

UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté des Sciences

Département de Chimie

THESE DE DOCTORAT-LMD-

Spécialité : Chimie des Substances Naturelles et de BioMolécules

Production, purification et caractérisation biochimique et moléculaire d'une nouvelle protéase nommée SAPHM de la souche K7A de *Bacillus licheniformis*, isolée de la région de Hassi Messaoud, sud-est d'Ouargla en Algérie

Par

Raziqa HADJIDJ

Devant le jury, composé de :

Prof.	Omar BOURAS (USD-Blida 1)	Président
Dr.	Abdelhak ROUIBI (USD-Blida 1)	Examineur
Prof.	Abdelkarim KAMELI (ENS- Kouba- Alger)	Examineur
Prof.	Rabeh FAURAR ELAIDI (ENS- Kouba- Alger)	Examineur
Dr.	Bassem JAOUADI (CBS-Tunisie)	Invité
Prof.	Abdelmalek BADIS (USD-Blida 1)	Directeur de Thèse
Prof.	Mohamed EL HATTAB (USD-Blida 1)	Co-directeur de thèse

Blida, 01 Octobre 2019

UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté des Sciences

Département de Chimie

THESE DE DOCTORAT-LMD

Spécialité : Chimie des Substances Naturelles et de BioMolécules

Production, purification et caractérisation biochimique et moléculaire d'une nouvelle protéase nommée SAPHM de la souche K7A de *Bacillus licheniformis*, isolée de la région de Hassi Messaoud, sud-est d'Ouargla en Algérie

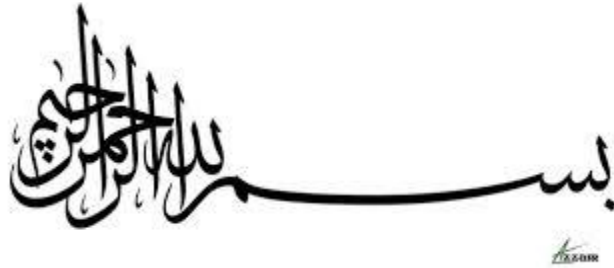
Par

Raziqa HADJIDJ

Devant le jury, composé de :

Prof.	Omar BOURAS (USD-Blida 1)	Président
Dr.	Abdelhak ROUIBI (USD-Blida 1)	Examineur
Prof.	Abdelkarim KAMELI (ENS- Kouba- Alger)	Examineur
Prof.	Rabeh FAURAR ELAIDI (ENS- Kouba- Alger)	Examineur
Dr.	Bassem JAOUADI (CBS-Tunisie)	Invité
Prof.	Abdelmalek BADIS (USD-Blida 1)	Directeur de Thèse
Prof.	Mohamed EL HATTAB (USD-Blida 1)	Co-directeur de thèse

Blida, 01 Octobre 2019



قُلْ إِنِّي هَدَانِي رَبِّي إِلَى صِرَاطٍ مُسْتَقِيمٍ دِينًا قِيَمًا مِثَّةَ
إِبْرَاهِيمَ حَنِيفًا وَمَا كَانَ مِنَ الْمُشْرِكِينَ (*) قُلْ إِنَّ صَلَاتِي
وَنُفْسِي وَمَحْيَايَ وَمَمَاتِي لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ (*) لَا شَرِيكَ لَهُ
وَبَذَلِكَ أُمِرْتُ وَأَنَا أَوَّلُ الْمُسْلِمِينَ

الأنعام 161-163

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux.

Ce qui signifie: 161. Dis: «Moi, mon Seigneur m'a guidé vers un chemin droit, une religion droite, la religion d'Abraham, le soumis exclusivement à Allah et qui n'était point parmi les associateurs».

162. Dis: «En vérité, ma Salat, mes actes de dévotion, ma vie et ma mort appartiennent à Allah, Seigneur de l'Univers».

163. A Lui nul associé! Et voilà ce qu'il m'a été ordonné, et je suis le premier à me soumettre».

Sôurat al-Al-Anam (Les bestiaux) 161-163.

ملخص :

يمثل هذا العمل البحث عن أنشطة جديدة لإنزيمات البروتياز والأكثر فاعلية وذات أهمية صناعية. أثناء غرلة سلالات جديدة منتجة للبروتياز التي تعمل تحت الظروف الطبيعية القاسية، تم عزل سلالة بكتيرية من عينة تربة من منطقة حاسي مسعود (ورقلة، الجزائر) رُمِزَتْ بـ K7A وتم تحديدها بـ *Bacillus licheniformis* والتي شكلت موضوع بحث لهذه الدراسة.

كان اهتمامنا في بداية هذا العمل تطوير وسط بسيط لإنتاج البروتياز القلوية بواسطة السلالة K7A. كان الانتاج باستعمال الحوالة 12500 وحدة/مل عند 45 درجة مئوية بعد 24 ساعة من التحضين. أدت تقنيات الاستخلاص المستخدمة في هذا العمل إلى الحصول على محلول إنزيمي متجانس بوزن جزيئي 30 كيلو دالتون وتم تحديده بواسطة SDS-PAGE. كما تم التحقق من نقاوته عن طريق تحديد تسلسل الأحماض الأمينية الطرفية-NH₂ (26 حمض)، مما يدل على تجانس قوي مع بروتياز سيرين المنتجة من طرف سلالات *Bacillus* بدرجة تطابق مقدرة بـ 97%.

تم الحصول على الأنشطة الإنزيمية المثلى في درجة حموضة 10 و درجة حرارة 70 م° على ركيزة الكازئين. يحافظ هذا الإنزيم على درجة عالية من الاستقرار في درجة الحموضة القاعدية (7-12) لمدة 24 ساعة. وهو إنزيم ينتمي إلى عائلة سيرين بروتياز لأنه يثبط من قبل المثبطات الخاصة لإنزيم سيرين (PMSF و DFP). يتم تحسين قدرته التنشيطية و التحملية للحرارة بشكل كبير بوجود الكالسيوم 2 ملمول و السوربيتول بنسبة 10%. يتميز SAPHM بنوعية عالية فيما يتعلق بركائز البروتين وله كفاءة تحفيزية أفضل مقارنة مع بروتياز الألكالاز ايلترا 2.5 لىتر. كما أنه يحافظ على نشاطه بوجود مختلف مفاعلات السطح الكيماوية (Triton X-100، Tween 80، Tween 20 و SDS) ومواد التبييض (بربورات الصوديوم، الماء الأكسجيني واليوريا).

من ناحية أخرى، تم استنساخ الجين *saphm* المشفر للبروتياز SAPHM الجديد في نظام *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. إن البروتين المصنع (rSAPHM) المعبر عنه في نظام *E. coli* BL21 (DE3) pLysS في الوسط خارج الخلوي، له خصائص مماثلة لتلك الموجودة للبروتين الأصلي (SAPHM).

يُظهرُ البروتياز SAPHM نشاطا جيدا و استقرارا توافقا في وجود بعض المذيبات العضوية . يتمتع بروتياز SAPHM بثبات ملحوظ وتوافق مع المنظفات السائلة والصلبة (Dipex، Tide، Pril-iSiS)، مقارنة بالإنزيم التجاري الألكالاز ايلترا 2.5 لىتر. بالإضافة إلى ذلك يحسن بروتياز SAPHM المضاف إلى محلول المنظف Pril-iSiS إزالة لون بقع الدم بشكل أفضل.

الكلمات المفتاحية : *Bacillus licheniformis*، البروتياز القاعدية، التنقية، الاستنساخ، محاليل عضوية، مواد التنظيف.

Résumé :

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles activités protéasiques, plus efficaces et d'intérêt industriel. Au cours d'un criblage de nouvelles souches productrices de protéases agissant dans des conditions extrêmes, une souche bactérienne a été isolée à partir d'un échantillon du sol de la région de Hassi Messaoud (Ouargla, Algérie). La souche K7A a été identifiée comme *Bacillus licheniformis*, et a fait l'objet de ce travail.

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'élaboration d'un milieu simple pour la production de protéases alcalines par la souche K7A de *Bacillus licheniformis*. La production, à l'échelle Erlenmeyer, est optimale de 12500 U/mL à 45 °C après 24 h de culture. Les techniques de purification utilisées dans ce travail, ont permis d'aboutir à une solution enzymatique homogène ayant une masse moléculaire de 30 kDa déterminée par SDS-PAGE. Sa pureté a été également vérifiée par le séquençage de son extrémité NH₂-terminale (26 aa), qui montre une forte homologie avec les protéases à sérine de *Bacillus* avec une identité de 97 %.

L'optimum de l'activité protéase est obtenu à pH 10 et à 70 °C sur caséine. Cette enzyme demeure pratiquement stable aux pH basiques (7-12) pendant 24 h. Il s'agit d'une enzyme appartenant à la famille des protéases à sérine de fait qu'elle est inhibée par les inhibiteurs spécifiques des enzymes à sérine (PMSF et DFP). Sa thermoactivité et sa thermostabilité sont considérablement améliorées par le calcium à 2 mM et le sorbitol à 10 %. La SAPHM se distingue par une large spécificité vis-à-vis des substrats protéiques et elle douée d'une meilleure efficacité catalytique en comparaison avec la protéase Alcalase Ultra 2,5 L. L'enzyme SAPHM présente également une stabilité remarquable en présence des différents tensioactifs (SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 et CTAB) et des agents de blanchiments (Perborate de sodium, H₂O₂ et Urée).

D'autre part, le gène *sapHM* codant la nouvelle protéase SAPHM a été cloné, séquencé et exprimé chez le système *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS. La protéine recombinante (rSAPHM) s'exprimant chez *E. coli* BL21(DE3) pLysS dans l'espace extracellulaire, possède des caractéristiques identiques à celles trouvées pour la protéine native (SAPHM).

La protéase SAPHM montre une bonne activité, stabilité et tolérance en présence de certains solvants organiques, ainsi cette protéase présente une stabilité et compatibilité remarquable avec les détergents liquides et solides (Pril-iSiS, Tide, Dipex, Nadhif, Dixan et Skip) par rapport à l'enzyme commerciale Alcalase Ultra 2,5 L. Egalement l'ajout de la protéase SAPHM à la solution détergente améliore les performances du détergent Pril-iSiS dans le sens d'une meilleure décoloration des taches du sang.

Mots clés : *Bacillus licheniformis*, Protéase alcaline, Purification, Clonage, Solvants organique, Détergence.

Abstract:

The present work is part of the search for new and more effective protease activities of industrial interest. During a screening of new protease producing strains acting under extreme conditions, a bacterial strain was isolated from a soil sample from the Hassi Messaoud region (Ouargla, Algeria). The K7A strain has been identified as *Bacillus licheniformis*, and has been the subject of this work.

In the course of this work, we are interested at first in the elaboration interested in the development of a simple medium for the production of alkaline proteases by the K7A strain of *Bacillus licheniformis*. The production, on the Erlenmeyer scale, is optimal of 12500 U/mL at 45 °C after 24 h of culture. The purification techniques used in this work led to a homogeneous enzyme solution having a molecular weight of 30 kDa determined by SDS-PAGE. Its purity was also verified by the sequencing of its NH₂-terminal aminoacids (26 aa), which shows a strong homology with *Bacillus* serine proteases with an identity of 97%.

The optimum of the protease activity is obtained at pH 10 and at 70 °C on casein. This enzyme remains virtually stable at basic pH (7-12) for 24 h. It is an enzyme belonging to the family of serine proteases where it is inhibited by specific serine enzyme inhibitors (PMSF and DFP). Its thermoactivity and thermostability are considerably improved by calcium at 2 mM and sorbitol at 10 %. The SAPHM distinguished by a wide broad specificity with respect to protein substrates and it has a better catalytic efficiency in comparison with the Ultra 2.5 L Alcalase protease. The SAPHM enzyme has also a remarkable stability in the presence of different surfactants (SDS, Tween 20, Tween 80 and Triton X-100, CTAB) and bleaching agents (sodium perborate, H₂O₂ and Urea).

