore
Groupe I	Spore ovoïde ou cylindrique non déformante à paroi mince centrale ou subterminale.
Groupe II	Spore généralement ovoïde déformante (sporange gonflé) à paroi épaisse centrale a subterminale.
Groupe III	Spore cylindrique déformante terminale a subterminale.

L'identification des espèces est délicate du fait de la variabilité bien connue de ce genre. Il est parfois difficile de faire la différence entre les espèces du groupe I et celles du groupe II. Conséquence: de nombreux tests seront souvent nécessaires pour pouvoir donner un nom d'espèce (**Sneath, 1986**).

Welker et Campell (1967), avaient déjà affirmé sur la base de la morphologie seulement, que des souches de *Bacillus amyloliquefaciens* ne sont en réalité que des souches de *Bacillus subtilis*. Ces deux espèces sont actuellement différenciées par des techniques chromatographiques ou par les API test (**Priest, 1981**).

L'incohérence phénotypiques et la diversité en base d'ADN accroissent l'hétérogénéité de ce genre (**Willemsse Collinet et al., 1981; Bulla et Hoch, 1985**).

Dans ce contexte, **Clausen et al., (1985)** en analysant les séquences de l'ARNr-16s de certaines espèces de *Bacillus* révèlent l'existence de trois groupes :

- Le premier est centré au tour de *Bacillus subtilis*.
- Le second est constitué de *Bacillus pasteurii*, de *Saprosarcinia ureae* et d'autres espèces.
- Le troisième est centré autour de *Bacillus stéarothermophilus*.

Plus récemment **Ash et al., (1991)** ont étudié la relation qui peut exister entre plus de 50 espèces, ceci en comparant des sous-unités de la séquence de l'ARNr-16s de chaque espèce. Ils révèlent l'existence de cinq groupes génétiques divisés sur la base de l'analyse de la distance matricielle, le **tableau 2** illustre leurs résultats qui réaffirment cette hétérogénéité.

Tableau 2 : Classement selon la base de l'analyse de l'ARNr 16s Ash et al., (1991).

Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5	Non Groupés
B. acidoterrestris	B. fusiformis	B. alvei	B. brevis	B. kaustophilus	B. alcalophilus
B. amyloliquefaciens	B. globisporus	B. amyloliticus	B. laterosporus	B. stearothermophilus	B. aneurinolyticus
B. anthracis	B. insolitus	B. azotofixans		B. thermogluco-	B. cycloheptanicus
B. atrophaeus	B. pasteurii	B. gordonae		sidasius	Lsp. inulinus
B. azotoformans	B. psychrophilus	B. larveae			
B. badius	B. sphaericus	B. macerans			
B. benzoovorans	S. ureae	B. macquariensis			
B. cereus		B. pabuli			
B. circulans		B. polymexa			
B. coagulans		B. pulvifaciens			
B. fastidiosus					
B. firmus					
B. lautus					
B. lentimorbus					
B. lentis					
B. lecheniformis					
B. marrocanus					
B. medusa					
B. mycoides					
B. ponthothenticus					
B. popilliae					
B. psychrosaccharo- lyticus					
B. simplex					
B. Smithii					
B. subtilis					
B. thuringiensis					

Ces mêmes auteurs préconisent pour des raisons pratiques la nécessité de l'intégration de l'utilisation des caractères phylogénétiques et phénotypiques.

3. Aspects généraux de la production de protéases extracellulaires :

3. 1. Critères de choix :

Les souches sélectionnées pour des fins industrielles, doivent être non pathogènes et il est souhaitable qu'elles ne produisent pas des substances telles que les antibiotiques et les toxines (Ward, 1983).

Elles doivent pousser et produire l'enzyme rapidement et avec un niveau élevé (**Bulla et Hoch, 1985**). Et ne doivent pas synthétiser certains métabolites indésirables (exemple : certains polymères) qui rendent la récupération de l'enzyme difficile (**Brafoed, 1981; Ward, 1983**). La spécificité d'action, la stabilité et l'activité sous des conditions extrêmes sont toujours recherchées.

3. 2. Isolement des souches :

L'isolement se fait par des méthodes microbiologiques conventionnelles (**Brafoed, 1981**), il doit couvrir un nombre important de souches à tester. La mise en évidence des protéases se fait au moyen des techniques de diffusion sur plaques (**Ward, 1983; Fijuwara, 1989**). Ces techniques peuvent révéler l'activité enzymatique et peuvent donner une estimation de la quantité de l'enzyme sécrétée selon le principe suivant : L'enzyme diffuse à travers le milieu en formant au tour de la colonie bactérienne une zone claire (transparente) signe de la dégradation de la protéine (**Chandraskaran et Dhar, 1982**).

Le milieu doit contenir une seule source de nutriment métabolisable par la souche productrice de protéases. On utilise préférentiellement des milieux solides à base de lait écrémé ou de caséine (**Carter et Sykes, 1961; Proth, 1976; Brafoed, 1981**). De même les films photographiques usés sont utilisés pour isoler de telles souches (**Cheung et al., 1991**).

3. 3. Effets des facteurs de production

3. 3. 1. Effets de la composition du milieu de culture

Il est évident que la composition du milieu de culture influe sur la synthèse des protéases chez les espèces du genre *Bacillus*; notamment la source de carbone et la source d'azote (**Srivastava et Bruah, 1986; Dercova et al., 1992**).

Pour la source du carbone **Fijuwara et Yamamoto, (1987)** trouvent que le glucose et l'amidon ont un effet positif sur la synthèse des protéases; cependant le saccharose et le lactose n'ont pas d'effet significatif (**Melansniemi, 1990**).

Les sources d'azote peuvent être des substances simples comme les acides aminés (**Millet et Aubert, 1969; Priest, 1977; Priest 1981**). Les sels d'ammonium peuvent être utilisées comme source d'azote (**Fijuwara, 1987**). Certaines protéines (caséine, gluten) ou des substances complexes contenant de l'azote telles que la poudre de muscle (**Proth, 1976**); l'extrait de levure peptone et le corn steep liquor (**Vehmaanpera, 1990; Dercova et al., 1992**) sont également utilisées.

3. 3. 2. Effets des conditions de culture :

Selon **Hao et al., (1988)**, il est établi que la température élevée peut altérer la membrane cytoplasmique, et par conséquent empêche la libération des exoenzymes dont les protéases; exception faite pour les thermophiles.

Par ailleurs **Markkanen et Bailey, (1975)** affirmaient que chez *Bacillus subtilis* K₁₃₈ la température de fermentation ne dépasse pas 40 °C.

La production est optimale à 37,5 °C pour *Bacillus amyloliquefaciens* (**Vahmaanpera, 1987; Castro et al., 1993**). Cependant une température de 60 °C permet une production optimale chez *Bacillus subtilis* DP1 (**Dercova et al., 1992**).

Le pH module la production des protéases, ainsi un environnement alcalin favorise la production des protéases alcalines par des espèces alcalophiles, de même, un environnement neutre favorise la production des protéases neutres par les espèces qui exigent un pH neutre pour leur croissance (**Brafoed, 1981; Ward, 1983**).

Etant donné que le genre *Bacillus* est aérobic, l'agitation devient nécessaire pour une bonne production, seulement que les vitesses d'agitation élevées ou réduites peuvent entraver cette production (**Markkanen, 1975; Tonkova et al., 1993**).

4. La synthèse des protéases :

4. 1. Régulation de la sporulation :

Lors du déclenchement du processus de la sporulation, le métabolisme bactérien est réorienté puisqu'il y a synthèse des messagers et des protéines de la phase végétative, **Chambliss et Demare (1973)**.

Par ailleurs, il est établi que le signal nutritionnel (carence en métabolite essentiel) entraîne un changement de la spécificité de l'ARN polymérase dans l'expression des gènes au niveau transcriptionnel, (**Brevet et Vellard, 1973; Balassa et al., 1973; Debabov, 1982**).

Cette hypothèse du changement de la spécificité de l'ARN polymérase est renforcée par le fait que plusieurs mutants asporogènes précocement bloqués (*Spo0*) appartenants à des gènes distincts sont incapables d'effectuer ce changement de spécificité, (**Debabov, 1982**).

Le nombre total des gènes de développement (*Spo0* à *SpoVI*) et de la germination des spores est estimé à 100 (**Trach et al., 1985; Rapoport, 1989**). Certains parmi eux sont déjà clonnés et séquencés (**Msadek et al., 1993**).

4. 2. Relation entre la synthèse de protéase et la sporulation :

D'autres parts, le taux maximal de la synthèse des exoenzymes et généralement observé à la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire de la croissance qui s'accompagne le plus souvent par un appauvrissement du milieu en source de carbone, moment où les cellules commencent à se préparer pour la sporulation, (Schaeffer, 1969; Priest, 1977; Liebs et al., 1988; Arbrige et al., 1993).

Une relation possible entre la synthèse des exoenzymes et la sporulation chez *Bacillus* a été discutée pendant une longue période. Ainsi, Millet et Aubert (1969), ont isolé un *Bacillus mégaterium* totalement dépourvu de métalloprotéases mais qui possède les caractéristiques d'une sporulation normale. Certaines souches sauvages de *Bacillus mégaterium* et de *Bacillus cereus* qui sporulent normalement, produisent seulement des protéases neutres (Millet, 1968; Millet, 1971; Aronson, 1973).

Cependant pour Debabov (1982); une relation causale entre l'absence de sporulation et la déficience en protéase extracellulaire peut parvenir seulement si une mutation *spo* est réalisée dans le gène structural de la protéase alcaline. Il affirme que la synthèse des exoprotéases exige un mécanisme similaire à celui responsable de l'initiation de la sporulation.

4. 3. Régulation de la synthèse des protéases :

La variété des gènes régulateurs (gènes régulateurs pleiotropes) chez *Bacillus* est attribuée à la faculté d'adaptation au changement de l'environnement (He at al., 1991; Doi et al., 1991).

Pour Msedak et al., (1990) le système régulateur à 2 composés varie avec l'état nutritionnel de la bactérie.

En effet, leur expression est stimulée par une carence en acides aminés (Malek, 1995) et en phosphore alors qu'un excès en glucose peut réprimer cette expression (Heyman et Kermazyn, 1973; Msadek et al., 1993). Dans le même sens Chambeliss (1993) rapporte qu'un milieu contenant des composés d'azote et de carbone facilement assimilables réprime la synthèse des exoprotéases chez *Bacillus*. En milieu complexe leur synthèse survient au début de la phase stationnaire.

5. Extraction et purification :

Parce que les enzymes sont des protéines leurs méthodes d'extraction et de purification sont généralement les mêmes pour les enzymes de différentes sources.

Les enzymes industrielles sont généralement concentrées à partir des filtrats de culture, ou par précipitation de la préparation enzymatique brute.

Les étapes de la purification des enzymes sont comme suit :

- Dissolution de l'enzyme dans l'eau, suivie par une clarification de la solution aqueuse par centrifugation, filtration ou les deux ensemble.
- La concentration de l'enzyme par une précipitation adéquate.
- L'étape finale est la lyophilisation.

La **figure 1** illustre certains traitements utilisés dans la technologie des enzymes. Alors que des méthodes spéciales de fractionnement des protéases neutres et alcalines, incluent l'absorption, le fractionnement par les solvants et la chromatographie (Kunitate et al., 1989; Pairaud claire, 1989; Shimogaki et al., 1991).

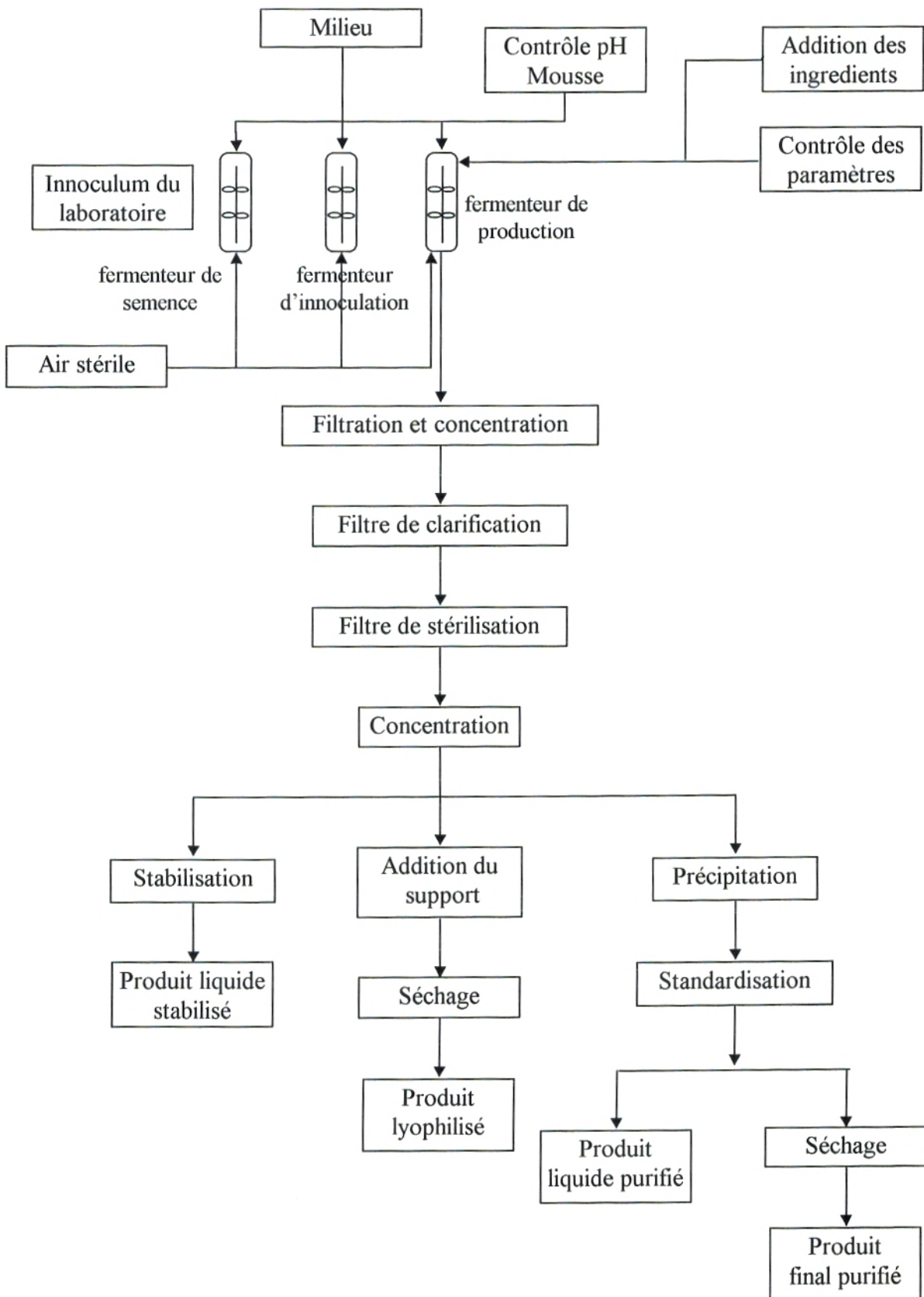


Figure 1 : Processus technologique pour la production des enzymes (Milansniemi, 1987)

Matériel et méthodes

Problématique et plan de travail :

Des études antérieures ont donné peu d'importance à la sécurité relative d'utilisation des protéases et à la stabilité de production. Nous avons tenté une approche à ces deux aspects, en éliminant les souches hémolytiques et en suivant le niveau de production sur une période d'une année.

Dans l'étape suivante nous avons essayé de valoriser un sous produit : le corn steep liquor en adoptant une méthode d'amélioration; car la quasi totalité des chercheurs utilisent pour prévoir les expériences qu'ils doivent effectuer une approche artisanale (**Phan Tan Luu et al., 1977**).

Nous rejoignons **Demeo et al., (1985)** pour dire que la démarche qui consiste pour l'optimisation des milieux et des conditions de culture, à faire varier successivement chacun des facteurs en maintenant les autres constants conduit à un nombre prohibitif d'expériences pour des résultats discutables.

Les compositions du milieu et les conditions de culture, doivent être étudiées et améliorées, grâce à des plans expérimentaux permettant l'analyse simultanée de plusieurs facteurs, visant à obtenir des réponses exactes et d'atteindre certaines zones optimales et de mettre en évidence des interactions entre les facteurs et par la suite optimiser les réponses expérimentales des paramètres retenues.

Rares sont les travaux utilisant cette démarche expérimentale (**Deshayes, 1980; Demeo et al., 1985; Staheli, 1987, Kisaalita et al., 1993**) qui reste efficace et pratique (**Bull et al., 1990**) puisqu'elle est consolidée avec les techniques de l'analyse statistique notamment l'analyse de la variance.