On the other hand, the saphm gene encoding the new SAPHM protease has been cloned, sequenced and expressed in the *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS system. The recombinant protein (rSAPHM) expressed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS in the extracellular space, has identical to those found for the native protein (SAPHM).

The SAPHM protease shows good activity, stability and tolerance in the presence of certain organic solvents. These protease has a remarkable stability and compatibility with liquid and solid detergents (Pril-iSiS, Tide, Dipex, Nadhif, Dixan and Skip) compared to the commercial enzyme Alcalase Ultra 2.5. Also adding the SAPHM protease to the detergent solution improves the performance of the Pril-iSiS detergent with better blood stains discolouration.

Keywords : *Bacillus licheniformis*, Alkaline protease, Purification, Cloning, Organic solvents, Detergence.

DEDICACES

A cœur vaillant rien d'impossible, à conscience tranquille tout est accessible

Quand il y a la soif d'apprendre, tout vient à point à qui sait attendre

Quand il y a le souci de réaliser un dessein, tout devient facile pour arriver à nos fins

Malgré les obstacles qui s'opposent, en dépit des difficultés qui s'interposent

Les études sont avant tout, notre unique et seul atout

Ils représentent la lumière de notre existence, l'étoile brillante de notre réjouissance

Comme un vol de gerfauts hors du charnier natal, Nous partons ivres d'un rêve héroïque et brutal

Espérant des lendemains épiques, un avenir glorieux et magique

Souhaitant que le fruit de nos efforts fournis, jour et nuit ; nous mènera vers le bonheur fleuri

Nous prions Dieu que ce travail fera signe de persévérance, et que nous serions enchantés Par notre travail honoré

Je dédie cette Thèse...

À ma chère belle mère

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse Dieu le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

À mon cher beau père

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

À mon adorable frère : Lotfi-Abdellatif

Mon unique frère qui m'est le père et la mère, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

Mon ange gardien et mon fidèle compagnant dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de sérénité.

À ma très chère sœur & son mari : Mehdi & Samir

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.

Malgré la distance, vous êtes toujours dans mon cœur, je vous remercie pour votre hospitalité sans égal et votre affection si sincère. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

À ma très chère sœur Wafa

En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent, ce travail est un témoignage de mon attachement et de mon amour.

À Mon cher petit voisin TiFou-

Que Dieu te garde et te donne une longue vie pleine de bonheur, de joie et de succès. Je t'aime beaucoup.

À mes chers oncles –Saleh, Saïd & Lahmissi- et leurs familles

Merci de m'avoir accueilli parmi vous. Puisse ce travail témoigner de ma profonde affection et de ma sincère estime.

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Raziqa

REMERCIEMENTS

Une page va bientôt se tourner, cette thèse s'achève et voici le moment de laisser une trace écrite afin de témoigner ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont entouré et encouragé durant ma thèse. Voici certainement les pages du manuscrit de thèse les plus difficiles à écrire. Comment exprimer avec exactitude toute la gratitude que l'on éprouve envers chaque personne ayant pris part de près ou de loin à ce projet ? La difficulté est d'en oublier le moins possible et de trouver les mots justes.

Ce travail a été réalisé en grande partie au sein du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes (LBMIE) au Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Sfax, TUNISIE, sous la direction scientifique de Monsieur le **Professeur Abdelmalek BADIS**, Professeur à l'Université Blida 1 et chercheur associé au Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) à Bou Ismaïl, Tipaza (Algérie). Ce travail entre dans le cadre du Projet de Recherche Conjoint bilatéral Algéro-Tunisien 2012-2018_Code : TA/04/2012_Acronyme : TNDZ-MicrooZymes JAOUADI/BADIS entre le LBMIE-CBS, le CNRDPA et Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (Université de Blida 1). Intitulé du projet : «*Criblage, étude biochimique et moléculaire, amélioration et application industrielle et environnementale de protéases et peroxydases de microorganismes pour la détergence, la tannerie et le biotraitement des eaux de mer polluées*» sous la coordination scientifique du **Professeur Abdelmalek BADIS** (côté Algérien) et **Dr. Bassem JAOUADI** (côté Tunisien).

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à Monsieur le **Professeur Abdelmalek BADIS**, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse et m'avoir encadré avec efficacité. Je pense en particulier à sa grande exigence, dont mon travail a pu bénéficier. Je vous remercie sincèrement et de tout mon cœur, vous m'avez fait découvrir les méandres du monde de la recherche, ses plaisirs comme ses embûches. Merci pour votre patience inébranlable, votre aide sans limites et votre disponibilité sans relâches sans lesquelles ce travail n'aurait pas pu voir le jour. Plusieurs années de travail fastidieux, laborieux, parfois douloureux nous ont permis

ensemble de finaliser cette thèse et pendant lesquelles vous m'avez appris la rigueur scientifique, l'esprit de l'exactitude et de l'objectivité dans le travail de recherche. Vous m'avez soutenu jusqu'à la dernière minute, un soutien et une attention que je n'oublierais jamais. Je vous exprime ici toute ma gratitude et ma reconnaissance envers tout ce que vous avez fait pour finaliser ce travail.

De même attention, je remercie également Monsieur le Professeur **Mohamed EL HATTAB**, mon Co-directeur de thèse et Directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) à la Faculté des Sciences, Université de Blida 1, pour toutes ses contributions afin de mener à bien ce travail.

Mes remerciements et ma profonde considération vont aux membres du jury pour nous avoir fait l'honneur de juger ce travail, et pour toutes les remarques pertinentes le jour de ma soutenance.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur **Omar BOURAS**, Professeur à l'université de Blida 1, pour le grand honneur qui m'a fait en président le jury de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à Monsieur **Abdelhak ROUIBI**, Maître de Conférences à l'Université de Blida1, à Monsieur **Abdelkrim KAMELI**, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger, et à Monsieur **Rabeh FAURAR ELAIDI**, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger, pour m'avoir honoré de leurs présences à ce jury de thèse.

Je tiens à remercier infiniment madamme le **Professeur Deghbouche Yasmina**, Directrice de Formation Doctorale à la faculté des Sciences, Université Blida 1. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect et mon immense gratitude.

Je remercie également Monsieur le **Professeur Samir BEJAR**, Directeur du LBMIE-CBS, pour l'accueil chaleureux qu'il ma réservé pendant mes stages, pour son aide précieuse, ses conseils et ses encouragements.

C'est avec enthousiasme que j'ai travaillé au quotidien avec **Dr. JAOUADI Bassem**, Maître de Conférences au LBMIE-CBS. Son professionnalisme et son discernement, sa modestie et finalement le soutien qu'il m'a témoigné ont renforcé

ma motivation durant mes séjours au CBS et il m'a soutenue et assisté pendant la réalisation de ce travail. Pour le reste il n'y a pas de mots à écrire sur ce manuscrit. Merci infiniment Mr Bassem.

Je tiens à remercier aussi, mon chère collègue et aimable amie intime **Sondes MECHRI** pour leur sympathie et leur bienveillance à nous besoins dans le laboratoire et au CBS. Elle me tient à cœur d'insister sur ses qualités humaines, sa patience, sa disponibilité, son soutien, ses encouragements...Merci pour tout !!!

Un grand merci à Dr. **Nadia ZARAÏ JAOUADI**, Mme **Monia-MEZGHANI ABID**, & Mr. **Adel HADJBRAHIM**, qui par leur gentillesse, leur tendresse, leur compréhension et leur soutien continu ainsi que leurs encouragements pendant les moments difficiles. Que vous trouvez ici l'expression de mon infinie reconnaissance et mon profond respect. Avec mes vœux de succès et de bonheur.

Mes vifs remerciements à tous mes collègues et amis du LBMIE-CBS pour les discussions scientifiques que nous avons eu, pour leur sympathie, leur encouragement, leur gentillesse ainsi que pour leur amitié qui n'a cessé de croître au fil du temps, qu'ils soient assurés que je n'oublierais pas ces années passées presque quotidiennement en leur compagnie. Je leur souhaite plein de succès dans leurs projets et je cite : **Maroua OMRANE BENMRAD, Hatem REKIK, Fatma GHARBI, Mouna BEN ELHOUL.**

Ma reconnaissance à tout le personnel de CBS qui m'ont permis de réaliser mes travaux de recherche dans une ambiance amicale très agréable. Je resterais toujours marquée par le milieu de vie extraordinaire et la belle ambiance du Laboratoire.

Je remercie également Monsieur le **Dr. Lotfi Loucif**, Directeur du Laboratoire de Biochimie et Microbiologie, Département de Biologie de l'Université de Batna 2, pour l'accueil chaleureux son aide précieuse, les conseils qu'il m'a toujours offert. Qu'il trouve ici l'assurance de ma reconnaissance et mes remerciements les plus distingués.

Mes plus vifs remerciements sont également adressés à l'ensemble d'enseignants du Département De Chimie de l'Université El Hadj Lakhder -Batna 1- et l'Université de Badji Mokhtar- Annaba.

Je tiens à remercier aussi tous les enseignants qui m'ont formé et qui m'ont aidé à acquérir plus de connaissance pendant toutes les années d'étude.

ملخص

RESUME

ABSTRACT

DEDICACES

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS ET UNITES UTILISEES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
Chapitre I : Enzymes protéolytiques : Outils clés en biotechnologie.....	4
I.1. Introduction.....	4
I.2. Marché mondial des enzymes	4
I.3. Origine des enzymes protéolytiques.....	5
I.3.1. Protéases bactériennes	6
I.3.2. Protéases fongiques	6
I.3.3. Protéases de levures	7
I.4. Classification des enzymes protéolytiques	7
I.4.1. Protéases glutamiques	8
I.4.2. Protéases à thréonine.....	8
I.4.3. Protéases aspartiques	8
I.4.4. Protéases à thiol	9
I.4.5. Métalloprotéases	10
I.4.6. Protéases à sérine	12
I.4.7. Les subtilisines de références	14
I.4.7.1. Généralités	14
I.4.7.2. Propeptide de la subtilisine : fonction et structure.....	15
I.4.7.3. Subtilisine de mature	20
I.4.7.4. Clonage, séquençage et expression du gène codant pour la subtilisine	28
I.5. Application biotechnologiques des protéases.....	29
I.5.1. Détergence	30
I.5.1.1. Définition.....	31
I.5.1.2. La composition d'un détergent.....	31
I.5.1.3. Les enzymes détergentes.....	35
I.5.1.4. Critère de choix.....	36

I.5.1.5. Exemple de protéases détergentes	37
I.5.2. Synthèse de peptides	40
I.5.3. Industrie agroalimentaire	43
I.5.4. Synthèse chimique	44
I.5.5. La tannerie.....	45
I.5.6. Traitement des films photographiques.....	45
I.5.7. Traitement des rejets industriels et des ordures ménagères	46
I.5.8. Traitement de la soie	46
I.5.9. L'usage médical l'industrie pharmaceutique	47
I.5.10. Autres applications des protéases	48
I.6. Conclusion.....	49
Chapitre II : Production de protéases alcalines par <i>Bacillus licheniformis</i>	50
II.1. <i>Bacillus licheniformis</i>	50
II.1.1. Présentation de la souche	50
II.1.2. Caractéristiques générales	51
II.1.3. Croissance et métabolisme	52
II.2. Protéases de <i>Bacillus licheniformis</i>	53
II.2.1. Facteurs biotiques influençant la production de protéases	55
II.2.1.1. Influence de la source de carbone.....	55
II.2.1.2. Influence de la source d'azote	56
II.2.1.3. Influence des éléments de trace	57
II.2.2. Facteurs abiotiques influençant la production de protéases	57
II.2.2.1. pH et température.....	57
II.2.2.2. Agitation et aération.....	58
Chapitre III: MATERIEL & METHODES.....	59
III.1. MATERIEL.....	59
III.1.1. Matériel biologique.....	59
III.1.1.1. Souche K7A	59
III.1.1.2. Souche d' <i>Escherichia coli</i>	60
III.1.1.3. Conservation de la souche	60
III.1.2. Produits chimiques et réactifs utilisés	60
III.1.2.1. Milieux de culture.....	60
III.1.2.2. Enzymes.....	61
III.1.2.3. Marqueurs de taille et de masse moléculaire	62
III.1.2.4. Vecteurs	62