1. Méthodes microbiologiques :

1. 1. Origines et codifications :

L'ensemble des souches utilisées dans le présent travail, sont des souches locales, isolées à partir du sol, dans différents endroits de la Willaya de Tlemcen, que nous avons référencié comme indiqué dans le tableau 3.

Tableau 3 : Origines et codes des souches isolées.

Origines	Abou Techeffline	Institut de Biologie	Kiffane	A proximité d'une station d'essence	Tafna (Oued)	Sidi Said (cours d'eau)	Mansourah (cours d'eau)
Codes	A ₁ à A ₁₅	I ₁ à I ₄₆	K ₁ à K ₄₆	E ₁ à E ₁₄	T ₁ à T ₅₂	S ₁ à S ₄₀	M ₁ à M ₄₈

1. 2. Sources et techniques d'isolement :

La technique d'isolement utilisée consiste à prélever un échantillon moyen de profondeur de 10 à 15 cm.

Une quantité d'environ de un (01) gramme (g) est introduite dans 9 ml d'eau distillée stérile. Un certain nombre de dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-6}) est effectué à partir de cette solution mère.

1. 2. 1. Sélection par thermisation :

Une thermisation de l'ensemble des suspensions microbiennes permet une sélection orientée des microorganismes ayant la faculté de sporuler (l'échelle température / temps a été modifiée suivant les résultats obtenus).

1. 2. 2. Ensemencement et lecture :

L'ensemencement se fait par étalement de 0,1 ml de la suspension sur un milieu TGEA à 10 g /l de lait écrémé (annexe).

Après 24 h à 48 h à une température d'incubation de 30 °C (les températures indiquées dans ce travail et pour plus de précision, sont à une incertitude de $\pm 1^{\circ}\text{C}$), les colonies rappelant la morphologie de *Bacillus* (observation à l'aide d'un binoculaire) et qui sont entourées d'une auréole transparente (zone de dégradation) sont localisées.

1. 2. 3. Purification et identification au genre :

De chaque type de colonie, un frottis est préparé, puis observé au microscope après la double coloration de Gram.

La purification est nécessaire par le fait de la présence de certains types de cellules autres que *Bacillus*.

Les colonies de *Bacillus* sont des grosses colonies (de 3 à 5 mm de diamètre ou plus). On procède à une purification par la technique de la double dilution.

Si après 24 h à 30 °C, les cultures sur ces réisolement s'avèrent constituées d'un seul type de colonies, l'identification des bactéries pourra être débuter ou être interpréter, si elle a déjà été entreprise.

La catalase positive, la mobilité à l'état vital, la réaction positive à la coloration de Gram et la visualisation de l'endospore, par observation microscopique, grâce à sa réfringence à la lumière, sont les quatre (04) critères recherchés, ils sont suffisantes selon **Gordon et al., (1973)** et **Claus et Barkely, (1986)** pour affirmer l'appartenance au genre *Bacillus*. Les souches purifiées sont conservées sur gélose nutritive inclinée à 4 °C.

1. 3. Estimation du pouvoir protéolytique :

A partir des cultures sur milieu solide, le pouvoir protéolytique moyen de trois essais de l'ensemble des souches isolées est déterminé par la méthode semi-quantitative, (**Thanh, 1978 cité par Malek, 1995**). Pour parvenir à cet objectif, le milieu TGEA à base de lait a été utilisé. A partir des souches purifiées et conservées sur gélose nutritive, on ensemence par strie sur le même milieu, - dans une boîte - on peut ensemencer 4 souches. Après 24 h à 48 h d'incubation à 30 °C on mesure le rapport de la zone claire de la protéolyse autour de la colonie, sur la largeur de strie bactérienne.

1. 4. Sélection des souches non pathogènes :

La recherche de la lécithinase et de l'hémolyse permettent d'écarter les souches pathogènes. Testées sur le même milieu et les mêmes conditions, les souches non pathogènes sont classées suivant leur pouvoir protéolytique moyen de 6 essais, ce classement permet de donner une idée sur leurs activités et leurs stabilités.

1. 5. Identification à l'espèce :

1. 5. 1. Description morphologique :

Les souches sélectionnées sont revivifiées sur bouillon nutritif pour subir une identification à l'espèce selon la galerie classique de **Gordon et al., (1973)** et complétée par les tests préconisés dans le *Bergy's manuel of systematic*.

L'observation microscopique des préparations de Gram de chaque souche permet de décrire la cellule, la forme de la spore et sa disposition au sein de la cellule. Sur ces mêmes préparations, le diamètre cellulaire de chaque souche est mesuré.

1. 5. 2. Tests biochimiques et physiologiques :

• Le type respiratoire et l'attaque de l'éscoline :

Le type respiratoire et l'attaque de l'éscoline sont recherchés respectivement sur : une gélose viande-foie après 24 h à 30 °C, et sur une gélose à l'éscoline après 3 jours à 30 °C, l'ensemencement se fait par piqûre centrale.

• L'hydrolyse de la gélatine :

L'hydrolyse de la gélatine est testée selon la technique Kohn-Lautrop sur des languettes de gélatine. La lecture est effectuée après 5 jours d'incubation à 30 °C.

• Utilisation de certaines sources de carbones :

- L'utilisation du citrate comme seule source de carbone est effectuée sur un milieu citrate de Simmons. La lecture se fait après 5 jours d'incubation à 30 °C.
- L'hydrolyse de l'amidon est recherchée sur milieu solide de gélose nutritive à 1% d'amidon de riz. La révélation de l'hydrolyse se fait par inondation de la surface du milieu par du lugol, après 5 jours d'incubation à 30 °C.
- Sur un milieu TSI sont recherchées :
 - La production ou non de gaz et de H₂S.
 - La dégradation du lactose et du saccharose.
 - La fermentation du glucose.

De plus sont recherchés :

- La nitrate réductase, sur un bouillon nitraté.
- L'uréase, sur milieu urée-indole.
- La production d'indole sur milieu d'eau peptonée.
- Le pouvoir d'acidification sur un milieu Clark et Lubs.

Les lectures de ces tests se font après 24 h à 48 h d'incubation à 30 °C.

- Comportement des souches vis-à-vis de la température :

Les souches sont ensemencées sur TGEA au lait, par touche ou par strie, et sont incubées à 5, 10, 25, 30, 40, 50, 55 et 65 °C.

Les lectures se font après 24 heures, sauf pour les incubations à 5, 10 et 25 °C qui se font après 72 heures.

- Comportement des souches vis-à-vis de la concentration en chlorure de sodium :

Ce test est effectué sur le même milieu TGEA au lait, auquel est incorporée la quantité voulue du NaCl. La lecture se fait après 24 h d'incubation à 30 °C. Sont testées les concentrations suivantes : 2 %, 5 %, 7 % et 10%.

1. 6. La stabilité de production :

A l'intervalle de un (01) mois et sur une période onze mois, à partir des repiquages successifs, sur le même milieu et dans les mêmes conditions de cultures; on a étudié les niveaux de productions des souches sélectionnées ; pour vérifier la stabilité de la production.

1. 7. Culture mixte :

Pour voir si les cultures mixtes peuvent donner des activités plus importantes, deux suspensions sont préparées ; chacune contient quatre souches actives. De chaque suspension et sur une même boîte, on ensemence les deux souches pures les plus performantes et les deux cultures mixtes : CM₁ et CM₂. pour se faire, il suffit de tremper l'anse de platine dans la suspension à tester et ensemencer par strie. Les lectures se font après 24 heures d'incubation à 30°C.

1. 8. Essai préliminaire de culture et de production sur le corn steep liquor :

Nous avons utilisée le corn steep liquor (C.S.L) prévenant de la maïserie de Maghnia, il est à 40 % de matière sèche. La littérature scientifique rapporte que ce produit contient de 4 à 8 % de matières azotes (la composition détaillée est donnée en annexe) ce qui fait de lui un milieu préféré pour la production des enzymes dont les amylases et les protéases. A partir du milieu initiale, deux milieux sont préparés : le premier à 5% de matière sèche, le second à 10 %.

Les milieux sont filtrés pendant 20 minutes par centrifugation à 3000 tr /minute, puis filtrés, sur du papier slecta N° 589 cm². Les surnageants sont récupérés, le pH de chaque milieu est ajusté à 7 par l'addition de NaOH 0,1 N. Réparties à raison de 100 ml dans des erlenmeyers de 500 ml, les trois milieux sont stérilisés à 120 °C pendant 20 minutes.

Les souches retenues sontensemencées sur les trois milieux, à raison de 0,1 ml d'une suspension bactérienne dans de l'eau distillée stérile, préparée au préalable dans des tubes à essai contenant 10 ml d'eau distillés stérile.

Après 24 heures d'incubations avec agitation douce 30 tr /minute, les filtrats sont récupérés après une filtration de milieux de culture de 6000 tr / minute.

Sur un gel à 2 % de caséine, des puits de 6 mm de diamètre sont remplis par les filtrats des milieux de cultures. Les diamètres de protéolyses sont mesurés après incubation des boites à 30 °C pendant 24 heures.

2. Méthodes analytiques :

2. 1. Courbe de croissance :

La croissance bactérienne est suivie (à l'intervalle de 4 heures pendant 28 heures par la mesure de la densité optique à 580 nm).

2. 2. Dosage des protéines totales :

Le dosage des protéines totales se fait selon la méthode de Lowry dans :

1. Les milieux de cultures non inoculés.
2. Les filtrats de chaque échantillon.

Dans un tube à essai on introduit :

- 0,5 ml de l'échantillon à analyser.
- 2,5 ml du réactif alcalin qui est un mélange de 50 ml de solution "A" à 2 % de Na_2CO_3 dans NaOH , 0,1 N et de 1 ml d'une solution "B" (mélange à égal volume de : 1 % de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, et 2 % de tartrate double de Na, K)

Après un repos de 10 minutes à température ambiante on ajoute :
0,1 ml du réactif du Folin dilué au 1/6. Le mélange réactionnel est laissé à température ambiante pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

La densité optique est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 n.m. La concentration est exprimée en mg /ml et est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

2. 3. Déroulement de la réaction enzymatique :

On laisse la solution enzymatique (le surnageant) en contact avec le substrat (Solution de caséine à 2 % dans un tampon Tris / $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; (pH 8) 0,1 M pendant 20 minutes à 30 °C.

L'addition du TCA à 5 % permet la précipitation des protéines et de stopper la réaction. Les étapes de cette réaction sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Etapes de la réaction enzymatique

	Echantillon	Blanc	Contrôle du réactif	
			Echantillon	Blanc
Filtrat enzymatique	1 ml	1ml	0	0
Tampon phosphate	0	0	1 ml	1 ml
TCA 5 %	0	3 ml	0	3 ml
1 ^{ère} incubation	5 minutes à 30 °C			
Caséine à 2 %	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
2 ^{ème} incubation	20 minutes à 30 °C			
TCA 5 %	3 ml	0	3 ml	0
3 ^{ème} incubation	30 minutes à température ambiante			
Récupération	Les produits solubles dans le TCA sont séparés des précipités sur papier Watman			

2. 4. Dosage de la tyrosine :

En s'inspirant des travaux de **Thanh, 1978**, les étapes nécessaires au dosage du taux de la tyrosine libérée dans le milieu sont les suivantes :

1. à 0,1 ml du filtrat on ajoute 1 ml du réactif alcalin. On laisse reposer 10 minutes à température ambiante.
2. 0,1 ml du réactif du Folin dilué au 1/6 est ajouté. Le mélange réactionnel reste 30 minute à température ambiante.
3. On agite légèrement puis on dilue avec 2 ml d'eau distillée; enfin la lecture se fait contre un blanc à 580 n.m.

• Définition de l'activité enzymatique :

L'unité de l'activité enzymatique est définie comme la quantité de protéase qui libère une micromole de tyrosine en 20 minutes à 30 °C.

2. 5. Effet de la nature de la source d'azote sur la production :

Pour voir leurs effets sur la production du système protéolytique de la souche étudiée, l'extrait de levure (Difco) et la peptone (Difco) sont incorporés dans le milieu de culture séparément à raison de 5 g/l, les activités sont mesurées à 24 h, 48 h et 72 h d'incubation à 30 °C.

2. 6. Les caractères du système protéolytique de la souche sélectionnée :

2. 6. 1. Influence de la température sur l'activité enzymatique :

L'influence de la température d'incubation a été estimée dans l'intervalle 5 à 70 °C pendant 20 minutes. Le pH du mélange réactionnel est de 8.

2. 6. 2. Influence de la température sur la stabilité de l'activité du système protéolytique :

Le surnageant amené à pH 8 est chauffé à différentes températures pendant 20 minutes, l'activité protéolytique résiduelle est déterminée.

2. 6. 3. Influence du pH sur l'activité du système protéolytique :

Le mélange réactionnel est tamponné à divers pH :

- pour les pH 4, 5, 6 et 7 à l'aide d'un tampon acide citrique / HCl, 0,1 M;
- pour le pH 8 à l'aide d'un tampon Tris / HCl 0,2 M;
- pour les pH 9, 10, 11 et 12 à l'aide d'un tampon glycolle / NaOH, 0,1 M.

La réaction est réalisée à 30 °C pendant 20 minutes.

2. 6. 4. Influence du pH sur la stabilité de l'activité du système protéolytique :

Le surnageant de culture amené à différents pH dans l'intervalle de 4 - 12 en présence des tampons cités précédemment est maintenu à 30 °C pendant 20 minutes; il est ensuite ajusté à pH 8 et l'activité restante est déterminée.

2. 6. 5. Effet de l'EDTA :

Selon la technique de **Millet (1969)**, un seul inibiteur a été utilisé il s'agit de l'EDTA qui est testé à 10^{-2} M et 10^{-3} M. Il est incubé avec le filtrat 5 minutes avant la réaction enzymatique.

2. 7. Essai de purification :

On procède selon la technique de **Millet (1969)** :

Dans un erlenmeyer (250 ml), on introduit 20 ml du filtrat refroidie à 4 °C, auquel on ajoute 80 ml d'éthanol à 96 %. Après la formation du précipité (après 24 heures de repos), on procède à une filtration du mélange à l'aide d'un buchner (sous vide) : le précipité est lavé avec 80 ml d'éthanol à 96 %; le surnageant est éliminé, puis l'extrait est récupéré dans 20 ml d'un tampon tris/HCl 0,2 M (pH 8).

L'activité protéolytique est déterminée par la méthode décrite précédemment (cf. IV-3). Le dosage des protéines se fait par la méthode de Lowry.

3. Méthodes statistiques :

3. 1. Matrices d'expériences de Plackett et Burman :

Ces matrices d'expériences permettent d'évaluer l'influence de K facteurs à deux niveaux (un niveau inférieur “-” et un niveau supérieur “+”) sur la réponse étudiée avec un nombre d'expériences N tel que $N = K + 1$, donc avec un minimum d'essais. Les matrices sont construites par permutation circulaire à partir d'un générateur de base exposé en annexe.

Le tableau 5 donne les variables étudiées et leurs concentrations réelles, ainsi que deux variables erreurs pour une bonne estimation de l'erreur expérimentale.

La structure de cette matrice où chaque ligne représente un essai et chaque colonne représente le facteur étudié est exposée sur le tableau 6.

Tableau 5 : Les facteurs contrôlés et leurs niveaux

Facteurs	Niveaux	
	- 1	+ 1
F ₁ : matière sèche de CSL ‰ (p/v)	4	10
F ₂ : amidon ‰ (p/v)	0	5
F ₃ : température °C	30	55
(F ₄) : variable erreur	-	-
F ₅ : K ₂ HPO ₄ ‰ (p/v)	0	1
F ₆ : valeur de pH	6	8
F ₇ : quantité de sels ‰ (v/v)	0	0,8
(F ₈) : variable erreur	-	-
F ₉ : KH ₂ PO ₄ ‰ (p/v)	0	1

Tableau 6 : Structure de la matrice de Plackett et Burman pour l'étude de 7 facteurs.

Essais	F ₁	F ₂	F ₃	(F ₄)	F ₅	F ₆	F ₇	(F ₈)	F ₉
1	+	-	-	-	+	-	-	+	+
2	+	+	-	-	-	+	-	-	+
3	+	+	+	-	-	-	+	-	-
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-
5	-	+	+	+	+	-	-	-	+
6	+	-	+	+	+	+	-	-	-
7	-	+	-	+	+	+	+	-	-
8	+	-	+	-	+	+	+	+	-
9	+	+	-	+	-	+	+	+	+
10	-	+	+	-	+	-	+	+	+
11	-	-	+	+	-	+	-	+	+
12	+	-	-	+	+	-	+	-	+
13	-	+	-	-	+	+	-	+	-
14	-	-	+	-	-	+	+	-	+
15	-	-	-	+	-	-	+	+	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lettres () : F₄ et F₈ variables erreurs

(+) : niveau supérieur de la variable

(-) : niveau inférieur de la variable

3. 2. Calcul statistique :

Pour déterminer l'effet de chaque facteur étudié, on calcule la différence entre la moyenne des valeurs des réponses au niveau supérieur et la moyenne des valeurs des réponses au niveau inférieur.

$$E_A = \sum R_A(+)/r - \sum R_A(-)/r$$

avec :

E_A : effet du facteur A.