III.1.2.5. Les plasmides.....	63
III.1.2.6. Oligonucléotides	64
III.1.3. Solutions et tampons	65
III.2. METHODES	66
III.2.1. Criblage des souches à fort potentiel d'activité protéase	66
III.2.2. Purification et conservation des souches.....	67
III.2.3. Identification phénotypique de la souche sélectionnée	67
III.2.3.1. Etude morphologique et observation microscopique	67
III.2.3.2. Études physiologiques.....	68
III.2.3.3. Études moléculaires	68
III.2.4. Cinétique de croissance	69
III.2.5. Dosage de l'activité enzymatique	69
III.2.5.1. L'activité protéolytique (caséinolytique)	69
III.2.5.2. Méthode de Kembhavi.....	70
III.2.5.3. Dosage de l'activité protéase sur peptide synthétique.....	70
III.2.6. Méthode de biologie moléculaire	71
III.2.6.1. Extraction de l'ADN chromosomique à partir de la souche sélectionnée (K7A)	71
III.2.6.2. Préparation de l'ADN plasmidique par la méthode de lyse alcaline.....	72
III.2.6.3. Électrophorèse sur gel d'agarose	73
III.2.6.4. Quantification de l'ADN.....	73
III.2.6.5. Restriction enzymatique	74
III.2.6.6. Purification de fragments d'ADN par des kits	74
III.2.6.7. Technique de PCR	74
III.2.6.8. Séquençage d'ADN	76
III.2.6.9. Clonage	76
III.2.7. Procédure de purification de la protéase SAPHM	77
III.2.7.1. Traitement thermique.....	77
III.2.7.2. Précipitation fractionné par le sulfate d'ammonium	78
III.2.7.3. Chromatographie échangeuse de cations sur UNO Q12-FPLC	78
III.2.7.4. Chromatographie d'exclusion diffusion sur ZORBAX PSM 300--HPLC.....	79
III.2.8. Méthodes analytiques.....	79
III.2.8.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	79
III.2.8.2. Séparation des protéines sur gel d'acrylamide	80
III.2.8.3. Coloration au bleu de Coomassie.....	80

III.2.8.4. Détermination de l'activité protéasique sur zymogramme	80
III.2.8.5. Détermination des acides aminés des extrémités N-terminales par la méthode automatisée d'Edman	80
III.2.8.6. Spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	81
III.2.8.7. Expression et purification de la protéase SAPHM recombinante	81
III.2.9. Caractérisation biochimique de la protéase SAPHM	82
III.2.9.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la SAPHM.....	82
III.2.9.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la SAPHM	82
III.2.9.3. Effet des inhibiteurs sur l'activité enzymatique de la SAPHM	82
III.2.9.4. Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique de la SAPHM.....	83
III.2.9.5. Effet de la nature du substrat sur l'activité enzymatique de la SAPHM	83
III.2.9.6. Effet des polyols sur la thermostabilité de l'enzyme SAPHM.....	83
III.2.9.7. Effet combiné du calcium et de sorbitol sur la thermostabilité de l'enzyme SAPHM.....	84
III.2.9.8. Détermination des paramètres cinétiques	84
III.2.10. Applications biotechnologiques de la protéase SAPHM de la souche K7A .	84
III.2.10.1. Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité enzymatique de la protéase SAPHM et Thermolysine	84
III.2.10.2. Effet des additifs de détergent sur la stabilité de la protéase SAPHM	85
III.2.10.3. Effet des détergents commerciaux solides et liquides sur l'activité enzymatique de la SAPHM.....	85
III.2.10.4. Test de performance de lavage de la SAPHM.....	85
Chapitre IV : RESULTATS & DISCUSSION	87
Chapitre IV.1 : Isolement, criblage, optimisation et identification de nouvelles souches productrices de protéases alcalines	87
IV.1.1. Introduction	87
IV.1.2. Criblage de souches bactériennes sécrétrices de protéases	88
IV.1.3. Culture des souches sur milieu liquide	89
IV.1.4. Optimisation de la production de protéase par la souche K7A.....	90
IV.1.4.1. Sélection de meilleures sources de carbone et d'azote	90
IV.1.4.1.1. Effet de différentes sources de carbone sur la production de protéase...	90
IV.1.4.1.2. Effet de la concentration de caséine sur la production de protéase	91
IV.1.4.1.3. Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéase	92
IV.1.4.1.4. Effet de la concentration de nitrate d'ammonium sur la production de protéase.....	93
IV.1.5. Cinétique de la production de protéase et de croissance bactérienne de la souche K7A	94

IV.1.6. Identification de la souche K7A	95
IV.1.6.1. Taxonomie classique.....	96
IV.1.6.1.1. Caractéristiques morphologiques et physiologiques	96
IV.1.6.1.2. Identification en utilisant la galerie API 50 CH.....	97
IV.1.6.2. Taxonomie moléculaire	99
IV.1.7. Conclusion	102
Chapitre IV.2 : Purification et caractérisation biochimique d'une nouvelle protease produite par <i>b. licheniformis</i>	103
IV.2.1. Procédure de purification de la protéase produite par la souche K7A de <i>B.</i> <i>licheniformis</i>	103
IV.2.1.1. Traitement thermique	103
IV.2.1.2. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium	104
IV.2.1.3. Chromatographie échangeuse de cations FPLC UNO Q-12.....	104
IV.2.1.4. Chromatographie d'exclusion diffusion sur HPLC-ZORBAX PSM 300 ...	105
IV.2.1.5. Bilan de la purification	106
IV.2.1.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	107
IV.2.1.7. Détermination de la taille de SAPHM par MALDI-TOF/MS	107
IV.2.1.8. Séquençage de l'extrémité NH ₂ -terminale de la SAPHM.....	108
IV.2.2. Caractérisation biochimique des préparations enzymatiques	109
IV.2.2.1. Effet du pH sur l'activité et la thermostabilité de l'enzyme.....	109
IV.2.2.2. Effet de la température sur l'activité et la thermostabilité de l'enzyme	111
IV.2.2.3. Effet des inhibiteurs et des agents réducteurs spécifiques de protéases sur l'activité de SAPHM	114
IV.2.2.4. Effet des ions métalliques sur l'activité de l'enzyme.....	116
IV.2.2.5. Effet des polyols sur la thermostabilité de l'enzyme	117
IV.2.2.6. Effet combiné du calcium et de sorbitol sur la thermostabilité de l'enzyme SAPHM.....	118
IV.2.2.7. Etude de la spécificité et des propriétés cinétiques de la SAPHM	119
IV.2.3. Conclusion	122
Chapitre IV.3 : Caractérisation moléculaire de la protease SAPHM	123
IV.3.1. Introduction	123
IV.3.2. Clonage et séquençage du gène <i>sapHM</i> codant la SAPHM	124
IV.3.3. Surexpression et localisation cellulaire de la SAPHM	127
IV.4. Conclusion	128
Chapitre IV.4 : Potentialités d'applications industrielles de la protease SAPHM : Excellente compatibilité de la synthèse peptidique et aux détergents de lavage ...	129

IV.4.1. Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité des protéases SAPHM et Thermolysine	130
IV.4.2. Etude de l'effet des additifs de détergent sur la stabilité de la protéase SAPHM.....	131
IV.4.3. Stabilité de la protéase SAPHM vis-à-vis des détergents commerciaux liquides et solides testés.....	132
IV.4.4. Tests de performance de lavage de la SAPHM.....	133
IV.4.5. Conclusion	134
CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	135
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
APPENDICES	
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	

LISTE DES FIGURES

Figure I.1: Représentation du marché mondial des enzymes	5
Figure I.2: Structure en ruban d'une peptidase aspartique : la rénine et présentation de son site actif avec les deux résidus d'acides aspartiques.....	9
Figure I.3: Structure en ruban d'une protéase à cystéine « la papaïne »	9
Figure I.4: (A) Structure tridimensionnelle d'un métallo enzyme , (B) Présentation schématique du site active de cette enzyme avec le Glu384, His387, His383, Glu411 et Zn.. <td>10</td>	10
Figure I.5: Classification des métallo-protéases à zinc sur la base de la nature des acides aminés qui forment le site de fixation du zinc. Les acides aminés marqués en rouge représentent les résidus qui lient l'ion Zn ²⁺	12
Figure I.6: Mécanisme d'action des protéases à sérine.....	14
Figure I.7: Structure de Subtilisine BPN' de <i>B. amyloliquefaciens</i> complexée avec son pro-peptide.....	14
Figure I.8: Structure de Subtilisine E de <i>B. subtilis</i> complexée avec son pro-peptide.....	17
Figure I.9: Structure aux R-X du complexe pro-peptide (domaine IMC)-subtilisine BPN'..	18
Figure I.10: Structure tridimensionnelle de la subtilisine Carlsberg.....	21
Figure I.11 : Structure 3D du complexe subtilisine E/pro-peptide..	22
Figure I.12: Représentation schématique du mécanisme catalytique des subtilisines.....	23
Figure I.13: Proportions des différents composants des détergents	32
Figure I.14: Parts du marché européen par société en 1998 et segmentation des différentes formes de lessives : liquides (classiques, concentrés), poudres (classiques, concentrées) et tablettes.....	35
Figure III.1: Photos de sols contaminés par les fluides de forage (Hassi Messaoud)	60
Figure IV.1.1: Mise en évidence d'activité protéolytique produite par la souche bactérienne K7A sur gélose nutritive au lait.....	88
Figure IV.1.2: Cinétique de production de protéase et de croissance bactérienne de la souche K7A.....	94
Figure IV.1.3: Aspect des cellules bactériennes de la souche K7A sous microscope optique G ×100 (Photo originale).....	96
Figure IV.1.4 : Analyse du produit PCR de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche K7A.....	99
Figure IV.1.5 : Carte de restriction du plasmide pHL-16S (4522 pb).	100
Figure IV.1.6 : Séquence nucléotidique du gène d'ARNr 16S (4522 pb) de la souche K7A .	100
Figure IV.1.7: Arbre phylogénétique obtenu après alignement du gène de l'ARNr 16S de la souche K7A (numéro d'accension : MG748549) avec la banque de données GenBank BLAST	101
Figure IV.2.1: Profil d'élution après sortie d'une chromatographie sur colonne échangeuse d'anion FPLC UNO Q-12.....	104
Figure IV.2.2: Profil d'élution de la fraction active après sortie d'une chromatographie sur une colonne de filtration sur gel de l'activité protéase, en utilisant le système HPLC.....	105
Figure IV.2.3: Estimation de la taille de la protéase SAPHM sur SDS-PAGE à 15%.....	107
Figure IV.2.4: Effet du pH sur l'activité de l'enzyme SAPHM	109
Figure IV.2.5: Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme SAPHM.....	110
Figure IV.2.6: Effet de la température sur l'activité de la protéase SAPHM	111
Figure IV.2.7: Etude de la thermostabilité de l'enzyme SAPHM	112
Figure IV.2.8: Effet des polyols sur la thermostabilité de l'enzyme SAPHM	117