$R_A(+)$: valeur de la réponse observée au niveau supérieur.

$R_A(-)$: valeur de la réponse observée au niveau inférieur.

r : nombre d'apparition du facteur au niveau supérieur ou inférieur.

On définit l'erreur expérimentale comme étant la moyenne des carrés des effets des variables erreurs.

$$VE = SE(d)^2/n$$

VE : variance des effets.

n : nombre des variables erreurs.

(SE) : la racine carrée de la variance.

Pour déterminer la signification de chaque facteur on réalise le test de Student.

$$t = E/ SE$$

3. 3. Plans composés centrés :

Afin de déterminer les valeurs optimales des facteurs les plus influents issus des résultats des plans précédents, nous avons utilisé un modèle quadratique. Les plans composés centrés de **Box et Wilson**, (1951) offrent une possibilité efficace de résoudre ce type de problème.

Chaque facteur doit être étudié à 3 niveaux : un tel plan est composé de 3 parties :

- Un plan factoriel à deux niveaux (-1, +1).
- 2 k points en étoile, avec des niveaux - α et + α .
- n répétitions du point centrale (niveau 0).

Les valeurs de α sont en fonction du nombre de facteurs, et la valeur de n qui dépend du nombre de facteurs, du degré de fractionnement du plan et critères de rotabilité (voir annexe).

Pour trois facteurs, la structure du plan est donnée par le tableau 7.

Tableau 7 : Structure de la matrice des plans composés centrés :
(matrice de Box et Wilson).

Essais \ Facteurs	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	$-\alpha$	0	0
10	$+\alpha$	0	0
11	0	$-\alpha$	0
12	0	$+\alpha$	0
13	0	0	$-\alpha$
14	0	0	$+\alpha$
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

X_1 : Corn steep liquor

X_2 : sels

X_3 : Température

$\alpha = 1,682$ pour trois facteurs (voir annexe).

Un tel plan permet d'obtenir l'équation du second degré :

$$y = b_0 + b_1 \cdot x_i + b_{ij} \cdot x_{ij} + b_{ii} \cdot x_{ij}^2 + e$$

avec :

y : réponse expérimentale.

b_0 : valeur moyenne des réponses.

b_i : effet individuel du facteur x_i .

b_{ij} : effet d'interaction des facteurs x_i et x_j .

e : erreur expérimentale.

Les facteurs retenus sont codifiés selon l'équation suivante :

$$x_i = x_i' - x_0/D$$

où :

x_i : valeur codée.

x_i' : valeur réelle du facteur.

x_0 : valeur centrale réelle du facteur.

D : différence entre valeurs extrêmes.

Le tableau 8 expose la disposition des facteurs et de leurs valeurs.

Tableau 8 : Valeurs réelles des niveaux codés pour l'expérience du plan composé centré.

Facteurs	Niveaux				
	$-\alpha$	- 1	0	1	$+\alpha$
X_1 : corn steep liquor	1,272	4	8	12	14,728
X_2 : solution de sel % (p/v)	0,046	0,06	0,08	0,1	0,1136
X_3 : température °C	29,272	34	36	40	42,728

Les valeurs des coefficients linéaires sont déterminées par un programme de régression multilinéaire.

Les dérivées par rapport à 0 (zéro) vont permettre la détermination des coordonnées codées des extremums. Elles seront transformées en valeurs réelles.

3. 4. Réalisation de l'analyse de variance :

L'analyse de variance est une mesure de la dispersion des résultats individuels autour de la moyenne pour cela, nous l'avons utilisé pour déterminer l'influence des facteurs contrôlés sur les paramètres étudiés.

Ce test va désigner la part de la source de variation des observations et il va valider les résultats enregistrés.

3. 5. Comparaison par la méthode de la plus petite différence significative (PPDS) :

Ce test est souvent critiqué, mais il est très utilisé, pour sa simplicité, il est utilisé dans le but d'une comparaison des moyennes, il repose sur l'analyse précédente. Cette différence est donnée par :

$$PPDS = t_{\alpha,k} \cdot S_D$$
$$S_D = \sqrt{2 \cdot CMr/n}$$

avec :

CMr : variation de l'erreur résiduelle.

n : nombre d'observation par essai.

$t_{\alpha,k}$: valeur donnée par la table de Student (k : degré de liberté; α : probabilité).

La différence est significative si la valeur de PPDS est inférieure à la différence entre deux moyennes.

Résultats et discussions

1. L'isolement des souches :

Sur plus de 30 échantillons que nous avons effectué, nous avons pu isolé 260 souches de *Bacillus*, réparties sur 07 endroits, dans la Wilaya de Tlemcen. Le tableau 9 montre le nombre des souches et leurs répartitions.

Tableau 9 : répartition des souches sur différents biotopes.

BIOTOPES	Terres agricoles			Station d'essence	Bords des oueds		
	I	K	A		E	S	T
Souches							
Nombres	46	46	15	14	40	52	48

Ces résultats montrent qu'il est facile d'isoler les souches de *Bacillus* à partir du sol, qui est leur habitat naturel. Leurs importantes fréquences de présence, explique l'encombrement des colonies bactériennes observées après 24 heures à 30 °C sur les cultures à partir de la solution mère et les deux dilutions 10^{-1} et 10^{-2} , au point où il est impossible de localiser et de séparer les colonies des germes recherchées. Les zones de dégradation sont masquées par cet encombrement.

Ce n'est qu'à partir de la troisième dilution qu'il est possible d'isoler et de séparer les colonies rappelant *Bacillus*.

Le milieu d'isolement utilisé : TGEA au lait, est un milieu complexe, non sélectif pour les souches de *Bacillus*. Puisque on a isolé d'autres types des cellules peuvent y pousser. Des colonies des genres : *Proteus*, *Micrococcus* et certaines levures sont souvent rencontrées sur les cultures des prélèvements qui n'ont pas subi de traitement thermique. Une sélection orientée, par thermisation des suspensions avant l'ensemencement, est nécessaire pour pouvoir isoler les microorganismes ayant la faculté de sporuler.

1. 1. La sélection par thermisation :

L'échelle température-temps de 80 °C/10 minute rapportée par **Gordon et al., (1973)** s'avère insuffisante dans notre cas, puisque, utilisant cette échelle la sélection des microorganismes sporulants est entravée par l'existence de certains formes végétatives.

Pour surmonter cette situation nous avons essayer respectivement les échelles températures - temps suivantes : 80 °C/20', 90 °C/15' et 100 °C/15'. Seule la dernière échelle donne des résultats voulus, ce qui reflète la remarquable thermorésistance chez ces microorganismes.

Il faut signaler que **Markkanen et Bailey, (1974)** stipulent que peu d'espèces donnent des spores stables à 100 °C pendant 10 minutes, de leur coté **Priest et Grigorova, (1990)** rapportent que les conditions de thermisation varient pour certains groupes thermotolérants. Les dérivées chlorées peuvent être utilisées pour éliminer les cellules végétatives (**Bloomfield et Arthur, 1989**).

Cette thermosésistance peut être liée au changement de la composition de la paroi cellulaire (**Eke et al., 1989; Belin-Kelly et al., 1991**).

1. 2. Purification et identification au genre :

En se reposant sur la forme bacillaire, rectangulaire ou légèrement arrondie au niveau des bords, la réaction positive à la double coloration de Gram, la possession d'une catalase et sur le critère taxonomique clé, qui est l'endospore visualisée grâce à sa réfringence à la lumière, l'appartenance au genre *Bacillus* a été établi.

Sur la base de la disposition de la spore, nous avons pu constater l'existence des trois groupes cités par **Gordon et al (1973)** et **Claus et Berkely, (1986)**.

En se référant aux données de **Priest et Grigorova (1990)**, nous avons établi les différences qui existent entre le genre *Bacillus* et les autres genres bactériens sporulants, le tableau 10 illustre ces différences.

Tableau 10 : Critères de base de comparaison du genre *Bacillus* avec les autres genres sporulants.

Critères \ Genre	<i>Bacillus</i>	Autres genres
Forme cellulaire	Bâtonnet droit	Coccie : <i>Sporosarcina</i> filaments ramifiés : <i>Thermoactinomyces</i>
Rapport avec l'oxygène	Aérobie strict	Microaérophile : <i>Sporolactobacillus</i> anaérobie strict : <i>Desulfatocaulum</i> : <i>Clostridium</i> : <i>Oscillospira</i>
Catalase	Positive	Négative : <i>Clostridium</i> : <i>Sporolactobacillus</i> : <i>Desulfatocaulum</i>

2. Détermination du pouvoir protéolytique :

La technique d'ensemencement par strie (fig. 2) permet de répartir convenablement l'innoculum sur une longueur de 2 à 3 cm, sur la surface du milieu de culture. Par cette technique l'estimation du pouvoir protéolytique est plus aisée, contrairement à l'ensemencement par touche (fig. 3), utilisée par **Carter et Sykes (1961)** qui considèrent sans réserve que la méthode de diffusion sur plaque comme un technique permettant l'estimation quantitative directe de l'activité protéolytique.

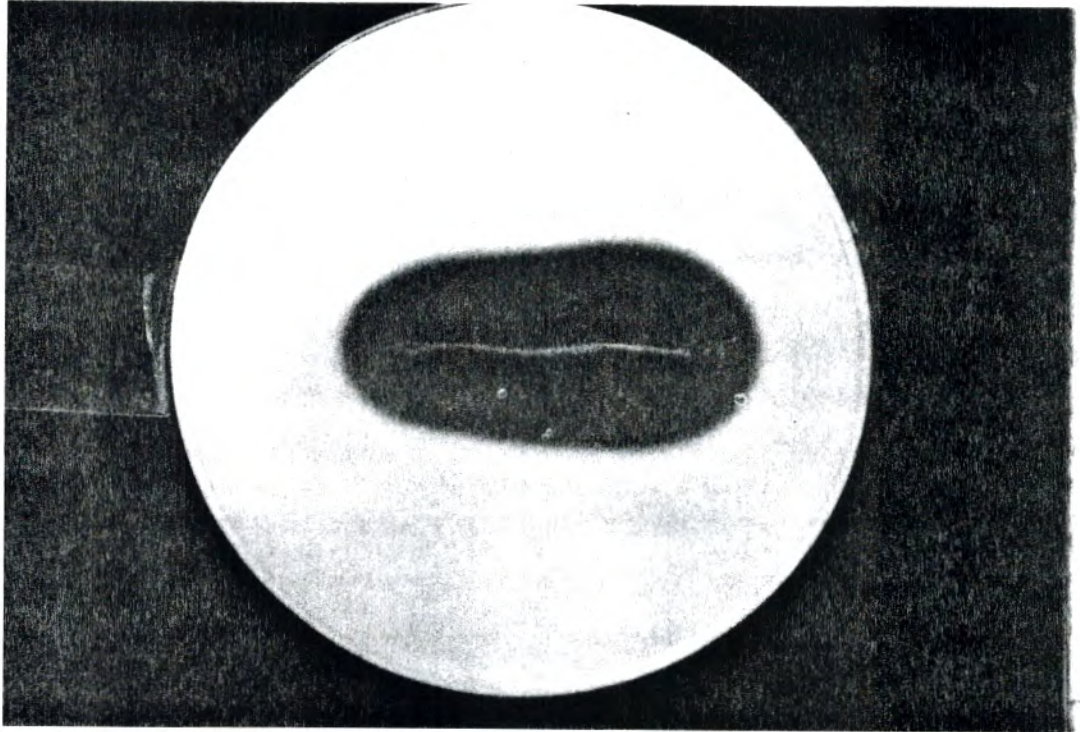


Figure 2 : Ensemencement par strie : croissance et protéolyse de la souche T₂₃ sur TGEA au lait, 24 heures à 55 °C.

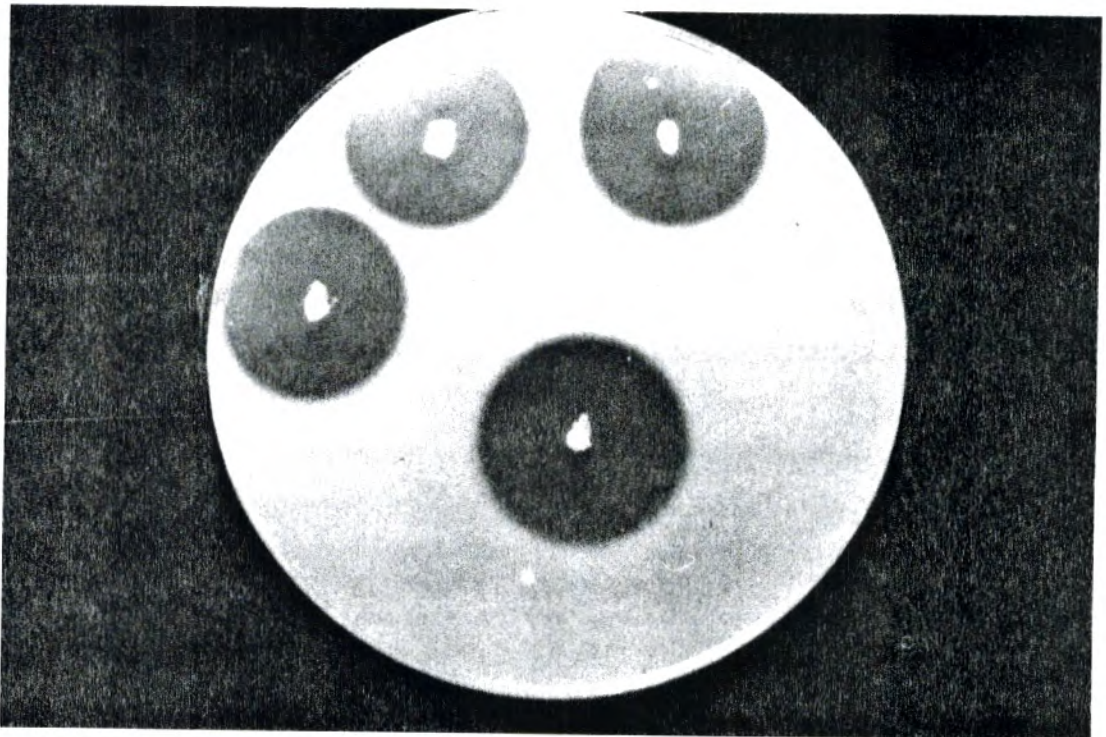


Figure 3 : Ensemencement par touche : croissance et protéolyse de la souche T₂₃ sur TGEA au lait, 24 heures à 30 °C.

La disposition parallèle des stries sur une même boîte, pose un problème d'intersection des zones ce qui gêne la détermination du diamètre de ces zones. Pour cela nous avons préféré la modification de cette disposition.

La figure 4 présente une disposition en X, une telle disposition est adéquate, l'intersection des zones de protéolyse est évitée, l'estimation de l'activité protéolytique est plus correcte.

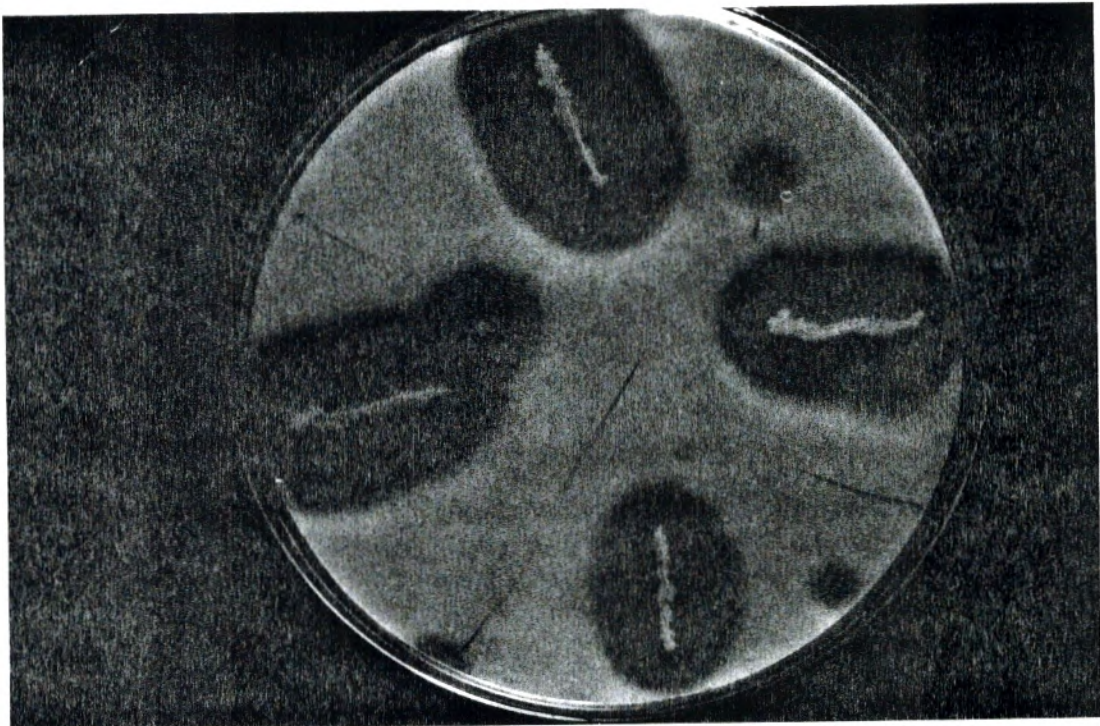


Figure 4 : Disposition en X des souches protéolytiques sur TGEA au lait, 24 heures à 30 °C

Les souches isolées sont testées par la technique d'ensemencement précédente. Les résultats des activités, en unité conventionnelle (uc) sont représentés dans le tableau 11 qui donne les effectifs des souches selon leur pouvoir protéolytique. Les fréquences relatives, cumulées et unitaires sont calculées.