Figure IV.2.9: Effet combiné du calcium et de sorbitol sur la thermostabilité de l'enzyme SAPHM.....	118
Figure IV.2.10: Représentations graphiques de Michaelis-Menten (à gauche) et Lineweaver–Burck (à droite) de l'enzyme SAPHM.....	121
Figure IV.3.1: Carte de restriction du vecteur d'expression chez <i>E. coli</i> ptrc99A (4176 pb) et du plasmide pLH4 (5614 pb). Le vecteur ptrc99A possède un site de clonage multiple contenant les sites EcoRI et HindIII	124
Figure IV.3.2: Séquence du gène sapHM.....	125
Figure IV.3.3: Alignement de séquence de la SAPHM.....	126
Figure IV.3.4: Carte de restriction du plasmide pLH4 (5614 pb)	128
Figure IV.4.1: Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité enzymatique des deux protéases SAPHM et Thermolysine.....	130
Figure IV.4.2: Etude de la stabilité de la protéase SAPHM en présence des détergents	132
Figure IV.4.3: Performances des protéases SAPHM et Alcalase Ultra 2,5 L dans le détergent liquide commerciale Pril-iSiS.....	133

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1: Exemple simplifié de formules de poudre de lavage du linge	33
Tableau I.2: Historique de l'innovation technologique dans le domaine des lessives	34
Tableau I.3: Exemple de protéases commerciales utilisées dans les détergents	39
Tableau II.1: Métabolites d'intérêt commercial produits par <i>Bacillus licheniformis</i>	52
Tableau III.1 : Plasmides générés (nommés pHL)	64
Tableau III.2: Les séquences des différents oligonucléotides utilisés	65
Tableau IV.1.1 : Tableau récapitulatif de l'activité protéolytique sur milieu liquide initial de deux souches bactériennes retenues K7A et K2B.....	89
Tableau IV.1.2: Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de protéase par la souche K7A	90
Tableau IV.1.3: Optimisation de la concentration de la caséine pour la croissance et la production de protéase par la souche K7A	91
Tableau IV.1.4: Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéases par la souche K7A	92
Tableau IV.1.5: Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéases par la souche K7A	93
Tableau IV.1.6: Résultats préliminaires des tests d'identification.....	96
Tableau IV.1.7: Résultats de la galerie API 50 CH (fermentation de 49 carbohydrate)	98
Tableau IV.2.1: Bilan de la purification à homogénéité de la protéase SAPHM.....	106
Tableau IV.2.2 : Alignement de la séquence NH2-terminale de la protéase SAPHM avec celles d'autres protéases.....	108
Tableau IV.2.1: Effet de différents inhibiteurs et des agents réducteurs sur la stabilité de la SAPHM.....	114
Tableau IV.2.2: : Effet des ions métalliques sur la stabilité de la SAPHM.....	116
Tableau IV.2.3: Spécificité de la protéase SAPHM vis-à-vis des substrats.....	119
Tableau IV.2.4: Détermination des paramètres cinétiques de la protéase SAPHM	121

Tableau IV.3.1: Comparaison de la surexpression du gène sapHM sous le contrôle de différents promoteurs.....	127
Tableau IV.4.1: Effet des additifs synthétiques testés sur la stabilité de la SAPHM	131

LISTE DES ABREVIATIONS ET UNITES UTILISES

A	aa	: Acide aminé
	AAA	: <i>N</i> -succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Ala- <i>p</i> -nitroanilide
	AAPF	: <i>N</i> -succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe- <i>p</i> -nitroanilide
	AAPL	: <i>N</i> -succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Leu- <i>p</i> -nitroanilide
	AAPM	: <i>N</i> -succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Met- <i>p</i> -nitroanilide
	AAVA	: <i>N</i> -succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Val-L-Ala- <i>p</i> -nitroanilide
	ADN	: Acide désoxyribonucléique
	ADNp	: ADN désoxyribonucléique plasmidique
	Arg (R)	: Argine
	ARN	: Acide ribonucléique
	ARNr	: ARN ribonucléique ribosomique
	AS	: Activité spécifique
	Asn (N)	: Asparagine
	Asp (D)	: Acide aspartique
	ATEE	: <i>N</i> -Acetyl-L-tyrosine ethyl ester monohydrate
B	BAEE	: <i>N</i> -benzyl-L-arginine ethyl ester
	BTNA	: α -benzoyl-L-tyrosine <i>p</i> -nitroanilide
	BET	: Bromure d'éthidium
	BSA	: Bovine serum albumin
	BTEE	: <i>N</i> -benzyl-L-tyrosine ethyl ester
	β -ME	: Béta- mercaptoéthanol
C	CaCl ₂	: Chlorure de calcium
	Cys (C)	: Cystéine
D	Da	: Dalton
	kDa	: kilo Dalton
	DBO	: Demande biologique en oxygène
	DFP	: Di-isopropyl-fluorophosphate
	DMF	: Diméthylformamide
	DMSO	: Diméthylsulfoxyde
	Dntp	: Désoxyribonucléotide triphosphate (N=A, G, C ou T)
	DTNB	: Acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque) ou réactif
	DTT	: Dithiothréitol

d'Ellman

E	EC	: «Enzyme commission»
	EDTA	: Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
	EGTA	: Acide éthylène glycol-bis-(β -aminoethyl éther)-N,N-tétra-acétique
F	FIC	: Folding-incompetent State
	FPLC	: Fast Pressure Liquid Chromatography
G	Gly (G)	: Glycine
	GNL	: Gélose nutritive au lait
H sulfonique	HCl	: Acide chlorhydrique
	HEPES	: Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-pipérazineéthane
	His (H)	: Histidine
	HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
I Biology	Ile (I)	: Isoleucine
	IMC	: Intramolecular chaperon
	IPTG	: Isopropyl- α -D-thiogalactopyranoside
	IUBMB	: International Union of Biochemistry and Molecular
K	Kb	: Kilo base
	KCl	: Chlorure de potassium
L	Leu (L)	: Leucine
	Lys (K)	: Lysine
M	MES	: Acide 2-(N-morphino) éthane sulfonique
	Met (M)	: Méthionine
	mL	: mili Litre
	MM	: Masse Moléculaire
	MT	: Marqueur de taille
N	NaCl	: Chlorure de sodium
	NaOH	: Hydroxyde de sodium
	NEM	: N-éthylmaléimide
P	PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis
	pb	: Paire de base
	PCR	: Polymerase chain reaction
	PEG	: Polyéthylène glycol
	Phe (F)	: Phénylalanine

	PMSF	: Phénylméthylsulfonyl fluorure ou «Phenyl methyl sulfonyl fluoride»
	<i>p</i> -NA	: <i>p</i> -nitroanilide
	Pro (P)	: Proline
Q	qsp	: Quantité suffisante pour
R	rpm	: Rotation par minute
S	SAPHM	: «Serine alkaline protease from <i>Hassi Messaoud</i> »
	SAPB	: «Serine alkaline protease from <i>Bacillus pumilus</i>
CBS»		
	SC	: Subtilisine Carlsberg
	SDS	: «Sodium dodecyl sulfate»
	Ser (S)	: Serine
T	TCA	: Acide trichloroacétique
	Thr (T)	: Thréonine
	TLCK	: <i>Np-p</i> -tosyl L-lysine chloro-méthyl cétone
	TPCK	: <i>Np</i> -tosyl L-phényl alanine chloro-méthyl cétone
	Tris	: Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
	Trp (W)	: Tryptophane
	Tyr (Y)	: Tyrosine
	T (°C)	: Température
	3D	: Tridimensionnelle
U	U	: Unité enzymatique internationale
	U.V	: Ultra-violet
X	X-gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside
Y	YLV	: N-succinyl-L-Tyr-L-Leu-L-Val-p-nitroanilide

INTRODUCTION GENERALE

A l'instar de la science, la biotechnologie subit une évolution perpétuelle touchant divers plans : technique, économique et médiatique. Cet essor à la fois scientifique que biotechnologique offre de nouvelles opportunités pour combler les besoins du marché mondial. Les biocatalyseurs demeurent les outils clés de la biotechnologie du fait de la compétitivité de la conversion enzymatique par rapport aux procédés chimiques non seulement sur le plan énergétique mais également de point de vue rapidité, sensibilité et spécificité des réactions catalysées [1].

Dans une grande partie de la biotechnologie nous retrouvons les enzymes en tant que biocatalyseurs capables d'accélérer les réactions biochimiques au sein de la cellule pour atteindre une vitesse compatible avec son fonctionnement normal en assurant sa vie et sa reproduction; ce sont donc les acteurs indispensables du métabolisme. Les enzymes sont des protéines extraites à partir de microorganismes, de végétaux et d'animaux. Elles peuvent être utilisées pour catalyser biologiquement des réactions chimiques avec beaucoup d'efficacité et de spécificité. Ainsi, par rapport aux procédés chimiques conventionnels, les procédés biocatalytiques consomment moins d'énergie, produisent moins de perte et sont moins polluants puisqu'ils utilisent moins de solvants organiques. Leur propriété de "turnover", c'est-à-dire, la capacité pour une même molécule enzymatique de catalyser un nombre considérable de fois la même réaction, a fait des enzymes comme un outil de choix dans le secteur des biotechnologies [2].

En effet, les enzymes peuvent être orientées pour catalyser des réactions chimiques spécifiques et optimiser la performance dans certaines conditions telles que les températures élevées ou l'acidité. De ce fait, l'ingénierie des protéines constitue un outil performant qui permet d'adapter ces entités biologiques aux besoins humains. Cette ingénierie se base sur les études des relations structure-fonction des protéines moyennant les techniques de cristallisation, de mutagenèse dirigée et de modélisation moléculaire [3].

Le marché des enzymes est estimé à 6,9 milliards de dollars en 2017 <http://www.freedoniagroup.com/World-Enzymes.html> . Ceci est dû à leur efficacité dans divers processus biotechnologiques et pharmacologiques, du fait qu'elles diminuent les coûts et améliorent la qualité des produits désirés. Aujourd'hui, les protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et le plus utilisé en biotechnologie industrielle grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la substitution des agents chimiques toxiques. En effet, ce groupe des hydrolases couvre 65 % du marché total des enzymes [4, 5]. Toutefois, la part de ces protéases dans le marché mondial est essentiellement dominée par les protéases alcalines microbiennes, particulièrement du genre *Bacillus*, avec 40 % de ce marché [6-8].

Par conséquent, les protéases détergentes et celles utilisées en synthèse peptidique forment le groupe d'enzymes le plus recherché grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la substitution des agents chimiques polluants et toxiques, traditionnellement utilisés dans l'industrie. Ces enzymes permettent de catalyser des réactions chimiques avec beaucoup d'efficacité et de spécificité dans des conditions plus douces et de développer des procédés très sélectifs et moins polluants [3].

A cet effet, la production d'enzymes à des niveaux satisfaisants pour l'industrie pourrait mener à une révolution complète des méthodes industrielles pour la production et l'utilisation de ces enzymes. L'utilisation de milieux alternatifs et de souches non conventionnelles permettrait de faire des économies importantes en plus de préserver l'équilibre écologique précaire de la planète [9].

Dans ce sens, les travaux de recherche que nous avons menée au cours de cette thèse se focalisent sur l'identification d'une souche bactérienne isolée à partir du sol algérien et la caractérisation d'une protéase thermostable produite par cette souche. Pour répondre à ces objectifs, différentes approches ont été suivies :

- ✓ Le criblage et l'identification d'une souche bactérienne de *Bacillus* surproductrice de protéase alcaline d'intérêt industriel.
- ✓ La caractérisation des préparations enzymatiques sélectionnées et l'optimisation de la production de l'activité protéase, en Erlenmeyer, par la meilleure souche isolée.

- ✓ La purification à homogénéité et la caractérisation biochimique et moléculaire de l'enzyme purifiée.
- ✓ L'étude de la stabilité et de la compatibilité de l'enzyme purifiée dans divers détergents et des solvants organiques afin de pouvoir l'utiliser pour des éventuelles applications dans la détergence et dans la synthèse peptidique.

Dans la partie bibliographique, nous allons passer en revue les applications biotechnologiques des microorganismes thermophiles. Nous aborderons les enzymes protéolytiques ou thermo-enzymes décrites et caractérisées. Nous allons également présenter une discussion sur les protéases alcalines de *Bacillus licheniformis*.

La seconde partie de cette thèse est consacrée à l'expérimentation et aux résultats et discussions obtenus dans ce présent travail.

La synthèse de l'ensemble des résultats est donnée en conclusion générale suivie par les principales perspectives envisagée.

Chapitre I

Enzymes protéolytiques : Outils clés en biotechnologie

I.1. Introduction

Les protéases sont des enzymes hydrolytiques susceptibles de catalyser les réactions de coupure des liaisons peptidiques au niveau des protéines et des peptides avec différents degrés de spécificités. Ces enzymes protéolytiques peuvent être rencontrées chez tous les organismes vivants, elles occupent une place privilégiée tant sur le plan physiologique que commercial [10, 11]. D'une manière générale, les protéases peuvent être classées en deux grandes catégories: d'une part les protéases extracellulaires qui catalysent l'hydrolyse des protéines en petits peptides facilement assimilables par les cellules, et d'autre part les protéases intracellulaires qui jouent un rôle essentiel dans l'élaboration et la régulation des processus cellulaires et métaboliques. Ces enzymes participent à un grand nombre de processus biologiques dont le clivage de prohormones, la coagulation sanguine et la fibrinolyse, l'assemblage de structures macromoléculaires comme les fibres de collagène, la fertilisation, le "turnover" des protéines cellulaires, le contrôle de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines [12, 13].

I.2. Marché mondial des enzymes

Aujourd'hui, les protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et le plus utilisé en biotechnologie industrielle. En effet, ce groupe couvre 65% du marché total des enzymes [5] (figure 1), et représente 67 % des ventes mondiales d'enzymes détergentes pour lessives et 50% d'enzymes pour lave-vaisselle automatique [11]. Ce dernier est dominé par de grandes sociétés multinationales telles que Novozymes A/S-Danemark (40 %), Gist-Bricades-Hollande (20 %), Genencor International-USA (10 %) et Miles Laboratories-USA (10 %). Actuellement, 89 % des poudres lessiviellles en Europe et en Amérique du Sud contiennent au moins une enzyme. Toutefois, la part de ces protéases dans le marché mondial est essentiellement dominée par les protéases alcalines microbiennes, avec près de 40 % de ce marché [8, 14, 15].

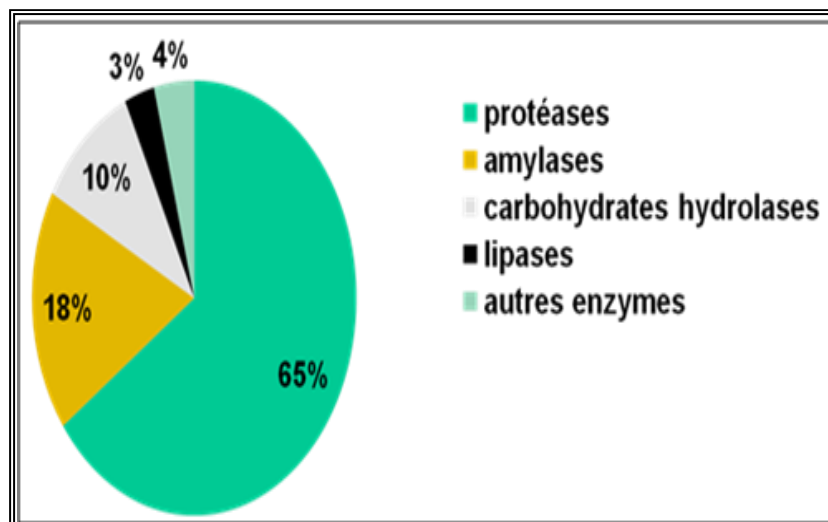


Figure I.1 : Représentation du marché mondial des enzymes [11].

I.3. Origine des enzymes protéolytiques

Etant physiologiquement indispensables à la vie des organismes et essentielles à la croissance et à la différenciation cellulaire, les protéases sont ubiquitaires. Elles peuvent être d'origine végétale (papaïne, bromélaïne, ...), animale (chymosine, pepsine, trypsine, chymotripsine, ...) ou microbienne [16]. Cependant, la majorité des protéases commercialisées est produite par des microorganismes du fait de l'incapacité des organismes végétaux et animaux de répondre à la demande actuelle mondiale en protéases.

En fait, les microorganismes représentent une excellente source d'enzymes variées, grâce à leur diversité biochimique et leur susceptibilité aux manipulations génétiques. Elles sont préférées aux enzymes d'origine animale et végétale puisqu'elles possèdent presque toutes les caractéristiques, requises pour leurs applications en biotechnologie. En effet, beaucoup de protéases microbiennes sont produites à l'échelle industrielle par fermentation et représentent approximativement 40% du marché mondial des enzymes [17]. Ces protéases pour l'essentiel alcalines sont employées dans divers secteurs industriels, les plus importants étant la détergence, la synthèse peptidique, la tannerie et l'industrie pharmaceutique, etc.

I.3.1. Protéases bactériennes

Les bactéries du genre *Bacillus* ont été utilisées durant ces dernières décennies pour la production de protéases neutres et alcalines. En effet, les bactéries représentent la source enzymatique la plus intéressante vue leur croissance rapide, l'espace limité qu'elles nécessitent pour leur culture et la facilité de leur manipulation génétique qui permet d'obtenir des enzymes plus performantes recherchées pour diverses applications. De même, l'extraction et la purification de ces enzymes, si elles sont extracellulaires, restent parmi les techniques les plus faciles à réaliser. Les protéases bactériennes sont comparées à celle d'origine animale, elles sont actives à des pH allant de 5 à 8, et faiblement thermotolérantes grâce à leur faible vitesse de réaction, ces protéases génèrent moins de produits amers lors de l'hydrolyse des protéines alimentaires, d'où leurs utilisations dans l'industrie alimentaire. La Neutrase de NOVO, protéase neutre, utilisée en brasserie, elle est réalisée aux inhibiteurs naturels des protéases végétales.

D'autre part, les protéases alcalines bactériennes telles que les subtilisines, sont caractérisées par leur activité importante à des pH alcalins, dans une zone de pH de 8 à 12. Leur température optimale d'activité est autour de 60 °C. Elles sont caractérisées par leur large spécificité vis-à-vis des substrats. Ces propriétés les rendent convenables pour l'utilisation dans l'industrie de détergence [18].

I.3.2. Protéases fongiques

Généralement, les champignons produisent un spectre plus large d'hydrolases que celui des bactéries. Par exemple, *Aspergillus oryzae* produit des protéases acides, neutres et alcalines. *Aspergillus niger* produit cinq endopeptidases, deux carboxypeptidases, une aminopeptidase et deux protéases acides [19-21]. *Beauveria bassiana* secrète une sérine protéase alcaline agissant à pH 8 et ayant une masse moléculaire de 35 kDa [22, 23].

En fait, les protéases fongiques sont actives dans une large gamme de pH (entre 4 et 11) et montrent une large spécificité vis-à-vis des substrats. Cependant, elles ont généralement un rendement réactionnel et une thermotolérance plus faibles que les protéases bactériennes [16]. Les protéases fongiques acides ont leur optimum d'activité entre 4 et 4,5 et sont stables à des pH allant de 2,5 à 6. Elles sont

particulièrement utilisées dans l'industrie fromagère et plus récemment dans l'industrie du cuir [24]. Les protéases fongiques neutres sont des métalloprotéases actives à un pH voisinant 7 et sont inhibées par les agents chélatants comme l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA). Elles sont utilisées pour compléter l'action des protéases végétales, animales et bactériennes pour réduire le goût amer des hydrolysats protéiques alimentaires. Les protéases alcalines fongiques plus rares, sont aussi utilisées dans la modification des protéines alimentaires [16] ou dans la détergence [25].

I.3.3. Protéases de levures

Certaines protéases de levures ont été étudiées. Le gène de la protéase alcaline d'une levure marine, *Aureobasidium pullulans*, a été cloné dans *Yarrowia lipolytica* et l'enzyme de conversion de l'angiotensine ACE [26, 27]. La protéase aspartique de *Candida albicans* serait nécessaire à la virulence de la levure [28].

I.4. Classification des enzymes protéolytiques

On distingue essentiellement deux grandes catégories de protéases : d'une part les protéases extracellulaires qui catalysent l'hydrolyse des protéines en petit peptide facilement assimilables par les cellules, et d'autre part les protéases intracellulaires qui jouent un rôle essentiel dans l'élaboration et la régulation des processus cellulaires et métaboliques. Cependant, ces enzymes peuvent également être classées selon le type de la réaction catalytique ou encore la nature du site catalytique.

Le site d'action des protéases peut se situer soit à l'une des extrémités N- ou C-terminale de la chaîne peptidique, il s'agit alors d'une exopeptidase (respectivement aminopeptidase ou carboxypeptidase), soit à l'intérieur de celle-ci et on parle alors d'endopeptidases. Selon la nature du site catalytique on distingue sept groupes [29, 30]. Un certain nombre de protéases a un site actif encore non identifié [31].

I.4.1. Protéases glutamiques

Certaines protéases acides, rares, possèdent un résidu Glu dans leur site actif comme la protéase glutamique de *Scytalidium lignicolum* [32, 33]. À la différence des protéases aspartiques, celles-ci ne sont pas inhibées par la pepstatine.

I.4.2. Protéases à thréonine

Elles ont été récemment identifiées dans le protéasome de *Thermoplasma acidophilum* [34, 35] ou celui de *Methanosarcina thermophila* [35]. La thréonine du site actif occupe l'extrémité N-terminale de l'enzyme mature. La taspase humaine est aussi une protéase à thréonine [36].

I.4.3. Protéases aspartiques

Ce sont des endopeptidases dont l'activité catalytique dépend d'un résidu aspartate dans le site actif (figure I.2). Ce dernier est situé dans le motif Asp-Xaa-Gly, ou Xaa peut être une sérine ou une thréonine. Le mécanisme enzymatique des protéases aspartiques ressemble beaucoup à celui des protéases à sérine ou à thiol.

La plupart des protéases aspartiques atteignent un maximum d'activité à des pH bas (pH 3 à 4). Leurs masses moléculaires varient de 30 à 45 kDa. Elles sont inhibées par la pepstatine [37] et sont sensibles au diazo-acétyl-norleucine méthyl-ester et au 1, 2-époxy-3-(p-nitrophénoxy) propane (EPNP) en présence d'un ion cuivre.

Les protéases acides microbiennes peuvent être divisées en deux groupes :

- Les enzymes pepsin-like produites par *Aspergillus*, *Rhizopus* et *Neurospora*.
- Les enzymes rénin-like produites par *Endothia* et *Mucor* sp. [16].

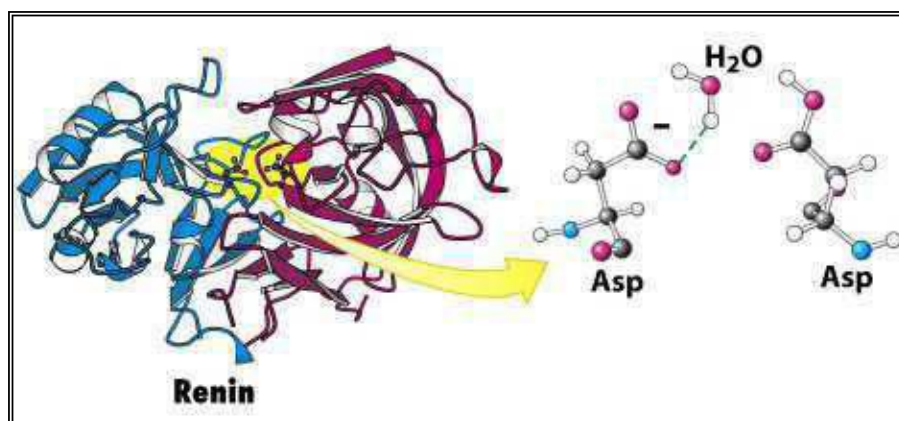


Figure I.2 : Structure en ruban d'une peptidase aspartique : **la rénine** et la présentation de son site actif avec les deux résidus d'acides aspartiques [38].