Tableau 11 : Répartition de la fréquence d'apparition de l'ensemble des souches selon leurs activités protéolytiques.

Pouvoir protéolytique en unité conventionnelle	Effectifs (x_i)	Fréquences relatives (n_i')	Fréquences cumulées $N'(x_i'')$	Fréquences unitaires (n_i'')
de 1 à moins de 3 uc	59	0,2269	0,2269	0,1134
de 3 à moins de 5 uc	50	0,1923	0,4192	0,0961
de 5 à moins de 7 uc	41	0,1576	0,5768	0,0788
de 7 à moins de 9 uc	36	0,1384	0,7152	0,0692
de 9 à moins de 11 uc	21	0,0807	0,7959	0,0403
de 11 à moins de 13 uc	18	0,0692	0,8651	0,0346
de 13 à moins de 15 uc	15	0,0576	0,9227	0,0115
de 15 à moins de 20 uc	13	0,0500	0,9729	0,0100
de 20 uc et plus	7	0,0269	1,000	-
	Total : 260			

A partir de ces résultats nous avons construit l'histogramme normé (fig. 5), qui donne les fréquences unitaires (n_i'') en fonction de leurs activités (fig. 6).

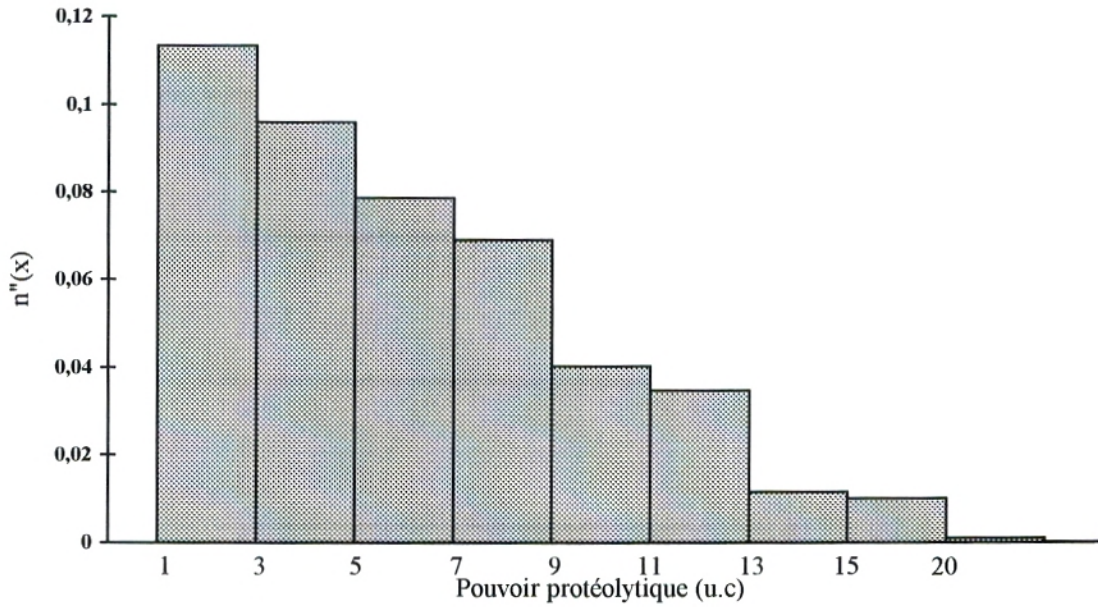


Figure 5 : Représentation graphique des fréquences unitaires en fonction des activités des souches isolées.

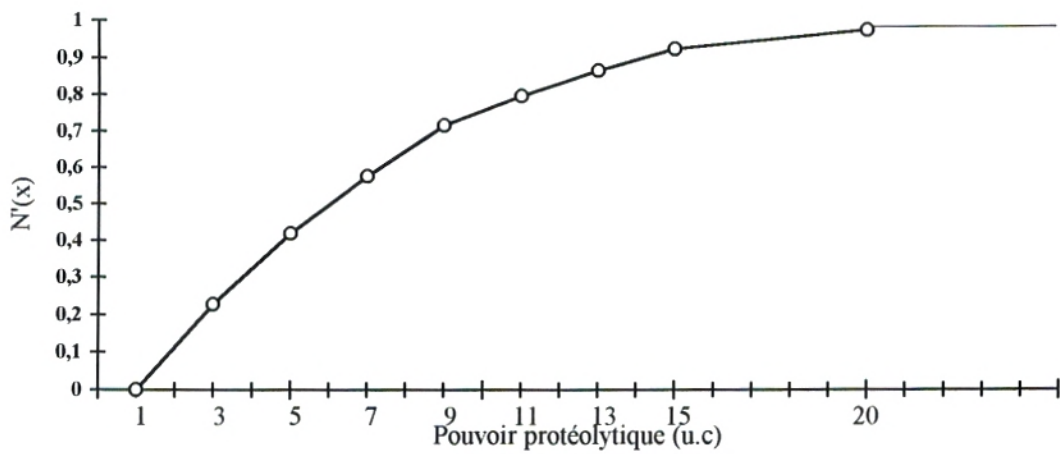


Figure 6 : Représentation graphique des fréquences cumulées en fonction des activités des souches isolées.

Nous pouvons donner les désignations conventionnelles suivantes pour former 3 groupes de souches :

- Faiblement protéolytiques : Les souches dont le pouvoir protéolytique est compris entre 1 et moins de 9 uc.
- Protéolytiques : les souches ayant un pouvoir protéolytique compris entre 9 et moins de 20 uc.
- Fortement protéolytiques : les souches dont le pouvoir protéolytique est égale à 20 uc ou plus.

Le premier groupe comporte 185 souches, alors que le deuxième groupe contient 67 souches, le dernier groupe qui désigne les souches fortement protéolytiques contient 7 souches avec une fréquence relative faible ($P < 0,03$) de telles souches sont rares dans la nature.

Cette façon de faire est légèrement différente de celle suivie par **Malek (1995)**. néanmoins, elle permet de constater, dans les deux cas, l'existence d'un nombre élevé de souches faibles sur l'ensemble des souches isolées.

2. 1. Sélection des souches non pathogènes :

Sur l'ensemble des souches isolées, nous n'avons pris en considération que les souches ayant dépasser un pouvoir protéolytique (en uc) de 7 leurs nombre est 110 souches soit 42,30 % de l'ensemble des souches.

Leurs fréquences de présence par biotope est donnée par le tableau 12.

Tableau 12 : répartition des souches protéolytiques non hémolytique sur les biotopes.

Biotopes	M	T	S	A	E	I	K
Nombre	34	33	21	6	3	6	7

Il ressort que le nombre des souches issues des biotopes (bords des Oueds) “ M, T, S ” est sensiblement élevé par rapport au reste des souches appartenant aux autres biotopes.

Les souches de cette collection ont subit un test visant à vérifier l’existence de l’hémolysine qui se manifeste par l’apparition d’une auréole autour de la colonne bactérienne, les trois types de l’hémolyse sont retrouvés. Les souches possédant cette toxine étaient considérées comme pathogènes et par conséquent étaient écartées par mesure de sécurité.

Les souches protéolytiques non pathogènes retenues jusqu’à cette étape sont au nombre de 42. Il est intéressant de signaler que les 13 souches des deux biotopes I et K sont hémolytiques, ceci nous a pousser à vérifier, si les souches non sélectionnées de ces biotopes suivent cette règle ou non.

Un fait à signaler : l’ensemble des souches des biotopes I sont hémolytiques, bien que les endroits de leurs prélèvement sont éloignés. Résultats difficile à interpreter bien que le genre *Bacillus* contient certaines espèces hémolytiques.

2. 2. Classification des souches actives :

Les souches de la nouvelle collection, ont subis 6 repiquages successives sur le même milieu (TGEA au lait). Les résultats de leurs activités moyennes ont été à la base de leur classification. Pour cette étape seules les souches ayant dépasser un pouvoir protéolytique de 12 uc sont retenues pour l’expérimentation suivante.

Cette classification est donnée par le tableau 13.

Tableau 13 : classification des souches performantes.

Souches	Pouvoir protéolytique (UC)
T ₂₃	26
S ₂₁	24
M ₃₁	24
M ₂₂	22
M ₃₅	22
S ₂₂	20
S ₃₁	20
T ₂₂	20
M ₃₆	17
E ₃	14

La souche T₂₃ est la souche la plus productrice par rapport aux autres souches. Elle a une activité de 26 uc qui est le double de celle de la souche E₃ (14 uc).

Sur un autre plan, **Chandraskaran et Dhar (1982)** considèrent comme fortement protéolytique (sur un milieu de culture similaire): Une souche de *Bacillus licheniformis*, qui donne un diamètre d'hydrolyse de 17,5 mm (diamètre de la colonie bactérienne inclu) après 36 heures d'incubation.

Loin de ces résultats **Sokol et al., (1979)** considèrent la souche de *Pseudomonas aeruginosa* PAKS-1 cultivé sur un milieu BHI, à base de lait écrémé comme hautement productrice de protéases, après 24 heures d'incubation à 30 °C, elle donne une zone d'hydrolyse de 2,5 mm seulement.

Ces comparaisons peuvent mettre en valeur les résultats trouvés, puisque les rapports de l'activité de la souche T₂₃ à celles de chacune des deux souches sont respectivement: 1,48 et 10,4, ce qui laisse à conclure que la souche sélectionnée est performante et que le milieu utilisé est adéquat.

Les souches du biotope M : M₃₁, M₂₂, M₃₅ et celle des biotopes S : S₂₂, S₃₁, S₂₁ ont des pouvoirs protéolytiques comparables.

Il est intéressant de mettre l'accent sur l'existence de 9 souches parmi les plus actives, appartenant aux échantillons prélevés aux bords des oueds.

Priest et Grigorova (1990), malgré qu'ils affirment que le sol est l'habitat naturel de ces bactéries, ils précisent que l'écologie de ces bactéries reste à définir.

2. 3. Identification à l'espèce :

2. 3. 1. Description morphologique :

Les 10 souches retenues sont identifiées à l'espèce. Les observations microscopiques des différentes souches nous ont permis de relever les descriptions suivantes :

T₂₃, T₂₂ et M₃₅ : bâtonnets courts, spore centrale, sphérique non déformante, bords droits, cellules isolées ou en diplobacilles, paroi épaisse.

Dimension : 0,6 µm.

S₂₁, S₂₂ et M₃₆ : bâtonnets courts, spore centrale,; ovoïde non déformante, bords droit, paroi mince, cellules isolées.

Dimension : (0,5 - 0,6 µm).

M₂₂ et M₃₁ ; bâtonnets longs, spore centrale sphérique (non déformante), paroi épaisse, cellule isolées.

Dimension $\approx 1 \mu\text{m}$.

S₁₂ : bâtonnets de dimensions moyennes, spore centrale, sphérique, bords arrondis, paroi épaisse.

Dimension : 0,7 - 0,8 μm .

E₃ : bâtonnets de dimensions moyennes, spore centrale, non déformante, bords arrondis, cellule isolées.

Dimension $\approx 0,7 - 0,8 \mu\text{m}$.

2. 3. 2. Tests biochimiques et physiologiques :

En reposant sur les tests préconisés par **Gordon et al (1973)** et complétés par **Bergy's Manuel of systematic (1986)**, le tableau **14** a été dressé, il récapitule les résultats de ces tests.

Tableau 14 : caractères différentiels des souches sélectionnées.

Souches Tests	T ₂₂	T ₂₃	M ₃₅	S ₂₁	S ₂₂	M ₃₆	S ₁₂	E ₃₄	M ₂₂	M ₃₁
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gélose-VF	±	±	±	-	-	-	-	-	±	±
Endospore	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Forme	sphérique			ovoïde			ovoïde		sphérique	
Position	centrale			centrale			centrale		centrale	
Mobilité à L'état vital	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	±	±	±	±	+	+	+	+
Mobilité	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse :										
Gélatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amidon	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Licithinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hémolyse	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate Réductase	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMC	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
RM	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Citrate de Simmons	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dvpt à										
5 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 °C	-	-	-	-	-	-	+	+	±	±
25 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55 °C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
65 °C	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Croissance sur NaCl										
2 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 %	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
10 %	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

En rassemblant les descriptions morphologiques et les tests biochimiques et physiologiques (tableau 14) et en les comparant par les données de la bibliographie, nous pouvons nous orienter vers les espèces suivantes :

T₂₃, T₂₂ et M₃₅ : sont des souches apparentées à l'espèce de *Bacillus licheniformis* :

figure 7.

S₂₁, S₂₂ et M₃₆ : sont des souches apparentées à l'espèce de *Bacillus subtilis* : figure 8.

S₁₂ : est une souche apparentée à l'espèce *Bacillus stearothermophilus* : figure 9.

E₃₄ : est une souche apparentée à l'espèce *Bacillus pumilus*.

M₂₂ et M₃₁ : sont des souches apparentées à l'espèce de *Bacillus mycoides* reconnues sur milieu solide par leur forme en rizoïde.



Figure 7 : Observation microscopique - sur une préparation de Gram - de la souche T₂₃ apparentée à l'espèce de *Bacillus licheniformis* (G X 250)



Figure 8 : Observation microscopique - sur une préparation de Gram - de la souche M₃₆ apparentée à l'espèce de *Bacillus subtilis* (G X 250)



Figure 9 : Observation microscopique - sur une préparation de Gram - de la souche S₁₂ apparentée à l'espèce de *Bacillus stearothermophilus* (G X 250)

Ces résultats sont conformes avec celles de **Willemse-Collinet et al., (1982)**, qui sur 192 souches représentées par 14 espèces de *Bacillus*, contaminant des constituants chimiques, il a trouvé les pourcentages suivants :

Bacillus lichenformis : 22,4 %;

Bacillus subtilis : 18,75 %;

Bacillus pimus : 3,12 %.

Ces deux espèces (*Bacillus lichenformis*, *Bacillus subtilis*) sont reconnues par leurs capacités de produire des protéases (alcalines et neutres).

Mais il reste difficile d'affirmer l'existence d'une relation causale entre l'aspect taxonomique et le pouvoir protéolytique des espèces étudiées, leur nombre est de (6) reste non représentatif pour avancer de telles constatations. Une étude plus poussée peut éclaircir ce point.

Pour mieux caractériser les espèces en question et d'avoir une idée sur la nature de protéases sécrétées, nous avons jugé utile d'ensemencer les souches retenues sur un milieu TGEA au lait à différents pH (pH 7,2; pH 10,2).

Les résultats obtenus après 24 heures d'incubation à 55 °C sont présentés sur le tableau 15.

Tableau 15 : résultats des activités des différents espèces sur TGEA au lait à deux pH différents.

Souches	pH 7,2	pH 10,2
<i>Bacillus licheniformis</i> T ₂₂	18	21
<i>Bacillus licheniformis</i> T ₂₃	25	24
<i>Bacillus licheniformis</i> M ₃₅	16	20
<i>Bacillus subtilis</i> S ₂₁	19	26
<i>Bacillus subtilis</i> S ₂₂	21	12
<i>Bacillus subtilis</i> M ₃₆	20	14
<i>Bacillus mycoïdes</i> M ₂₂	15	09
<i>Bacillus mycoïdes</i> M ₃₁	12	20
<i>Bacillus stearothermophilus</i> S ₁₂	27	14
<i>Bacillus pumilus</i> E ₃	24	25

Il ressort de ces résultats, que certaines souches ont la capacité de produire suffisamment de protéases sur les deux milieux, c'est le cas des souches de *Bacillus licheniformis* T₂₂ et T₂₃ et *Bacillus pumilus* E₃, alors que d'autres; *Bacillus licheniformis* M₃₅ et *Bacillus subtilis* S₂₁ et *Bacillus mycoïdes* M₃₁ produisent mieux sur un milieu alcalin que sur un milieu neutre.

Par ailleurs, les souches *Bacillus mycoïdes* M₂₂ et *Bacillus stearothermophilus* S₁₂, S₂₂ et *Bacillus subtilis* M₃₆ produisent suffisamment de protéases sur milieu neutre que sur le milieu alcalin. Nos résultats corroborent avec celles de **Chandraskaran et Dhar (1982)** qui ont déjà procédé par cette façon de comparaison et qui trouvent que des souches de *Bacillus firmus* NCIM 2462, *Bacillus pumilus* NCM 2327 et *Bacillus brevis* NCIM 2531 produisent plus de protéases alcalines (pH 9,8) que de protéases neutres; ceci avec des niveaux différents. Mais que les souches: *Bacillus licheniformis* NCIM 2043, *Bacillus stearothermophilus* NCIM 2235 et *Bacillus licheniformis* VUK 2 produisent plus de protéases neutres (pH 6,9) que des protéases alcalines; alors que *Bacillus licheniformis* NRRL NRS 1264 produit autant de protéases neutres que des protéases alcalines.

3. Stabilité de production :

La stabilité de production est un critère de choix des souches destinées à l'exploitation industrielle d'où l'utilité de son étude.

A un intervalle de un mois et une période de onze mois, les souches sont repiquées sur le même milieu. Les résultats de cette expérimentation sont donnés dans le tableau 16.

Tableau 16 : résultats des niveaux de production.

Mois repiquage Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
T ₂₃	28	23	30	29	31	25	22	29	32	29	35
T ₂₂	28	22	42	20	14	19	35	32	24	25	23
T ₃₅	15	22	17,5	11	15	17	25	17,2	16	20	19,3
S ₂₁	14	16	16	19	21	18	22	20	24	17	19
S ₂₂	14	16	13	17	20	18,5	20	24	25	23	24
M ₃₆	17	26	20	21	19	32	20,3	20	18	23	19
S ₁₂	30	25	16	27	26	27	20	28	27	23	17
E ₃	26	22	23	18	21	27	25	26	20	24	20,2
M ₃₁	18	22	18	25	19	24	18	25	22	19	21

Il ressort de ce tableau que la totalité des souches testées préservent leur pouvoir protéolytique. Cette constatation donne une idée sur la stabilité de leur production à moyen terme.

A partir de ce tableau nous pouvons établir une classification sur la base de l'activité et la stabilité. L'ordre sera donné par le tableau 17.

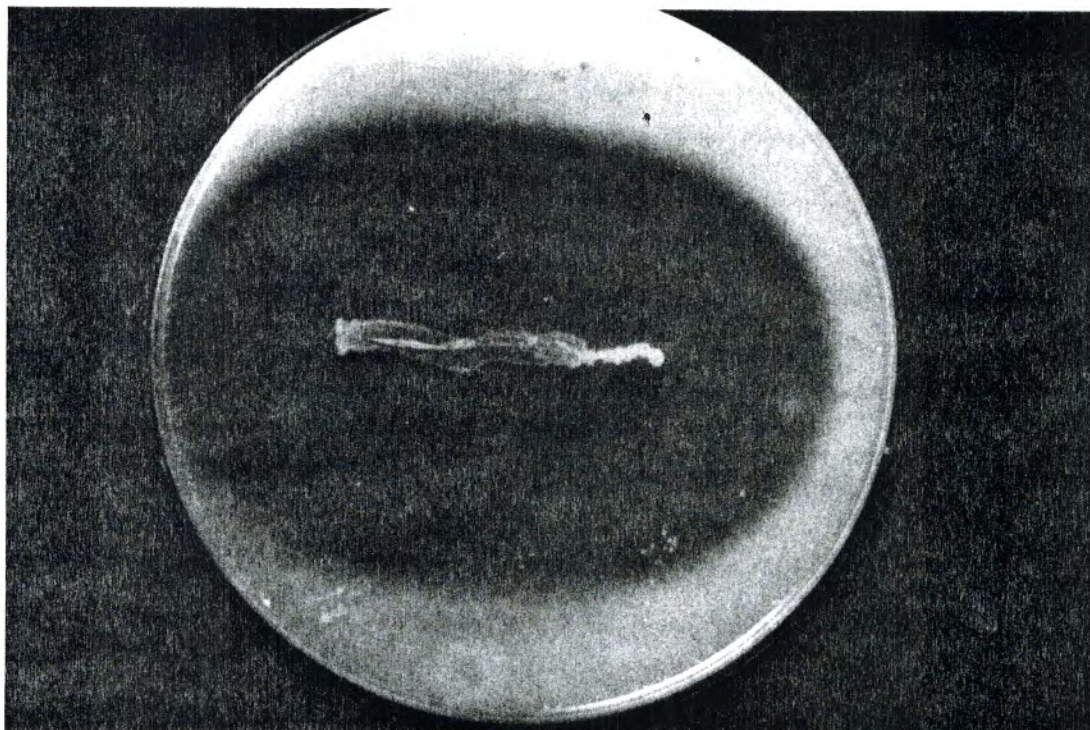


Figure 10 : Croissance et protéolyse de la souche T₂₃ - repiquage du onzième mois - sur TGEA au lait 48 heures à 55 °C.

Tableau 17 : Classification des souches selon leur stabilité de production.

Souches	Moyennes
Bacillus licheniformis T ₂₃	28,45
Bacillus licheniformis T ₂₂	25,81
Bacillus stearothermophilis S ₁₂	24,18
Bacillus pimus E ₃	22,74
Bacillus subtilis M ₃₆	21,39
Bacillus mycoides M ₃₁	21,00
Bacillus subtilis S ₂₂	19,50
Bacillus subtilis S ₂₁	18,72
Bacillus licheniformis M ₃₅	17,35

Cette classification diffère de la première classification (cf. tab. 13) qui devient apparente, devant la nouvelle classification qui est à notre point de vue plus précise. La souche de *Bacillus licheniformis* T₂₃ (fig. 10) reste de loin la souche dont la production est plus régulière et avec un niveau souhaitable par rapport aux autres souches.

La souche de *Bacillus pumilus* E₃, qui avait un pouvoir de 14 uc (moyenne de ~~06~~ repiquages) ; son pouvoir protéolytique s'améliore après les repiquages successifs.

Cette façon de faire a été adopter par **Desmazeaud** (1973). Pour le suivi des niveaux de production du système protéolytique d'une souche de *penicillium caseicolum*.

4. Résultats des cultures mixtes :

Ensemencées sur une même boîte, les activités des cultures mixtes, après 24 heures à 30 °C sont faibles, comparativement à celles des deux souches de *Bacillus licheniformis* T₂₃ et *Bacillus licheniformis* T₂₂. En effet l'activité de la première culture mixte est de 5 uc, alors que celle la deuxième est de 4,5 uc, soit 5 fois inférieure aux activités des cultures pures. Résultats qui affirment celles de **Abdelouahid**, (1989) qui signale un tel phénomène chez des cultures mixtes interespèces, ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures.

Les interactions entre les différentes protéases peuvent avoir un effet négatif sur la production, comme il est possible que certains composés volatiles peuvent se déposer sur le milieu et inhibent la production (**Wright et al.**, 1991).

5. Essai préliminaire :

Seules les trois souches les plus actives sont cultivées sur deux milieux : M₁ à 5 % de m.s de CSL et M₂ à 10 % de m.s de CSL.

La figure 11 donne les résultats de ces essais, il ressort que la quantité de 5 % de m.s de CSL est insuffisante pour la production du système enzymatique puisque les diamètres de protéolyse (pour les trois souches) sur un gel de caséine (à 2 %), après 24 heures d'incubation à 30 °C, sont inférieurs à ceux obtenus à partir du milieu à 10 % de m.s de CSL.

La même figure fait état d'une activité appréciable chez *Bacillus licheniformis* T₂₃ par rapport aux deux autres souches. On peut conclure, qu'on peut utiliser un milieu à base de CSL pour la production de protéases chez *Bacillus*.

Les résultats précédents (cf. tableau 13, 15 et 16) font de la souche *Bacillus licheniformis* T₂₃ la plus performante comparativement aux deux autres souches. Elle sera retenue pour les expériences ultérieures.

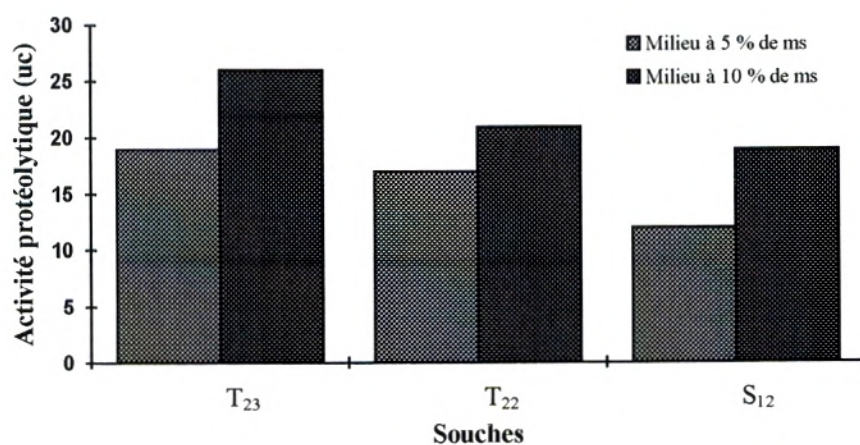


Figure 11 : Essai de production sur le corn steep liquor : activités protéolytiques (uc) des trois souches les plus actives.

6. Sélection des facteurs contrôlés :

Le tableau 18 donne les réponses expérimentales (24 heures d'incubation) des 16 essais réalisés sur une matrice de Plackett et Burman.

Tableau 18 : Résultats expérimentaux obtenus avec l'étude de 7 facteurs sur la matrice de Plackett - Burman.

Essai	F ₁	F ₂	F ₃	(F ₄)	F ₅	F ₆	F ₇	(F ₈)	F ₉	Unités totales U/100ml
1	+	-	-	-	+	-	-	+	+	6,7
2	+	+	-	-	-	+	-	-	+	6,1
3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	8,3
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	3,2
5	-	+	+	+	+	-	-	-	+	2,7
6	+	-	+	+	+	+	-	-	-	2,8
7	-	+	-	+	+	+	+	-	-	1,3
8	+	-	+	-	+	+	+	+	-	7,0
9	+	+	-	+	-	+	+	+	+	13,1
10	-	+	+	-	+	-	+	+	+	6,0
11	-	-	+	+	-	+	-	+	+	0,1
12	+	-	-	+	+	-	+	-	+	14,0
13	-	+	-	-	+	+	-	+	-	11,3
14	-	-	+	-	-	+	+	-	+	0,1
15	-	-	-	+	-	-	+	+	-	10,9
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0

Le calcul de l'effet de chaque facteur permet de dresser le tableau 19 ou sont donnés également les niveaux de signification après réalisation du test de Student.

Tableau 19 : Facteurs contrôlés et leurs influences sur la production de l'enzyme.

Facteurs	Effet (-) à (+)	Valeur de Student (t)	Niveau de signification
Corn steep liquor	28,8	1,760	80 %
Amidon	15,6	0,953	N.S
Température	-33,4	-2,041	80 %
Erreur	2,6	0,158	N.S
K ₂ HPO ₄	10,0	0,611	N.S
pH	-10,0	-0,611	N.S
Solution de sels	27,81	1,690	80 %
Erreur	23,0	1,405	N.S
KH ₂ PO ₄	4,0	0,244	N.S

6. 1. Effet de la composition du milieu de culture :

6. 1. 1. Effet de la quantité de matière sèche du corn steep liquor :

Nous remarquons que la source d'azote “ le corn steep liquor ” influe considérablement ($P > 80 \%$) sur la production du système protéolytique chez la souche étudiée.

Il est souvent admis (Brafoed, 1982; Srivastava et Bruah 1986; Fijuwara et Yamamoto, 1987; Fijuwara et al., 1991; Tonkova et la, 1993) que l'incorporation du CSL dans le milieu de culture a un effet positif sur la production des protéases et des amylases; pour ces auteurs, 0,4 à 0,5 % de CSL est suffisante, avis partagé avec Zhang et al., (1994).

6. 1. 2. Effet de l'amidon sur la production du système protéolytique :

Le tableau 19 indique que l'amidon n'a pas d'effet significatif ($P < 80\%$) sur la production du système protéolytique chez *Bacillus licheniformis* T₂₃. Ceci peut être expliqué par le fait que le CSL contient une quantité appréciable de sucres et d'amidons; d'où la difficulté de déceler l'effet de l'addition de l'amidon dans ces conditions.

6. 1. 3. Effet des ions phosphates :

Deux sources de phosphates ont été testées :

le phosphate monopotassique KH_2PO_4 et le phosphate bipotassique K_2HPO_4 . Le tableau 19 montre que ces deux ingrédients possèdent des effets inférieurs au seuil de signification, bien que, l'effet du phosphate bipotassique est plus important que celui du phosphate monopotassique, ceci peut être expliqué par le fait que le corn steep liquor contient des teneurs non négligeables de ces ions, mais les avis sont unanimes sur l'utilisation de ces deux ingrédients ou de l'un deux dans les milieux de production des protéases. Ainsi selon **Markkanen et Enari**, (1972), l'addition de 0,06 M K_2HPO_4 favorise la sporulation et par la suite la production du protéase, avis partagé avec **Shaeffer et al.**, (1973) qui ont remarqué une accumulation d'esters phosphorylés au début de la sporulation (moment de la production des exoprotéases) chez *Bacillus subtilis*.

6. 1. 4. Effet des sels sur la production du système protéolytique :

Une solution de 5 sels dissouts : $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl a été ajoutée à raison de 0,08 % p/v. Leur effet a été testé. En se référant au tableau 19 précédent, on note l'existence d'un effet positif ($P > 80\%$) exercé par l'addition des sels, sur la production du système protéolytique.

Les souches de *Bacillus*; n'exigent pas la présence des sels dans le milieu puisqu'elles poussent facilement sur le milieu TGEA qui ne contient comme sels que le NaCl. Résultats en accord avec ceux de **Lenoir, (1973)**; **Markkanen et Bailey, (1975)** qui signalent que certaines matières utilisées dans les milieux de culture contiennent des concentrations non négligeables de ces sels ce qui explique l'inefficacité de l'ajout d'une solution de sels; avis partagé par **Srivastava et Bruah, (1986)**.

Est ce l'ensemble des sels qui participe à cet effet, ou seulement quelques uns ?

Pour clarifier ce point, l'étude de l'influence spécifique de chaque sel a été réalisée par la suite.

6. 2. Effet des conditions de culture :

6. 2. 1. Effet de la température :

Parmi l'ensemble des facteurs étudiés, la température a l'effet le plus significatif ($P > 80 \%$) sur la production du système protéolytique chez la souche sélectionnée, ce qui concorde avec la plus part des données bibliographiques consultées.

Ainsi **Fujiwara et Yamamoto (1987)** trouvent que la température de 30 °C est suffisante pour produire une quantité importante de protéases chez une souche alcalophile de *Bacillus sp.*, de même **Fujiwara et al., (1991)** remarquent que pour les thermophiles la température de production est 55 °C qui est la température optimale de croissance de ces microorganismes.

6. 2. 2. L'effet du pH initial :

Le pH a été étudié à deux niveaux 6 et 8. On ne décèle pas d'effet significatif sur la production du système protéolytique de la souche étudiée, le niveau de signification reste inférieur au seuil de signification ($P < 80\%$). On a déjà signalé que la souche T₂₃ produit autant de protéases alcalines que de protéases neutres, sur le milieu TGEA au lait, ceci peut expliquer l'indifférence de la souche au changement du pH dans l'intervalle étudiée.

6. 3. Effet spécifique des sels :

Les tableaux 20 et 21 donnent respectivement la structure de la matrice de Plakett et Burman et les résultats expérimentaux pour l'étude des effets spécifiques des sels, il ressort du tableau 21 que seul le CaCl₂ a un effet significatif sur la production ($P > 95\%$). La bibliographie consultée est controversée sur ce point; ainsi Shimogaki et al (1991) signale que la serine protéase BYA de *Bacillus* sp n'est pas inhibée par l'addition d'une mM de CaCl₂ est d'une mM de MgSO₄.