I.4.4. Protéases à thiol

Ces protéases sont présentes aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Leur activité dépend de la présence de la diade catalytique cystéine et histidine. Généralement, les protéases à thiol sont inhibées par le p-chloro-mercuribenzoate (pCMB), l'iodoacétamise et la N-éthylmaléimide, mais ne sont pas affectées par la présence de diisopropylfluorophosphate (DFP, inhibiteur des protéases à sérine) ou d'agent chélateur. Les protéases à thiol ont un pH optimum d'activité se situant au voisinage de la neutralité. Cependant, un petit nombre d'entre elles, telles que les protéases lysosomales, présentent un maximum d'activité aux pH acides. La papaïne est l'une des protéases à thiol les plus connues [16].

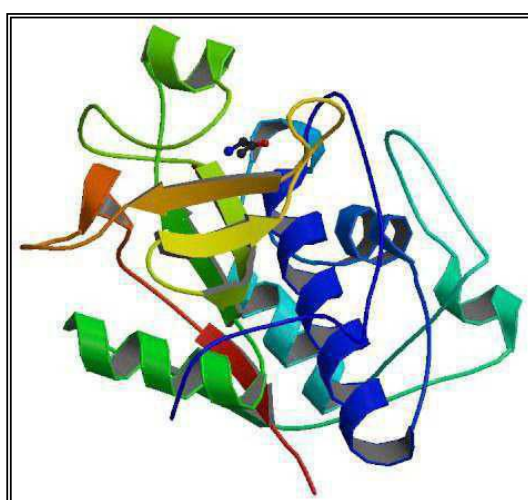


Figure I.3 : Structure en ruban d'une protéase à cystéine « la **papaïne** » [39].

I.4.5. Métalloprotéases

Les métalloprotéases représentent le groupe d'enzymes le plus diversifié. Elles se caractérisent par leur besoin en ions bivalents leurs activités catalytiques. Dans la majorité des cas, il s'agit de l'ion Zn^{2+} [40] (figure I.4). Dans ce type d'enzymes, l'atome de zinc participe à la catalyse en polarisant fortement la liaison carbonyle appartenant à la liaison peptidique à couper. Le carbone du carbonyle devient alors beaucoup plus électrophile, permettant une attaque par l'eau (assisté d'un groupe Glu) pour donner un intermédiaire instable bi-anionique. Cet intermédiaire se coupe en libérant l'acide aminé C-terminal, le peptide restant est libéré par la suite.

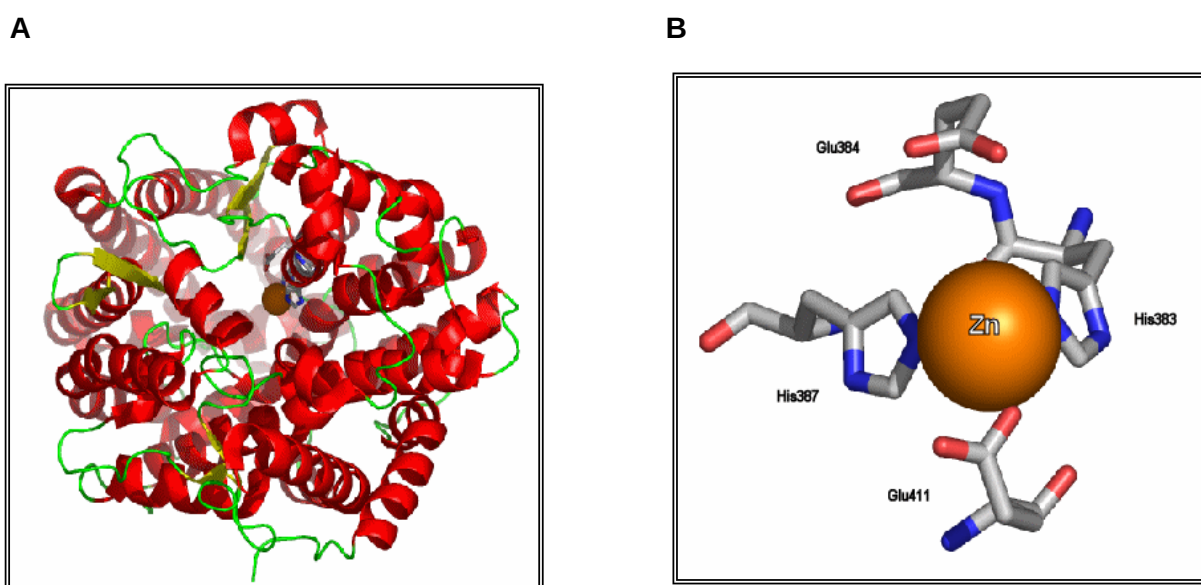


Figure I.4 : (A) Structure tridimensionnelle d'un métallo enzyme. (B) Présentation schématique du site actif de cette enzyme avec le Glu384, His387, His383, Glu411 et Zn [39, 40].

Les métalloprotéases à zinc sont produites aussi par les eucaryotes que par les procaryotes et sont subdivisées en quatre groupes : D-D-carboxypeptidases, carboxypeptidases, zincins et inverzicins (figure I. 5). Le groupe qui possède le motif HEXXH pour la fixation du zinc est appelé « zincins superfamily ». Bien que cette superfamille soit subdivisée en dix familles sur la base de l'emplacement du troisième ligand du zinc, il semblerait que les métalloprotéases bactériennes peuvent

être regroupées en trois familles distinctes : thermolysin-like, serralysin-like et neurotoxin-like. Les types d'enzymes de ces trois familles sont produites par *Bacillus thermoproteolytics*, *Serratia marcescens* et *Clostridium bontulimum*, respectivement [41].

Une autre classification basée sur la spécificité vis-à-vis du substrat permet de subdiviser les métalloprotéases en quatre groupes : les métalloprotéases neutres, les métalloprotéases alcalines, les métalloprotéases de *Myxobacter I* et celles de *Myxobacter II* [16].

La thermolysine, membre représentatif des thermolysin-like protéases, est la protéase neutre la plus étudiée. Ce type de protéase montre une spécificité pour les acides aminés hydrophobes, tandis que les protéases alcalines se distinguent par leur large spectre d'activité. Les métalloprotéases alcalines se distinguent par leur large spectre d'activité. Les métalloprotéases de *Myxobacter I* sont spécifiques des résidus de petites tailles au niveau des deux côtés du site de clivage. Les métalloprotéases de *Myxobacter II* caractérisent, quant à elle, par leur spécificité pour les résidus lysine situés du côté amino-terminal du peptide.

Toutes ces enzymes sont inhibées par les agents chélateurs tels que l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) ; l'o-phénanthroline et la 8-hydroxyquinone [16].

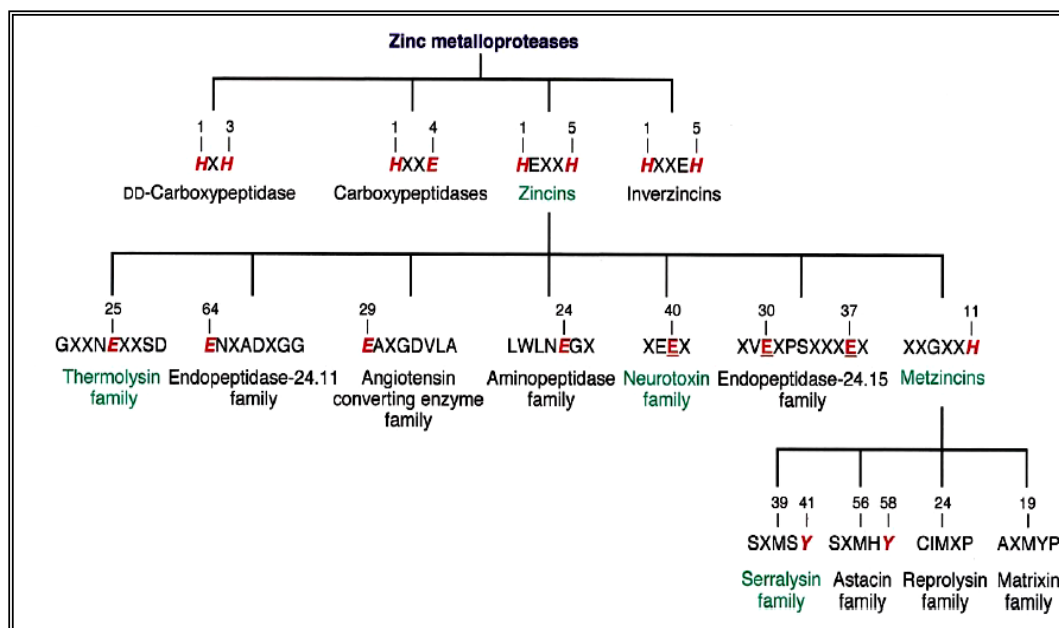


Figure I.5 : Classification des métallo-protéases à zinc sur la base de la nature des acides aminés qui forment le site de fixation du zinc [41]. Les acides aminés marqués en rouge représentent les résidus qui lient l'ion Zn^{2+} [42].

I.4.6. Protéases à sérine

Les endo- et les exopeptidases à sérine représentent le groupe d'enzymes le plus répandu aussi bien chez les procaryotes, ceci prouve qu'elles sont vitales pour l'organisme [16]. De plus, elles sont d'un intérêt considérables en industrie du fait de leur activité et stabilité à des pH alcalins. Sur la base de l'homologie de la séquence en acides aminés, les protéases à sérine sont subdivisées en de nombreuses familles distinctes (une vingtaine) qui sont regroupées en six clans ou super familles [43, 44] :

- Les protéases α -lytique de *Myxobacter* : elles présentent une forte activité bactériolytique vis-à-vis des bactéries du sol et sont produites par plusieurs espèces de *Myxobacter*. Elles sont spécifiques des groupes carboxyliques des acides aminés neutres et aliphatiques. Leur activité maximale est atteinte au voisinage de pH 9 [16].
- Les sérines polyloligopeptidases-like : elles sont peu connues et ont été définies sur la base de l'homologie de séquence [45].
- Les protéases de *Staphylocoque* : elles sont produites par *S. aureus*. Elles ont une masse moléculaire de 12 kDa et un pH optimum d'activité allant de 4 à 7,8. La trypsine, la carboxypeptidase C et la D-Ala-D-Ala-peptidase d'*E. coli* appartiennent à

ce groupe [16].

- Les sérines carboxypeptidases II-like du blé : elles possèdent une triade catalytique différente de celle des subtilases et sont actives dans une zone de pH allant de 4,5 à 5,5.
- Les protéases chymotrypsine-like : elles sont spécifiques des acides aminés aromatiques et actives à pH 8. Ces protéases sont pour la plupart d'origine animale mais peuvent également être rencontrées chez certaines espèces de *Streptomyces* [46, 47].
- Les protéases subtilisin-like : elles sont généralement d'origine bactérienne [16]. Elles sont spécifiques des résidus aromatiques ou hydrophobes et actives à des pH voisins de 10. Leur masse moléculaire est comprise entre 15 et 30 kDa.

Ces deux dernières superfamilles, chymotrypsin-like et subtilisin-like, se distinguent des quatre autres par un arrangement semblable de la triade catalytique Asp (électrophile), His (base) et Ser (nucléophile) mais dans des structures tridimensionnelles protéiques complètement différentes : α/α pour les chymotrypsines et α/β pour les subtilisines [48].