Par ailleurs, El meyda et al., (1985) rapportent que la production de la protéase neutre de *Bacillus subtilis* n'est inhibée qu'à partir d'une concentration de 20 % de NaCl.

Le CaCl₂ à 0,04 %, le sulfate de fer à (0,005 - 0,002 %) inhibent faiblement la production, le sulfate de magnésium à (0,0025 - 0,001 %) n'a pas d'effet apparent sur la production des protéases de *Bacillus subtilis*, alors que pour l'incorporation de NaCl à 0,15 % dans le milieu de culture améliore la production de protéases de *Bacillus subtilis* d'un facteur de 1,2 (Melansniemi et al., 1987).

Tableau 20 : Structure de la matrice de Plackett-Burman pour l'étude de l'effet spécifique des sels.

Essai	A	B	(C)	D	E	(F)	G	Unités totales U/100ml
1	+	+	+	-	+	-	-	7,0
2	+	+	-	+	-	-	+	8,4
3	+	-	+	-	-	+	+	7,5
4	-	+	-	-	+	+	+	8,1
5	+	-	-	+	+	+	-	9,2
6	-	-	+	+	+	-	+	8,8
7	-	+	+	+	-	+	-	7,3
8	-	-	-	-	-	-	-	6,0

Niveau supérieur (+) : absence du sel.

niveau inférieur (-) : 0,8 % de sel.

A : $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; B : $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; D : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

E : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; G : NaCl

C et F : Erreurs

Tableau 21 : effet des différents sels et leur niveau de signification.

Facteurs	Effet	Valeur de t	Niveau de signification
A	1,90	1,225	NS
B	-0,70	-0,451	NS
C	-1,10	-0,709	NS
D	5,10	3,290	95 %
E	3,90	2,516	NS
F	1,90	1,225	NS
G	3,30	2,129	NS

On peut avancer que l'ensemble de ces résultats indiquent que seulement trois (3) facteurs (température, % du corn steep liquor et le sels) ont des effets significatifs sur la production du système protéolytique de la souche *Bacillus licheniformis* T₂₃.

7. Optimisation des facteurs influençants la production :

Afin de déterminer la position des optimas des trois facteurs sélectionnés (corn steep liquor; sels et température); nous avons effectué un plan composé centré : à un plan factoriel 2³ s'ajoutent 6 points en étoile (niveau α) et des répétitions du point central (niveau 0).

Une optimisation de ces facteurs nécessite une établissement d'un plan composé centré de **Box et Wilson (1951)**.

Sur le tableau 22 sont montrés les résultats expérimentaux (après 16 heures de fermentation : moment du début de la phase stationnaire) de l'optimisation de ces facteurs par le plan composé centré de Box et Wilson.

Tableau 22 : Résultats expérimentaux pour l'optimisation de trois facteurs sur la matrice de Box et Wilson.

Facteurs Essais	X ₁	X ₂	X ₃	Unités totales U/100ml
1	-1	-1	-1	3,3
2	+1	-1	-1	3,9
3	-1	+1	-1	3,5
4	+1	+1	-1	4,3
5	-1	-1	+1	3,2
6	+1	-1	+1	4,0
7	-1	+1	+1	3,0
8	+1	+1	+1	3,8
9	- α	0	0	9,6
10	+ α	0	0	9,8
11	0	- α	0	9,7
12	0	+ α	0	9,8
13	0	0	- α	1,2
14	0	0	+ α	6,3
15	0	0	0	9,2
16	0	0	0	9,9
17	0	0	0	7,2

X₁ : Corn steep liquor.

X₂ : CaCl₂

X₃ : température

L'analyse statistique des résultats obtenus a été effectuée par un logiciel StatView 2. Cette analyse a permis la détermination des coefficients linéaires et quadratiques.

Le tableau 23 détaille cette analyse, il donne en plus des coefficients linéaires, les coefficients de corrélations et les erreurs standards. Une analyse de variance (tableau 24) renforce et valide ces résultats.

Tableau 23 : résultat de l'analyse statistique de l'équation du modèle étudié.

Variabes	Coeff.	Er. Std.	Coeff. Std.	valeur de t	Probabilité
X ₀	9,026				
X ₁	0,244	8,27	0,073	0,295	0,7763
X ₂	0,027	0,827	0,008	0,033	0,9749
X ₃	0,555	0,827	0,166	0,671	0,5238
X ₁ ²	-0,568	0,910	- 0,166	0,624	0,5525
X ₂ ²	-0,550	0,910	- 0,161	0,604	0,5646
X ₃ ²	-2,671	0,910	-0,782	2,935	0,0219
X ₁ .X ₂	0,025	1,080	0,006	0,023	0,9822
X ₁ .X ₃	0,025	1,080	0,006	0,023	0,9822
X ₂ .X ₃	-0,125	1,080	- 0,029	0,116	0,9112

Tableau 24 : Analyse de la variance.

Source de variation	DDL	S. C	CM	Test F	P
Régression	9	86,683	963,145	1,031	0,4954
Résiduelle	7	65,381	934,024		
Totale	16	152,064			

Les trois facteurs étudiés et la production de l'enzyme sont reliés par un modèle quadratique donné par l'équation :

$$y = 9,026 + 0,244.x_1 + 0,027.x_2 + 0,555.x_3 - 0,567. x_1^2 - 0,55. x_2^2 - 2,671. x_3^2 + 0,025 x_1.x_2 + 0,025. x_1.x_3 - 0,125. x_2.x_3$$

Une bonne corrélation ($R = 0,755$) est obtenue, elle met en valeur le modèle qui représente le système étudié (tableau 25).

Tableau 25 : les coefficients de corrélation et d'ajustement.

Fr	R	R ²	R ajust	E _c Type R
17	0,755	0,57	0,017	3,056

En dérivant partiellement (par rapport à x_1 , x_2 et x_3) l'équation su-présentée, les optimas des trois facteurs peuvent être obtenus.

Cette dérivation donne x_1 , x_2 et x_3 :

$$x_1 = 0,21 \quad \text{soit } 9 \% \text{ de ms.}$$

$$x_2 = - 0,002 \quad \text{soit } 0,08 \% \text{ de CaCl}_2$$

$$x_3 = 1,03 \quad \text{soit } 40,12 \text{ } ^\circ\text{C.}$$

En transformant ces valeurs nous obtiendrons les valeurs réelles des 3 facteurs et ainsi on détermine y_{\max} qui sera la réponse optimisée.

$$Y_{\max} = 9,6 \text{ U/ } 100.\text{ml}$$

A travers ces deux matrices nous avons pu déterminer, en un minimum d'essais, les facteurs dont l'effet est significatif sur la production et par la suite déterminer les valeurs maximales de ces facteurs, pour enfin estimer la production maximale du système protéolytique. D'autres auteurs, (Maddox et al., 1977 ; Bull et al., 1990 ; Madhavi et al., 1991 ; Castro et al., 1992) estiment que cette méthode expérimentale est rapide, simple et fiable.

8. Effet de la source d'azote sur la production du système protéolytique :

L'influence de la source d'azote sur la production du système protéolytique de la souche de *Bacillus licheniformis* T₂₃ a été étudiée par l'incorporation de l'ingrédient a testé au milieu de culture à une concentration de 0,5 %.

Les activités quantifiées avec les trois sources d'azote (le corn steep liquor, l'extrait de levure, la peptone) pendant trois temps de fermentation (24 h, 48 h et 72 h) ont fait l'objet d'une étude statistique ANOVA à deux critères.

Le tableau 26 fait état de cette analyse en fonction de la source d'azote et du temps de fermentation. Elle indique que la production du système protéolytique chez *Bacillus licheniformis* T₂₃ est sous la dépendance de la source d'azote (F = 158,88) et le temps de fermentation (F = 73,48). L'interaction des deux facteurs est significative (F = 29,92).

Tableau 26 : Analyse de variance de l'effet de la nature de la source d'azote en fonction du temps d'incubation sur la production du système protéolytique.

Source	DDL	S. des carrés	Carré moyen	Test-F
Temps (A)	2	79,25	39,62	158,88
Azote (B)	2	36,95	18,47	73,48
AB	4	29,94	7,48	29,92
Erreur	18	4,56	0,25	

Ordre pour une bonne production après 24 heures d'incubation à 30 °C est le suivant :

1- CSL, 2 - extrait de levure, 3 - peptone.

Le même schéma se présente après 48 heures de fermentation. Alors qu'au bout de 72 heures l'extrait de levure donne un activité nettement supérieure comparativement à celles données par la peptone et le CSL.

Tableau 27 : Incidence du temps d'incubation et de la source d'azote sur la production du système protéolytique chez *Bacillus licheniformis* T₂₃.

Source d'azote \ Temps	Extrait de levure	Peptone	CSL
24 h	9,1	8,16	9,6
48 h	11,1	9,53	11,53
72 h	15,66	10,16	13,56

En comparant les moyennes des activités (tableau 27) par la méthode de PPDS on décèle une différence significative (entre CSL et peptone) : PPDS = 5,23 avec $\alpha = 5 \%$ et PPDS = 8,99 avec $\alpha = 0,1 \%$, au bout de 24 heures et 48 heures respectivement.

Ces résultats affirment celles de **Srivastava et Bruah, (1986)** qui trouvent que l'extrait de boeuf ou le CSL permet une production de protéases et d' α -amylase supérieure à celle qui peut être contenue à partir d'un milieu contenant de la peptone à 0,4 %, quantité préconisée par **Zhang et al., (1994)**.

9. Cinétique de production et courbe de croissance :

Durant les différentes phases de croissance de *Bacillus licheniformis* T₂₃, sur le milieu élaboré (CSL à 9 % de ms, 0,08 % de CaCl₂) à 40 °C. La cinétique de production du système protéolytique été étudiée en Erlenmeyer agité.

La courbe de croissance de la souche en question est donnée par la figure 13. L'état stationnaire est atteint après 16 heures de fermentation, cependant l'activité protéolytique progresse pendant la phase stationnaire de la croissance (fig. 14). La production des protéases est détectée après 4 heures de fermentation, résultats en accord avec les remarques de **Kunitate et al., (1989)** sur *Bacillus thuringiensis* et **Malek (1995)** sur *Bacillus sp.*

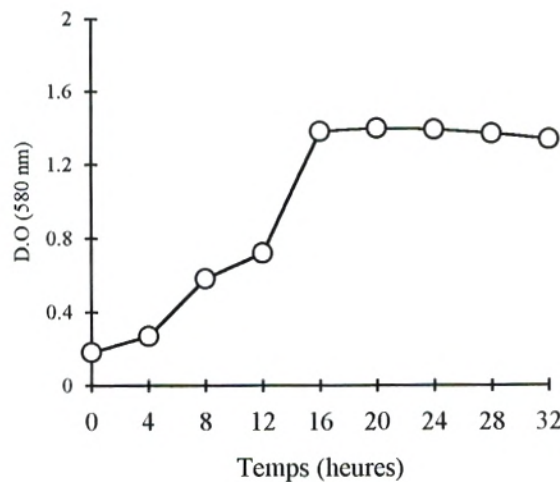


Figure 13 : Courbe de croissance de la souche de *Bacillus licheniformis* T₂₃.
(CSL à 9% de ms, 0,08% de CaCl₂, 40 °C).

Etant un milieu complexe, le CSL permet une bonne croissance et une bonne production de protéases; après 28 heures de fermentation, la production continue à progresser.

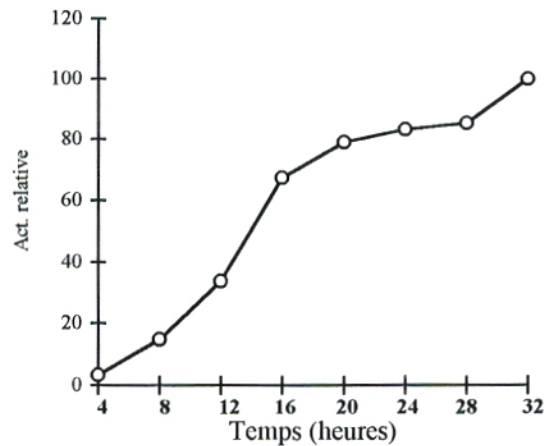


Figure 14 : Cinétique de la production du système protéolytique de *Bacillus licheniformis* T₂₃. (CSL à 9% de ms, 0,08% de CaCl₂, 40 °C)

10. Caractéristiques du système protéolytique *Bacillus*

licheniformis T₂₃ :

10. 1.Effet de la température sur l'activité du système protéolytique :

La courbe T₁ de la figure 15 met en évidence une température optimale de 55 °C et une diminution légère d'activité aux températures supérieures à 60 °C.

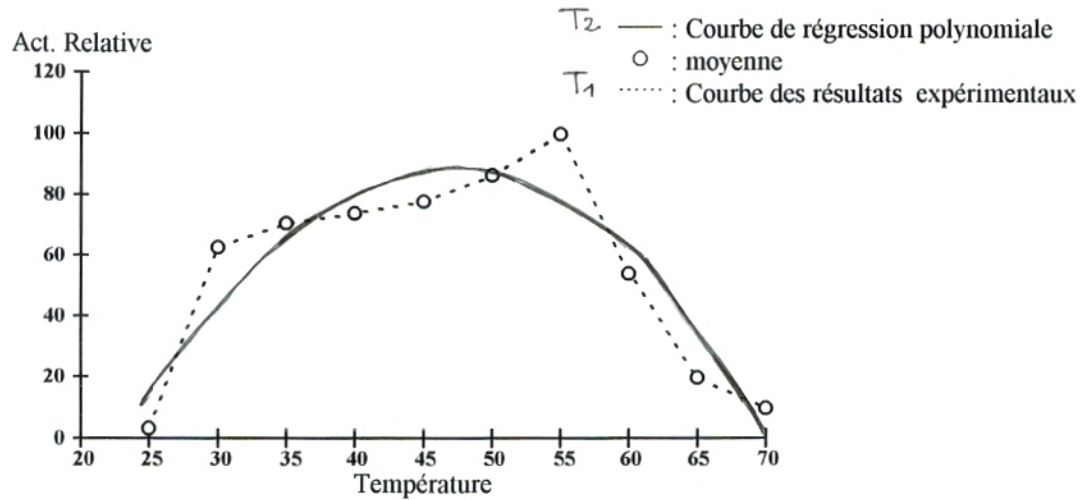


Figure 15 : Effet de la température sur l'activité du système protéolytique de *Bacillus licheniformis* T₂₃.

Dans les conditions de l'essai et pour s'approcher d'un bon ajustement de cette constatation, la courbe T₂ représente l'évolution de l'activité du système protéolytique de *Bacillus licheniformis* T₂₃ en fonction de la température d'incubation du mélange réactionnel. Elle suit le modèle d'une régression polynomiale (tableau 28) donné par l'équation Y_T :

$$Y_T = -260,52 + 15,001.x - 0,161.x^2$$

avec un corrélation de 0,925, de plus l'analyse de variance révèle que la température affecte significativement (F = 20,708) l'activité enzymatique de la souche *Bacillus licheniformis* T₂₃, avec un optimum d'activité entre 37 et 55 °C.

Tableau 28 : Analyse statistique des résultats expérimentaux de l'effet de la température sur l'activité de système protéolytique

Variable	Coefficient	Err. std.	Coeff. std.	(Valeur)-t	Probabilité
Constante	-260,52				
x	15,001	2,421	6,747	6,196	0,0004
x ²	-0,161	0,025	-6,938	6,371	0,0004

Tableau 29 : Analyse de la variance des résultats expérimentaux de l'effet de la température sur l'activité de système protéolytique

Source	DDL	S. des carrés	Carré moyen	Test-F
Régression	2	8722,994	4361,497	20,708
Résiduel	7	1474,315	210,616	P = 0,0011
Total	9	10197,309		

10. 2. Effet de la température sur la stabilité du système protéolytique :

L'allure de la courbe obtenue (fig. 16) confirme l'observation précédente (fig. 15). La stabilité du système enzymatique n'est pratiquement pas altérée à 55 °C. Aux températures supérieures, elle baisse rapidement, à 60 °C il reste seulement 50 % de l'activité initiale et à 75 °C, l'inactivation est presque totale.

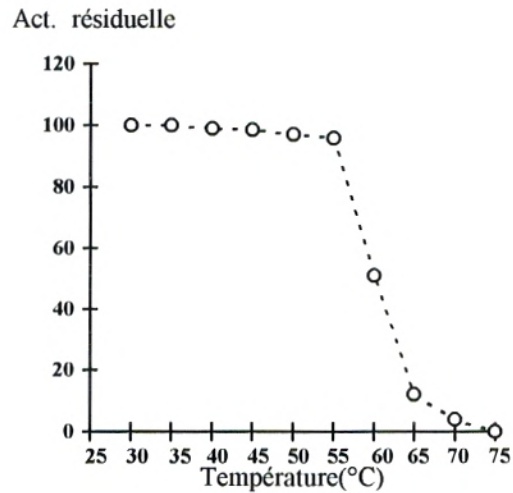


Figure 16 : Effet de la température sur la stabilité du système protéolytique de *Bacillus licheniformis* T₂₃.

Cet optimum d'activité et de stabilité sous l'effet de la température reste moyen comparativement à la protéase alcaline de *Bacillus thuringiensis* qui est active à 70 °C et stable à 60 °C (Kunitate et al., 1989) et à celui de la protéase B₁₈ qui est active à 85 °C (Fujiwara et al., 1991). Cette température optimale d'activité est proche de celle de la protéase alcaline (60 °C) de *Bacillus sp.* B₂₁₋₂ qui est stable à 50 °C (Fujiwara et Yamamoto, 1987).

10. 3. Effet du pH sur l'activité du système protéolytique de *Bacillus licheniformis* T₂₃

Bien que les résultats ne sont pas rigoureusement concordants dans la zone du pH 7 - 10 (courbe P1, fig. 17). Une courbe moyenne caractéristique peut être tracée (courbe P2, fig.18). Elle suit un modèle d'une régression polynomiale donné par l'équation Y_P :

$$Y_P = - 249,528 + 74,203.x - 4,002.x^2$$

obtenue à partir de l'analyse statistique (tableau 30) des résultats expérimentaux.

Tableau 30 : Analyse statistique des résultats expérimentaux de l'effet du pH sur l'activité de système protéolytique

Variable	Coefficient	Err. std.	Coeff. std.	(Valeur)-t	Probabilité
Constante	-249,528				
x	74,203	13,151	5,17	5,642	0,0013
x ²	-4,002	0,814	-4,506	4,918	0,0027

L'analyse de la variance détaillée dans le tableau 31 indique que l'évolution du système protéolytique est affecté remarquablement par le pH ($F = 27,294$). L'allure de la courbe P₂ (fig. 19) met en évidence un pH optimale compris dans l'intervalle de pH 8 - 10.

Tableau 31 : Analyse de la variance des résultats expérimentaux de l'effet du pH sur l'activité de système protéolytique

Source	DDL	S. des carrés	Carré moyen	Test-F
Regréssion	2	11135,189	5567,594	27,294
Résiduel	6	1223,924	203,987	P = 0,001
Total	8	12359,112		

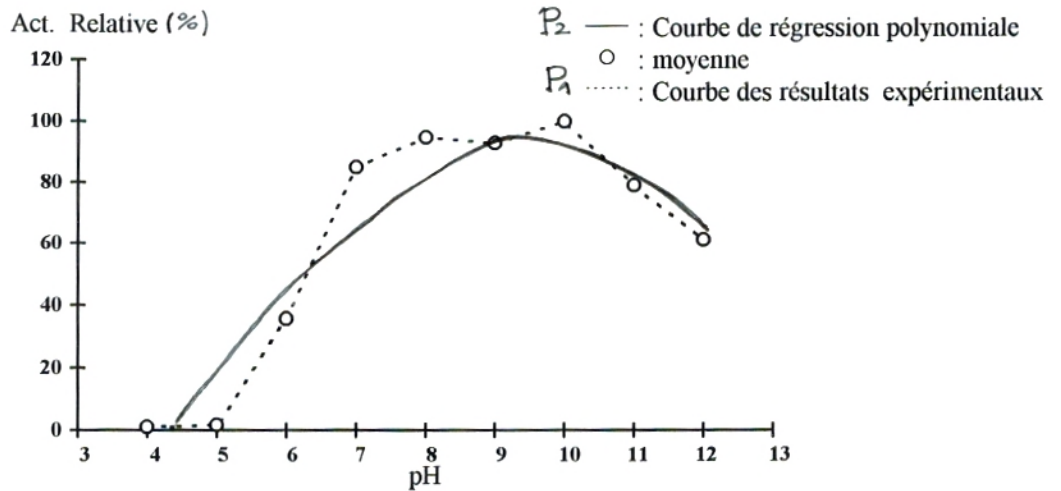


Figure 17 : Effet du pH sur l'activité du système protéolytique de *Bacillus licheniformis* T₂₃.

10. 4. Influence du pH sur la stabilité du système protéolytique :

Les résultats (figure 18) montrent que la zone de stabilité maximale se trouve entre pH 7 et 10 avec un optimum à pH 9. En zone acide, la stabilité est notablement faible. Elle atteint 25 % à pH 5, l'inactivation apparaît totale à pH 4.

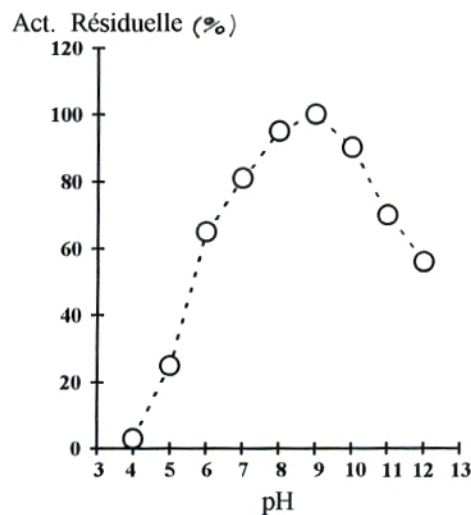


Figure 18 : Effet du pH sur la stabilité du système protéolytique de *Bacillus licheniformis* T₂₃.

Ce qui montre qu'on est en présence d'une protéase alcaline, comparativement aux données de **Fogarty et al., (1974)** qui considère l'optimum d'activité des protéases alcalines dans l'intervalle de pH de 9 - 11, avec une stabilité dans la zone du pH 5 - 10 et **Kunitate et al., (1991)** qui a isolé un *Bacillus thuringiensis*, qui produit une protéase alcaline dont l'activité est optimale entre le pH 8,5 - 9 et la stabilité d'activité est à pH 8,5.

Par ailleurs, la protéase alcaline de *Bacillus sp.* B21-1 à un optimum de pH de 11,5 (**Fujiwara et al., 1991**), celle de la protéase BYA produite par *Bacillus sp.* Y est active optimalement dans le rang du pH de 10 - 12,5 et stable dans l'intervalle du pH 6,5 - 13 (**Shimogaki et al., 1991**).

10. 5. Effet de l'EDTA :

Après l'incubation de l'échantillon avec l'EDTA (deux concentrations sont testées 10^{-3} et 10^{-2} M) dans un tampon Tris/HCl 0,2 M (pH = 8) le système protéolytique garde respectivement: 96,4 et 92,6 % de son activité initiale. On déduit qu'on est en présence d'une sérine protéase.

11. Purification par précipitation :

Après 24 heures d'incubation à 30 °C, sur le milieu élaboré (CSL à 9 % de ms et 0,08 % de CaCl_2); le filtrat du milieu de fermentation contient 0,0226 mg/ml de protéines avec une activité spécifique de 6,10 U/mg.

La précipitation par l'éthanol a permis d'obtenir : 0,0051 mg/ml de protéines et une activité spécifique de 13,35 U/mg.

Le rapport des deux activités est de 2,2. Ainsi l'enzyme est purifiée deux fois. Ces résultats confirment ceux de **Millet (1968)** qui a utilisé l'éthanol à 95 % pour purifier une mégatéropeptidase de 2,54 fois.

Par ailleurs avec le sulfate d'ammonium le rapport de deux activités spécifiques est de :

- 4,18 pour une protéase alcaline de *Bacillus sp.* (**Fijuwara et Yamamoto, 1987**);
- 2,3 pour une protéase alcaline de *Bacillus thuringiensis* (**Kunitate et al., 1989**);
- de 2,24 pour une protéase alcaline de *Bacillus sp. Y* (**Shimogaki et al., 1991**).

Conclusion générale

Conclusion générale :

Par un screening bien orienté visant la sélection des souches hautement productrices. Pour une éventuelle exploitation industrielle, on a mis à l'écart des souches hémolytiques pour des fins de sécurité, le taux de telles souches est important.

L'identification à l'espèce des souches retenues nous a permis de s'orienter vers cinq (05) espèces différentes dont plus de 50 % sont alignées aux deux espèces types *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*.

En effet, la souche T₂₃ la plus productrice est identifiée comme un *Bacillus licheniformis*.

L'étude de la stabilité est un critère important pour la sélection de tels microorganismes. Elle donne une idée plus précise sur leurs capacités protéolytiques. La souche sélectionnée garde sa stabilité d'activité après des repiquages successifs.

La production des protéases par les cultures mixtes interespèces est faible par rapport à celle des souches pures performantes qui proviennent des biotopes humides (sédiments des cours d'eau). En effet 90 % des souches actives proviennent de ces biotopes.

L'optimisation de la composition du milieu et des conditions de cultures par la matrice de Plakett - Burman, qui est une démarche rapide et fiable ; nous a permis en un minimum d'essai (16 essais) de déterminer les facteurs influençant la production du système protéolytique chez la souche sélectionnée. Ainsi le taux du CSL, la température et les sels sont trois facteurs dont l'effet est significatif sur cette production.

Par la suite, le plan composé de Box et Wilson pour ces trois facteurs a permis la détermination de leurs valeurs optimales : le CSL à 9 % de matière sèche, 0,08 % de CaCl₂ et 40 °C sont les conditions favorables pour une production optimale.

L'analyse statistique a montré l'effet du pH et de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme, ajoutée à son indifférence de l'EDTA, elle rappelle les sérines protéases alcalines de *Bacillus licheniformis*, citées par la bibliographie consultée.

Il serait intéressant de compléter ce travail par :

- une étude de l'écologie de ces microorganismes;
- l'établissement de la relation entre l'aspect taxonomique et la production enzymatique;
- l'étude de la spécificité d'action de la protéase;
- l'étude approfondie de la thermorésistance de ces fascinantes bactéries;
- l'amélioration de la productivité par des méthodes chimiques et génétiques;
- la purification et le séquençage de l'enzyme.

Bibliographie

- Arbige, V. A., Bulthuis, B. A., Shultz, J. and Crabb, D. (1993).** Fermentation of *Bacillus* in : *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. Biochemistry, physiology and molecular genetic (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R.), 871 - 895. American society for microbiology, Washington D. C.
- Aronson, A. I. (1973).** The function of various proteases in bacterial sporulation. Colloques internationaux du CNRS N° 227. Régulation de la sporulation microbienne CNRS PARIS.
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S. and Collins, M. D. (1991).** Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small - subunit - ribosomal RNA sequences. Letters in applied microbiology, Vol. 13, 202 - 206.
- Balassa, G., Dod, B., Milhaud, P., Silva, M. T. and Sousa, J. F. C. (1973).** Sporulation mutants altered in the control of late steps of spore formation. Colloques internationaux du CNRS N° 227. Régulation de la sporulation microbienne CNRS PARIS.
- Bealin-Kelly, F., Kelly, C. T. and Fogarty, W. M. (1991).** Studies on thermostability of the α -amylase of *Bacillus caldovelox*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 332 - 336.
- Bloomfield, S. F. and Arthur, M. (1989).** Effect of chlorine realising agents on *Bacillus subtilis* vegetative cells and spores in letters in applied microbiology, Vol. 8, 101 - 104.
- Box, G. E. P. and Wilson, K. B. (1951).** On the experimental attainment of optimum conditions. J. Royal statistical society, Vol. XIII, N° 1, 1 - 49.

- Brafoed, H. C. (1981).** Production of enzymes by fermentation. Assays in applied in Microbiology. ed., Norris, J. R. and Richmond Vol. 2, 1 - 31.
- Brevet, J. et Vellard, G. (1973).** Changement de spécifité de l'ARN polymérase au début de la sporulation de *Bacillus subtilis* : une perte d'activité du facteur Sigma végétatif. Colloques internationaux CNRS N° 227. Régulation de la sporulation microbienne CNRS PARIS.
- Bull, A. T., Huck, T. A. and Bushell, M. E. (1990).** Optimization in microbial process development and operation. In : Microbial growth dynamycs. Poole, R. K., Bazin, M. J. and Keevil, C. W. (ed). IRL Press, Oxford, 145 - 168.
- Bulla, L. A. and Hoch, J. A. (1985).** Biology of the *Bacillus* in : Biology of industrial microorganisms. (Demain, A. L. and Soloman, N. A.). Edition Benjamin Cummings publishing company. INC. California.
- Cartier, D. V. and Sykes, G. (1961).** The assay of enzyme activity by the plate-diffusion technique. Journal of pharm. ecology. Vol. 13, 195 - 199.
- Castro, P. M. L., Hayter, P. M., Ison, A. P. and Bull, A. T. (1992).** Application of statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by chinese hamster overy cells. appl. microbiol. Biotechnol. 38, 84 - 90.
- Castro, G. R., Mendez, B. S. and Sinêz, F. (1993).** Amylolytic enzymes produced by *Bacillus amyloliquefaciens* MIR - 41 in Batch and continous culture. J. chem. Tech. Biotechnol. 56, 289 - 294.

- Chambeliss, G. H. (1993).** Carbon source-mediated catabolite repression In : *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R.), 213 - 219.
- Chambeliss, G. H. et Legaut.Demare, L. (1973).** Etude de la traduction in vitro chez *Bacillus Subtilis* au cours de la spoulation. Colloques internationaux CNRS N° 227. Régulation de la sporulation microbiène CNRS PARIS.
- Chandrasekaran, S. and Dhar, S. C. (1982).** A rapid method to determine the ability of different bactreial cultures of the production of extracellular protease. *Leather science*, Vol. 29. (9). 430-435.
- Cheung, L. A., Ying, R. and Fischetti, V. A. (1991).** A method to detect proteinase activity using unprocessed X-ray films. *Analytical Biochimistry*. 193, 20 - 23.
- Claus, D. and Berkely, R. C. W. (1986).** Genus *Bacillus* in Bergey's. Manual of systematic bacteriology, Vol. 2, 1105 - 1139.
- Clausen, V., Jones, J. G. and Stackebrandt, E. (1985).** 16 S ribosomal RNA analysis of *Filibacter limicola* indicates a close relationship to genus *Bacillus*. *Journal of general microbiology*. 131, 2659 - 2663.
- De Meo, M., Laget, M., Phan Tan Luu, R., Mathieux D. and Dume, G. (1985).** Application of experimental design of experiments for media optimization and culture conditions in fermentation. *Biosciences*. 4, 99 - 102.
- Debabov, V. G. (1982).** The industrial use of bacilli. In : The molecular biology of bacilli. Vol. 1, *Bacillus subtilis*. Dubneau, D. A. (ed). Academic press, New York, 331 - 370.

- Dercova, K, Augustin, J. and Krajcova, D. (1992).** Cell growth and α -amylase production characteristics of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.*, Vol. **37**, 17 - 23.
- Deshayes, C. (1980).** Utilisation des modèles mathématiques pour l'optimisation en fermentation. *Bull. Soc. Chim. France*, 1 - 2; 24 - 34.
- Desmazeaud, M. J. et Hermier, J. H. (1971).** Spécificité de la protéase neutre de *Micrococcus caseolyticus*. *Env. J. Biochem.*, **19**, 51 - 55.
- Doi, R. H. (1991).** Proteolytic activities in *Bacillus* current opinion in *Biotechnology*, **2**, 682 - 684.
- Eke, M. A., Alderson, G. and Cross, T. (1989).** An actynomycete that changes wall composition during sporulation. *Letters in applied Microbiology*, Vol. **9**, 1 - 4.
- El mayda, E., Paquet, D., Ramet, J. R. (1985).** Enzymatic proteolysis of milk proteins, in a salt environment with a *Bacillus subtilis* neutral protease preparation. *Journal of food science*, **50**, 1745 - 1746.
- El mayda, E., Paquet , D., Ramet, J. R. and Linden, G. (1986).** Proteolytic activity of *Bacillus subtilis* neutral protease preparation upon caseins and whey proteins of cow's milk. *J. dairy, sci*, **69**, 305 - 310.
- Fogarty, W. M., Griffin, P. J. and Joyce, A. M. (1974).** Enzymes of *Bacillus* species. *Process Biochemistry*, Sep., 27 - 35.
- Fijuwara, N., TSUMIYA, T., Katada, T., Hosobushy, T. and Yamamoto, K. (1989).** Continious recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme. *Process Biochemistry*, **24**, 155 - 156.