Les protéases à sérine suivent généralement deux étapes lors de la réaction d'hydrolyse (figure I.6). Le complexe intermédiaire covalent enzyme-peptide se forme avec libération d'un acide aminé ou d'un peptide. Cette étape d'acylation est suivie d'un processus de déacylation qui se produit à la suite d'une attaque nucléophile de l'intermédiaire par une molécule d'eau, il en résulte une hydrolyse du peptide [16].

Les protéases à sérine sont inhibées de manière irréversible par le 3,4-dichloroisocoumarine (3,4-DCI), le L-3-carboxytrans 2,3-époxypropyl-leucylamide (4-guanidine) butane (E.64), le diisopropylfluorophosphate (DFP) et le phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF). Certaines protéases à sérine sont également inhibées par les réactifs à thiol tel que le p-chloromercuribenzoate (PCMB) du fait de la présence d'un résidu cystéine à proximité du site catalytique [16].

I.4.7. Les subtilisines de références

I.4.7.1. Généralités

Les subtilisines appartiennent à la famille des subtilases dont plus de cinquante membres ont été identifiés. Elles sont un groupe de protéases à sérine d'origine bactérienne qui présentent une séquence et une structure tridimensionnelle différentes de celles des protéases à sérines de mammifères (chymotrypsine, trypsine,...). La subtilisine est produite par des bactéries du genre *Bacillus* sous forme d'un précurseur inactif. La pré-pro-subtilisine est capable de traverser la membrane cellulaire pour être ensuite activée de façon auto-catalytique par clivage du pro-peptide [49].

La subtilisine Carlsberg est produite par *B. licheniformis* sous la forme d'un précurseur de 379 acides aminés dont 274 forme le domaine mature et 76 la pro-région [48, 50]. *B. amyloliquefaciens* produit, quant à elle, la subtilisine BPN' formée de 75 résidus pour le pro-peptide, 275 résidus pour le domaine mature et 30 résidus pour le peptide signal [51], de même *B. subtilis* produit une subtilisine, la subtilisine E, formée de 352 Aa (77 résidus pour le pro-peptide et 275 pour le domaine mature) et du peptide signal de 29 résidus (figure I.6 et I.7) [52, 53].



Figure I.6 : Subtilisine BPN' de *B. amyloliquefaciens* complexée avec son pro-peptide

- Main-chain trace
 - Chain: P (71 residues) - [K&S: 2 helices, 5 strands]
 - Chain: S (264 residues) - [K&S: 9 helices, 10 strands]
- Metals
 - 1 NA ion



Figure I.7 : Subtilisine E de *B. subtilis* complexée avec son pro-peptide

- Main-chain trace
 - Chain: A (275 residues) - [K&S: 9 helices, 10 strands]
 - Chain: B (71 residues) - [K&S: 2 helices, 5 strands]
- Metals
 - 2 CA ions

I.4.7.2. Pro-peptides de la subtilisine : fonction et structure

a) Fonction du propeptide de la subtilisine

- Rôle de chaperon intramoléculaire (domaine-CIM)

Un grand nombre de protéases issues des eucaryotes et des procaryotes est synthétisé sous forme d'un précurseur muni d'un pro-segment amino-terminal qui joue un rôle primordial dans le repliement [54] et qui sera par la suite clivé pour générer une enzyme active. Ainsi, des protéines telles que les subtilisines [55, 56], la protéase α -lytique [57] et les carboxypeptidases [58], une fois dénaturées par une solution de Guanidine-HCl (Gdn-HCl), ne peuvent être de nouveau renaturées sous une forme active qu'en présence de leur pro-peptide [59].

Le travail conduit par Shinde et *al.* [59] concernant le rôle du pro-peptide de la subtilisine E a montré que l'élimination complète de celui-ci entraîne la production de subtilisine catalytiquement inactive [56] ayant une structure agrégée (structure du type « molten globule »). La délétion partielle du pro-peptide (résidus -77 à -68 ou -77 à -64) permet d'obtenir une subtilisine active. L'efficacité de ce « petit » pro-peptide est de 30 à 40 % par rapport au pro-peptide d'origine (77 résidus). Cependant, la délétion des acides aminés -77 à -63 est à l'origine d'une incapacité totale du pro-peptide à assurer un repliement correct de la protéine [59].

Le pro-peptide est à un stade avancé de la maturation, lié de façon covalente (liaison peptidique) à l'extrémité N-terminale de l'enzyme proprement dite. Chaque pro-peptide assure ainsi le repliement de la molécule d'enzyme à laquelle il est lié, en lui communiquant une information stérique. Ces deux particularités lui ont valu l'appellation de chaperon intramoléculaire [60, 61]. "*In vivo*", la liaison covalente entre le pro-peptide et la subtilisine est clivée par un mécanisme intramoléculaire faisant intervenir la triade catalytique Asp, His et Ser : Asp₃₂, His₆₃ et Ser₂₂₀ pour la subtilisine Carlsberg et Asp₃₂, His₆₄ et Ser₂₂₁ pour les subtilisines BPN' et E. Dans certaines conditions, il est possible qu'un clivage intermoléculaire survienne [55]. De toutes les façons, le pro-peptide agit comme un substrat pour la subtilisine [62].

En 1991, Barr a montré que la liaison covalente du pro-peptide à l'extrémité N-terminale de la subtilisine n'est pas un critère nécessaire pour le repliement. Ainsi, l'addition exogène du pro-peptide peut aussi orienter le repliement vers la forme

active. Dans les deux cas, le pro-peptide agit comme un substrat pour la subtilisine [54]. En effet, certains travaux ont montré que la subtilisine dénaturée par une solution de Guanidine-HCl est incapable de se replier par ses propres moyens sous une forme biologiquement active [60, 61, 63]. Cet état est appelé FIC (folding-incompetent state). Le repliement de l'état FIC ne peut être achevé qu'en présence du pro-peptide [56].

Bryan *et al.* [64] ont montré que la subtilisine mutée de sorte à ce que l'un des deux sites de fixation du calcium soit aboli pouvait être, après une dénaturation acide (25 mM H_3PO_4 ; pH 1,85), complètement renaturée à des concentrations élevées de sel (KCl 0,6 M) et en absence du pro-peptide. Cependant, Eder *et al.* [65] ont suggéré qu'il s'agissait en fait d'une structure du type « molten globule ». En effet, le fait que la subtilisine puisse se replier en absence de son pro-peptide est surprenante et semble être en contradiction avec les résultats antérieurs obtenus par Shinde *et al.* [59].

Dans cette même perspective, Shinde *et al.* [59] ont montré que lorsque la subtilisine dénaturée par une solution de Gdn-HCl est incubée, pendant 20 jours, en absence de son pro-peptide à une concentration ionique proche de celle "*in vivo*", seul 1 % de l'activité est restaurée. Alors qu'à la suite d'une dénaturation acide, l'activité restaurée est de 2 à 3 % dans les mêmes conditions expérimentales. La dénaturation acide des subtilisines permet de maintenir une ébauche de structure [59]. Ce petit élément de structure pourrait être responsable de la renaturation en absence de pro-peptide (60 min d'incubation dans une solution de KCl 6 M). Toutefois, on note que la subtilisine possède deux sites de fixation du calcium qui pourraient être responsables de la structure résiduelle observée à la suite d'une dénaturation acide.

Pour évaluer le rôle de l'ion calcium dans le repliement de la protéine, Shinde *et al.* [59] ont réalisé la dialyse de la subtilisine, dénaturée par traitement acide, contre une solution de Tris HCl 50 mM (pH 7) additionnée de 1 à 3 mM EGTA. L'étude comparative a montré qu'il n'existe pas de différence significative, ce qui indique que le calcium n'est pas responsable de la structure résiduelle .

L'une des raisons pour lesquelles la forte concentration en sel facilite le repliement est que le pro-peptide lui même est très fortement chargé [56]. La séquence en acides aminés du pro-peptide comporte 17 acides aminés basiques (15

lysines et 2 histidines) ainsi que 11 résidus acides [60]. Plus du tiers du pro-peptide (36 %) est donc très fortement chargé. Cependant, la distribution de ces résidus chargés est inégale, mais ils se retrouvent tout de même à la surface de la structure tridimensionnelle du pro-peptide. Cet environnement fortement ionisé, fourni par le pro-peptide, peut dans une certaine mesure être mimé par une forte salinité [59].

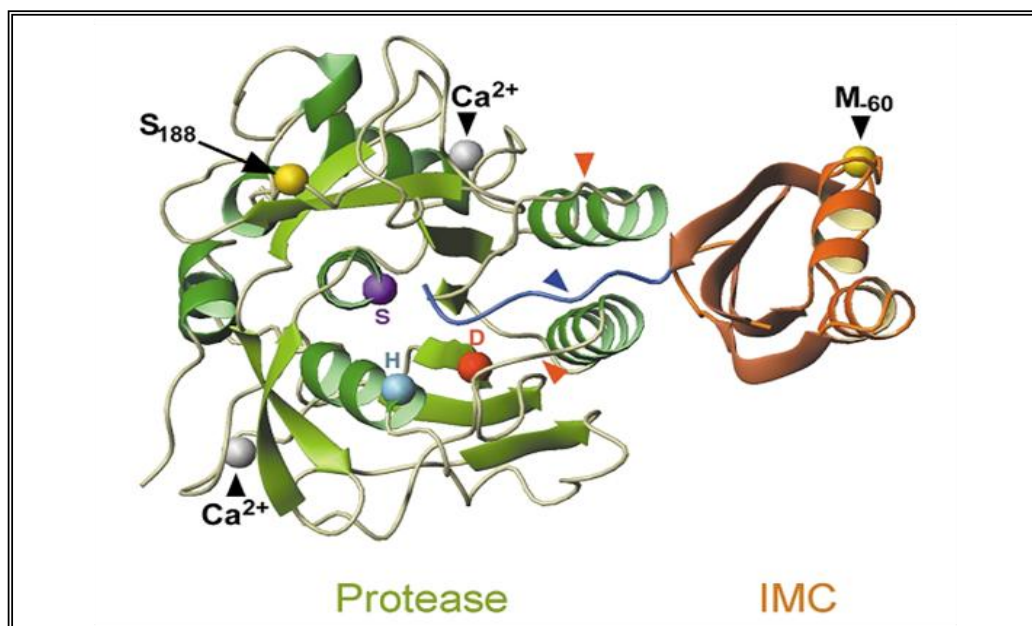


Figure I.8 : Structure aux R-X du complexe pro-peptide (domaine IMC)-subtilisine BPN'. Le site actif des résidus d'Asp32, d'His64 et de Ser221 sont représentés respectivement en rouge, bleu et violet. La partie C-terminale du propetide, connue surtout sous le nom du domaine IMC (représentée en pourpre) interagit avec le domaine de fixation du substrat (flèche rouge). Les 2 sites de fixation du calcium sont représentés en gris [66].