- Fijuwara, N. and YAMAMOTO, K. (1987).** Production of alkaline protease in a low cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. Journal of fermentation technology, Vol. **65**, N° **3**, 345 - 348.
- Fijuwara, N., YAMAMOTO, K. and Masui, A. (1991).** Utilization of a thermostable alkaline protease from a alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray. Journal of fermentation and bioengineering. Vol. **2**, N° **4**, 306 - 308.
- Fusey, P., Oudot, J., Abdelouahid, D. E., Haloui, S. et Roquebert, M. F. (1987).** Capacités dégradatives de bactéries et de champignons isolés d'un sol contaminé par un fuel. Can. J. Microbiol, Vol. **33**, 232 - 243.
- Gordon, R. E., Haynes, W. C. and Hor-Nav Pang, C. (1993).** The genus *Bacillus*. Agricultural hand book n° 427. Washington.
- Haaland, P. D. (1989).** Experimental design in biotechnology M. Dekker, New York.
- Hao, J., Pazlarova, J., strnadova, M., Tichy, P. and Chaloupka, J. (1988).** Effet on temperature on α -amylase DNA replication in *Bacillus subtilis*. Folia Microbiol. **33**, 230 - 233.
- He, X. S., Bruckner, R. and Doi, R. H. (1991).** The protease genes of *bacillus subtilis*, Res. Microbiol. **142**, 797 - 803.
- Heyman, T. et Karmazyn, C. (1973).** Observation sur une souche W 23 de *Bacillus subtilis* sporulant en présence d'un excès de glucose. Colloques internationaux CNRS N° **227**. régulation de la sporulation microbienne CNRS. PARIS.

- Kunitate, A., Okomoto, M. and Ohmori I. (1989).** Purification and characterization of thermostable serine protease from *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Biol. chem.* **53** (12), 3251 - 3256.
- Lamé, H. (1976).** Etude de l'activité protéolytique de quelques bactéries isolées de saucissons. *Revue. Med. vet.* **127-1**, 91 - 100.
- Lenoir, J., Glenza, A., Bergere, J. L., Cerf, O., Choisy, C., Desmazeaud, M. et Hernier, J. (1973).** Les facteurs de production du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. *Le lait*, Tome III, N° **525 - 526**, 246 - 279.
- Liebs, P., Riedel, K., Graba, J. P., Sharapel, D. and Tishler, U. (1988).** Formation of some extracellular enzymes during the exponential growth of *Bacillus subtilis*. *Folia microbial.* **33**, 88 - 95.
- Lopez-Frandino, R., Ramos, M. Fernandez-Garcia, E. and Olano, A. (1991).** Proteolytic activity of two commercial proteinase from *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis* on ovine and bovine caseins. *Journal of dairy Research*, **58**, 461 - 467.
- Losick, R. (1973).** New subunits of RNA polymerase from sporulating *Bacillus subtilis*. *Colloques internationaux CNRS N° 227. Régulation de la sporulation microbienne CNRS. PARIS.*
- Maddox, I. S. and Richerti, S. H. (1977).** Use of response methodology for rapid optimization of microbiological media. *J. appli. Bacteriol.* **43**, 197 - 204.

- Madhavi, D. L., Chano, N., Rajalakshmi, D. and Patwardhan, M. V. (1991).** Computerized optimization of the relative growth of Callus culture of orange fruit tissue and the study of their biochemical properties. *J. exp. Botany*. Vol. **42**, N° **240**, 917 - 923
- Malek, F. (1995).** Etude de la production de protéases extracellulaires chez *Bacillus*. Evaluation semi-quantitative du pouvoir protéolytique et effet des acides aminés sur la production des protéases. Thèse de magister. Institut de Biologie. Université de Tlemcen.
- Markkanen, P. H. and Bailey, M. J. (1975).** Effet of the alteration of aeration and temperature on production of α -amylase by *Bacillus subtilis*. *J. appl. chem. Biotechnol.* 25, 863 - 865.
- Markkanen, P. H. and Enar, T. M. (1972).** The effect of phosphate on α -amylase production and sporulation by *Bacillus subtilis*. *Acta chemica SCANDANAVIKA*, 26, 3543 - 3548.
- Mc Kellar, R. C. and Nichols, N. (1984).** Acid coagulation of evaporated milk by a coculture of *Enterococcus faecium* and *Bacillus subtilis*. *Journal of food protection*, 47, 853 - 856.
- Melansniemi, H. (1987).** Characterisation of α -amylase and pullulanase activities of *Clostridium thermosulfuricum*. Evidence for a novel thermostable amylase. *Biochemical journal*, 193 - 197.

- Mesadek, T., Kunst, F. and Rapoport, G. (1993).** Two-Component regulatory systems .in : *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. Biochemistry, Physiology and Molecular genetics. (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R.), 729 - 745. American society for Microbiology, Washington, D. C.
- Mesadek, T., Kunst, F., Henner, D., Klier, A., Rapoport, G. and Dedonder, R. (1990).** Signal transduction Pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis* : Expression of the regulatory genes and analysis of mutation in deg S and deg U. Journal of bacteriology, Vol. 172, N° 2, 824 - 834. American society for microbiology.
- Millet, J. (1968).** Etude de la mégateriopéptidase. Protéase exocellulaire de *Bacillus megaterium*. I. Purification et propriétés générales. Bull. soc. chim., 51, 61 - 68.
- Millet, J. (1971).** Comparaison entre la séryl protéase extracellulaire et la séryl protéase intracellulaire de *Bacillus subtilis*. Colloques internationaux du CNRS N° 227. Régulation de la sporulation microbienne CNRS. PARIS.
- Millet, J. et Aubert, J. P.(1969).** Etude de la mégateriopéptidase. Protéase exocellulaire de *Bacillus megaterium*. III - Biosynthèse et rôle physiologique. Annales de l'Institut Pasteur, 117, 464 - 473.
- Pairaud, C. (1989).** L'électrophorèse capillaire. Le technoscope de Biofitur, N° 30, 7 - 11.
- Pero, J. and Sloma, A. (1993).** Proteases In : *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria : (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R.) American society for microbiology, Washington. DC, 939 - 953.

- Phan Tan Luu, R., Bazard, D., Flayeux, R., Lehude, J. M., Parisot, M., Vinh, T. et Moll, M. (1979).** Application de la méthodologie de recherche expérimentale. Plans d'expériences factoriels et simplex séquentiels - Exemples. *Ind. Alim. Agr.* **5**, 441 - 448.
- Plackett, K. L. and Burman, J. P. (1946).** The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, **33**, 305 - 325.
- Priest, F. G. (1977).** Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological reviews*, Vol. **41**, N° **3**, 711 - 753.
- Priest, F. G. (1981).** DNA homology in the genus *Bacillus*, in : The aerobic endospore-forming bacteria (Berkely, R. C. W. and Goodfellow, M). Ed. Academic press. London, 33 - 57.
- Priest, F. G. and Grigorova, R. (1990).** Methods for studying the ecology of Endospore-Forming bacteria. *Methods in Microbiology*, Vol. **2**, 566 - 588.
- Proth, J., Mouray, A. et Kilbertus, G. (1976).** Milieux a base de poudre de muscle pour la numération des microorganismes protéolytiques. *Separatum experianta*. **32**, 1524 - 1525.
- Rapoport, G. (1989).** Chromosomal rearrangement during sporulation of *Bacillus subtilis* leads to the generation of a new sigma factor, *Res. Microbiol.*, **140**, 275 - 280.

- Schaeffer, P., Cami, B. et Brevet, J. (1973).** Accumulation d'esters phosphoryles inusuels et initiation de la sporulation chez *Bacillus subtilis*. Colloques internationaux CNRS N° 227. Régulation de la sporulation microbienne. CNRS. PARIS.
- Shimogaki, H., Takeuchi, K., Nishinto, T., Ohdera, M., Kudo, T., Ohba, K., Iwama, M. and Irie, M. (1991).** Purification and properties of a novel surface-active Agent and alkaline resistant protease from *Bacillus sp.*, Agric. Biol. chem. 55 (9), 2251 - 2258.
- Sietske de Boer, A. and Diderchsen, B. (1991).** On the safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Review. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 1 - 4.
- Sneath, P. H. A. (1986).** Endospore forming Gram-positive rods and Cocci. in. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2, 1104 - 1139.
- Sokol, S. A., Ohman, D. E. and Iglewski, B. H. (1979).** A more sensitive plate assay for detection for protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. Vol. 6, apr, 538 - 540.
- Srivastava, R. A. K. and Bruah, J. N. (1986).** Culture conditions for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Env. Microbiol. Vol. 52, N° 1, 179 - 184.
- Tankova, A., Manolov, R. and Dobрева, E. (1993).** Thermostable α -amylase from depressed *Bacillus licheniformis* produced in high yields of glucose. Process biochemistry. Vol. 28, 539 - 542.

- Trach, K. A., Chapman, G. W., Piggot, P. J. and Hoch, J. A. (1985).** Deduced product of the stage 0 sporulation gene SpoOF shares homology with SpoOA, ompR, and Sfr A proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7260-7264.
- Turgeon, S. L., Bard, C. et Gauthier, (1991).** Comparaison de trois méthodes pour la mesure de degré d'hydrolyse de protéines laitières modifiées enzymatiquement. J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment., 24, 14 - 18.
- Vahmaanpera, J. (1990).** Development of *Bacillus* strains for industrial enzyme production by gene technology. PHD Thesis. University of Helsinki. 81 p.
- Vahmaanpera, J., Nyberg, P. M. A., Tanner, R., Pohjonen, E., Bergelin, R. and Korhola, M. (1987).** Industrial production of α -amylase by genetically engineered *Bacillus*. Enzyme Microb. Technol., Vol. 9, 546 - 549.
- Ward, O. P. (1983).** Proteinases in : Microbial enzymes and Biotechnology (Fogarty, W. M.). Applied science publishers. New York. pp 512.
- Welker, N. E. and Campell, L. L. (1967).** Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilus*. J. Bacteriol. 94, 1124 - 1130.
- Willemsse-Collinet, M. F., Turnbull, P. C. B., Hospers, G. T. and Van Oppenraay, A.B.W.G. (1981).** Computer-assisted method for identification of *Bacillus species* isolated from liquid antiacids. Applied and environmental. Microbiology. Vol. 41, 169 - 172.
- Wiseman, N; (1992).** Designer enzyme and cell. application in industry and in environmental monitoring. J. Chem. Tech. Biotechnol. Vol. 56, 3 -13.

Wolf, J. and Barker, A. N. (1968). The genus *Bacillus* : Aids to the identification of its species in : identification methods for microbiology. Gibbs, B. M. and Shampton, D. A. Part B. Academic press, London, New York, 93 - 109.

Wright, S. J., Linton, C. J., Edward, R. A. and Drury, E. (1991). Isoamyl alcohol (3-methyl - 1-butanol), a volatile anti-cyanobacterial phytotoxic product of some *Bacillus spp.* Letters in applied Microbiology, Vol. 13, 130 - 132.

Zhang, X. Z., Xie, S., Wu, X., Jim, F. and Li, X. (1994). Purification and characterisation of thermostable α -amylase II. From *Bacillus sp.* JF2 strain. Enzyme Microbiol. Technol. Vol. 16, 985 - 990.

Annexes

Composition du milieu de culture : TGEA (tryptone, glucose, extrait de levures, agar).

Tryptone	: 5 g /l
Extrait de levures	: 2,5 g /l
Glucose	: 1 g /l
Agar	: 15 g /l
Eau distillée	: 1000 ml

Souches	Codes
I	I ₁ , I ₂ , I ₃ , I ₄ , I ₅ , I ₆ , I ₇ , I ₈ , I ₉ , I ₁₀ , I ₁₁ , I ₁₂ , I ₁₃ , I ₁₄ , I ₁₅ , I ₁₆ , I ₁₇ , I ₁₈ , I ₁₉ , I ₂₀ , I ₂₁ , I ₂₂ , I ₂₃ , I ₂₄ , I ₂₅ , I ₂₆ , I ₂₇ , I ₂₈ , I ₂₉ , I ₃₀ , I ₃₁ , I ₃₂ , I ₃₃ , I ₃₄ , I ₃₅ , I ₃₆ , I ₃₇ , I ₃₈ , I ₃₉ , I ₄₀ , I ₄₁ , I ₄₂ , I ₄₃ , I ₄₄ , I ₄₅ .
K	K ₁ , K ₂ , K ₃ , K ₄ , K ₅ , K ₆ , K ₇ , K ₈ , K ₉ , K ₁₀ , K ₁₁ , K ₁₂ , K ₁₃ , K ₁₄ , K ₁₅ , K ₁₆ , K ₁₇ , K ₁₈ , K ₁₉ , K ₂₀ , K ₂₁ , K ₂₂ , K ₂₃ , K ₂₄ , K ₂₅ , K ₂₆ , K ₂₇ , K ₂₈ , K ₂₉ , K ₃₀ , K ₃₁ , K ₃₂ , K ₃₃ , K ₃₄ , K ₃₅ , K ₃₆ , K ₃₇ , K ₃₈ , K ₃₉ , K ₄₀ , K ₄₁ , K ₄₂ , K ₄₃ , K ₄₄ , K ₄₅ , K ₄₆ .
A	A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄ , A ₅ , A ₆ , A ₇ , A ₈ , A ₉ , A ₁₀ , A ₁₁ , A ₁₂ , A ₁₃ , A ₁₄ , A ₁₅ .
S	S ₁ , S ₂ , S ₃ , S ₄ , S ₅ , S ₆ , S ₇ , S ₈ , S ₉ , S ₁₀ , S ₁₁ , S ₁₂ , S ₁₃ , S ₁₄ , S ₁₅ , S ₁₆ , S ₁₇ , S ₁₈ , S ₁₉ , S ₂₀ , S ₂₁ , S ₂₂ , S ₂₃ , S ₂₄ , S ₂₅ , S ₂₆ , S ₂₇ , S ₂₈ , S ₂₉ , S ₃₀ , S ₃₁ , S ₃₂ , S ₃₃ , S ₃₄ , S ₃₅ , S ₃₆ , S ₃₇ , S ₃₈ , S ₃₉ , S ₄₀ , S ₄₁ , S ₄₂ , S ₄₃ , S ₄₄ , S ₄₅ , S ₄₆ .
E	E ₁ , E ₂ , E ₃ , E ₄ , E ₅ , E ₆ , E ₇ , E ₈ , E ₉ , E ₁₀ , E ₁₁ , E ₁₂ , E ₁₃ , E ₁₄ .
T	T ₁ , T ₂ , T ₃ , T ₄ , T ₅ , T ₆ , T ₇ , T ₈ , T ₉ , T ₁₀ , T ₁₁ , T ₁₂ , T ₁₃ , T ₁₄ , T ₁₅ , T ₁₆ , T ₁₇ , T ₁₈ , T ₁₉ , T ₂₀ , T ₂₁ , T ₂₂ , T ₂₃ , T ₂₄ , T ₂₅ , T ₂₆ , T ₂₇ , T ₂₈ , T ₂₉ , T ₃₀ , T ₃₁ , T ₃₂ , T ₃₃ , T ₃₄ , T ₃₅ , T ₃₆ , T ₃₇ , T ₃₈ , T ₃₉ , T ₄₀ , T ₄₁ , T ₄₂ , T ₄₃ , T ₄₄ , T ₄₅ , T ₄₆ , T ₄₇ , T ₄₈ , T ₄₉ , T ₅₀ , T ₅₁ , T ₅₂ .
M	M ₁ , M ₂ , M ₃ , M ₄ , M ₅ , M ₆ , M ₇ , M ₈ , M ₉ , M ₁₀ , M ₁₁ , M ₁₂ , M ₁₃ , M ₁₄ , M ₁₅ , M ₁₆ , M ₁₇ , M ₁₈ , M ₁₉ , M ₂₀ , M ₂₁ , M ₂₂ , M ₂₃ , M ₂₄ , M ₂₅ , M ₂₆ , M ₂₇ , M ₂₈ , M ₂₉ , M ₃₀ , M ₃₁ , M ₃₂ , M ₃₃ , M ₃₄ , M ₃₅ , M ₃₆ , M ₃₇ , M ₃₈ , M ₃₉ , M ₄₀ , M ₄₁ , M ₄₂ , M ₄₃ , M ₄₄ , M ₄₅ , M ₄₆ , M ₄₇ , M ₄₈ , M ₄₉ , M ₅₀ , M ₅₁ , M ₅₂ .

Tableau : générateur de base pour la construction des matrices de Plackett - Burman.

N = 8	+++ - + - -
N = 12	++ - + + + - - - + -
N = 16	++++ - + - + + - - + - - -
N = 20	++ - - + + + + - + - + - - - - + + -

N = 44	++ - - + - + - - + + + - + + + + - - - + - + + + - - - - + - - - + + - + - + + -

Tableau : valeur de α pour les plans composites centrés.

Plan factoriel	NomMre de points axiaux	Valeur de
2^2	4	1,414
2^3	6	1,682
2^4	8	2,000
2^5	10	2,378
2^{5-1}	10	2,000
2^6	12	2,828
2^{6-1}	12	2,378
2^{7-1}	12	2,378
2^{8-1}	16	3,364