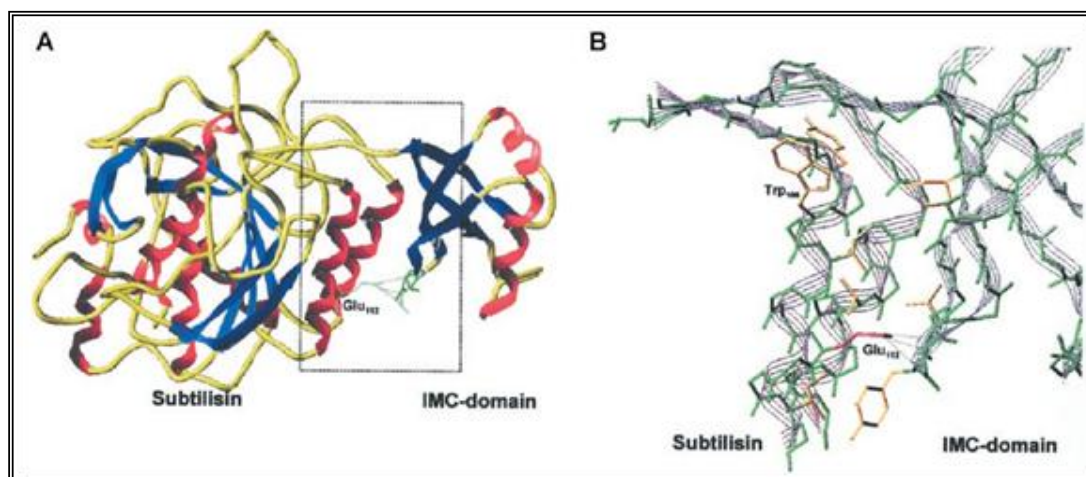


Figure I.9 : Structure aux R-X du complexe domaine-IMC/S221C-subtilisine E. **(A)**, les hélices α sont représentées en rouge, les feuilles β sont en bleu, boucles et coudes sont en jaune. Les résidus impliqués dans la liaison hydrogène qui stabilise le côté d'interaction du domaine IMC sont représentées en vert. **(B)**, représentation détaillée de l'interface entre les deux surfaces parallèles des hélices de la subtilisine et les quatre feuillets β -antiparallèle du domaine IMC. Les résidus hydrophobes qui stabilisent l'interface sont indiqués en jaune, et les trois liaisons hydrogène sont représentées par des lignes pointillées [67].

- Rôle d'inhibiteur compétitif

Bien que le mécanisme de la réaction enzymatique des protéases sérines soit bien étudié, le rôle structural et fonctionnel de leur pro-peptide, dans la relation avec l'activité de l'enzyme durant le processus de maturation, n'est pas encore connu en détail [51]. Il est intéressant de savoir qu'au cours du repliement de la subtilisine, le pro-peptide, tel un substrat, se fixe au niveau de la région du site actif de l'enzyme et agit comme un inhibiteur compétitif avec une constante d'inhibition (K_i) comparable à celle de l'inhibiteur de *Streptomyces*, un inhibiteur fort de la subtilisine. De même, un pro-peptide synthétique peut exercer un effet inhibiteur sur la subtilisine mature [59]. Le même comportement inhibiteur est aussi observé dans d'autres familles de protéases telles que les métalloprotéases (carboxypeptidase A), les protéases aspartiques (rénine) et les protéases à cystéine (cathepsine D) [59].

La fonction de chaperon intramoléculaire du pro-peptide de la subtilisine est en corrélation avec sa capacité inhibitrice vis-à-vis de sa propre protéase [53]. Ceci indique que l'affinité entre le pro-peptide et la subtilisine a une influence directe sur l'efficacité du repliement [53]. Ces fonctions parallèles du pro-peptide sur sa propre

protéase, l'inhibition de l'activité protéolytique et le repliement de l'enzyme en une structure tertiaire active, ont un rôle biologique dans la protection des protéines intracellulaires de la digestion enzymatique durant le processus de maturation de la protéase [68]. De plus, il existe une sélectivité de la fonction inhibitrice du pro-peptide vis-à-vis de diverses protéases de différentes classes, par exemple : le pro-peptide de la sérine protéase alpha-lytique inhibe spécifiquement sa propre enzyme sans toutefois agir sur les autres élastases [51]. Cette sélectivité du pro-peptide est biologiquement importante pour la différenciation intra-moléculaire entre les différentes protéases cellulaires.

Cependant, on remarque que dans le cas des subtilisines bactériennes cette sélectivité n'existe pas même si la cinétique d'inhibition est différente. En effet, Huang *et al.* [51] ont synthétisé les pro-peptides des subtilisines BPN' et Carlsberg et ont étudié l'effet inhibiteur de chacun d'eux sur l'activité enzymatique de ces deux protéases. Ils ont montré que le mécanisme d'inhibition de ces deux pro-peptides est différent. En effet, pro-BPN' inhibe les subtilisines BPN' et Carlsberg selon un mode lent (vitesse initiale de la réaction ne change pas rapidement avec l'ajout du pro-peptide), alors que pro-C est un inhibiteur compétitif rapide du substrat N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitrianiide.

La spécificité de l'activité inhibitrice des pro-BPN' et pro-Carlsberg vis-à-vis des subtilisines bactériennes a également été étudiée par Huang *et al.* [51]. Ils ont montré que ces pro-peptides n'ont aucun effet sur l'activité protéolytique de la chymotrypsine (protéine à sérine de mammifère) et ceci en dépit du fait que le site actif de la subtilisine et de la chymotrypsine adopte le même arrangement.

b) Structure du pro-peptide

La structure secondaire du pro-peptide complexé avec la subtilisine native est estimée par la méthode de Greenfield et Fasman [69]. Elle est formée de 31 % d'hélice α , 27 % de feuillet β , 33 % de boucle et 9 % de coude β . Cependant, l'addition de tri-fluoroéthanol au pro-peptide induit une augmentation de l'hydrophobicité de l'environnement et par conséquent une augmentation du pourcentage d'hélice α (38 %) [59].

Ces résultats indiquent que le pro-peptide interagit avec un élément hydrophobe, probablement les hélices 5 et 6 de la subtilisine. Ces deux hélices sont

largement hydrophobes, elles correspondent aux acides aminés 133 à 147 et 220 à 237, respectivement. Le pro-peptide adopte donc une structure de type α -hélice pour induire le repliement de la région mature. Il crée avec la subtilisine mature des relations dynamique et symbiotique [59]. Cependant, il est important de noter que le pro-peptide (domaine CIM), une fois libéré de la subtilisine, est dépourvu de structures secondaire et tertiaire significatives [59, 70].

c) Interchangeabilité des pro-peptides

Des travaux réalisés par Shinde *et al.* [59], montrent que "*in vitro*" le pro-peptide de la subtilisine E de *Bacillus subtilis* est non seulement capable d'assurer la maturation de la subtilisine E mais aussi celle de la subtilisine BPN' et de la subtilisine Carlsberg. De même, Takagi *et al.* [71] ont découvert que le prodomaine des subtilisines thermostables telle que l'aqualysine I (proA) permet le repliement de la subtilisine BPN' quand il est ajouté *en trans*. À cet effet, un gène chimérique a été construit à partir de la subtilisine E et de l'aqualysine I pour tenter le repliement de la subtilisine E au moyen du pro-peptide de l'AQI *en cis* ; les résultats indiquent que le pro-peptide de l'aqualysine I peut assurer, dans une certaine mesure, le repliement intramoléculaire de la subtilisine E dénaturée. Ainsi, les pro-peptides de la famille des subtilisines possèdent la même fonction, malgré, la diversité de leurs séquences.

De plus, les propriétés enzymatiques de certaines chimères, dont le domaine mature de la subtilisine est partiellement remplacé par celui de l'aqualysine I, sont similaires à celle de l'aqualysine I.

Le pro-peptide de la subtilisine ne présente que 21 % d'homologie de séquence avec le pro-peptide de l'aqualysine I, pourtant, ce dernier est capable non seulement de se lier à la subtilisine BPN' mature mais aussi de renaturer la subtilisine BPN' dénaturée avec approximativement 50 % d'efficacité par rapport au pro-peptide de la subtilisine quand il est ajouté *en trans* [71].

1.4.7.3. Subtilisine mature

a) Structure de la subtilisine

La subtilisine n'est pas sur un plan phylogénétique apparentée à la famille des enzymes du type chymotrypsine. Néanmoins, les atomes qui participent à la triade catalytique, à la poche oxyanion et à la liaison avec le substrat sont au niveau de la

structure tridimensionnelle pratiquement dans les mêmes positions relatives que les atomes équivalents de la chymotrypsine ou des enzymes de ce type.

La subtilisine se caractérise sur le plan structural par une région à 5 brins β parallèles entourés par 4 hélices : deux de chaque côté du feuillet parallèle β . Cette structure de la subtilisine présente une exception à la règle générale qui stipule que les motifs β - α - β ont une configuration droite. En effet, pour la subtilisine un des motifs β - α - β est gauche permettant à la triade catalytique de se former (figure I.10 et I.11).

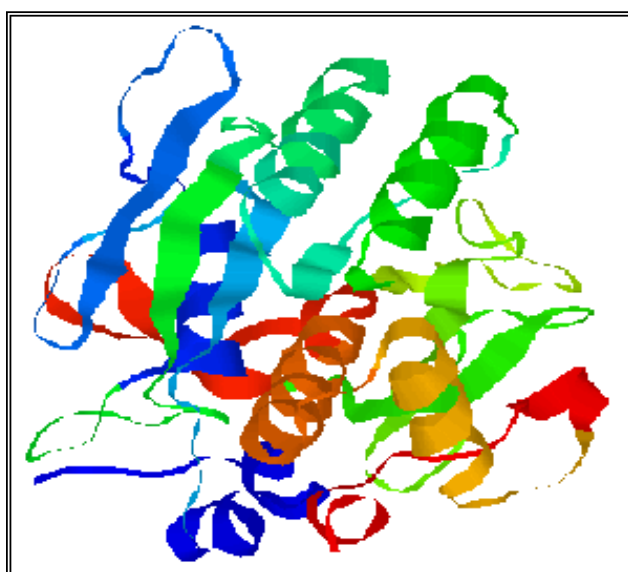


Figure I.10 : Structure tridimensionnelle de la subtilisine Carlsberg.

La subtilisine possède la triade catalytique Ser_{220/221}, His_{63/64} et Asp₃₂. Elle possède également deux sites de fixation de l'ion Ca^{2+} , l'un de haute affinité (Ca₁, $K_d = 10^{-10}$ M), l'autre de faible affinité (Ca₂, $K_d = 10^{-4}$ à 10^{-7} M). Les autres membres de la famille des subtilases n'ont quelques fois qu'un seul site, c'est le cas de l'aqualysine I et de la protéinase K, mais peut en avoir jusqu'à trois comme pour la thermitase [48, 72, 73]. De plus, la subtilisine est totalement dépourvue de pont disulfure contrairement à l'aqualysine I et à la protéinase K qui en possèdent deux et qui sont dotées d'une forte thermostabilité [48, 72, 74].

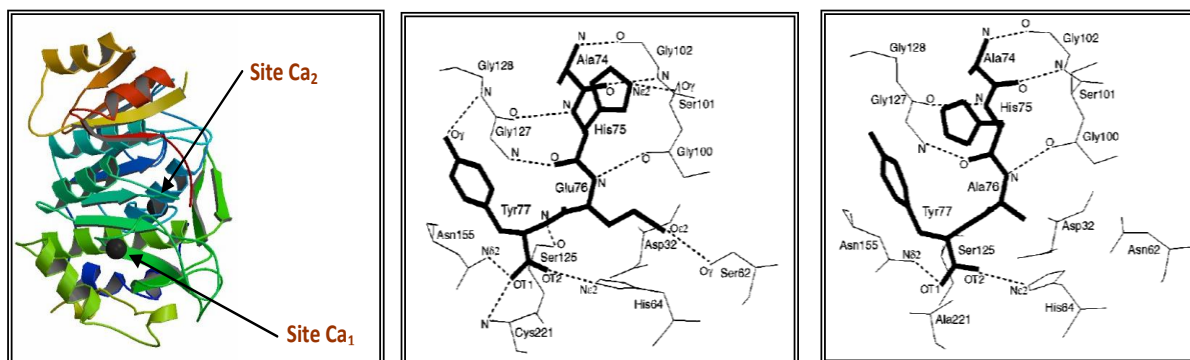


Figure I.11 : Structure 3D du complexe subtilisine E/pro-peptide (PDB-code : 1SCJ). Une vue des interactions entre le propeptide et le site actif de la subtilisine E. Les liaisons hydrogènes qui se forment entre les résidus 74 ± 77 (lignes en gras) du propeptide et les résidus de la subtilisine (lignes simple) sont indiquées en lignes discontinues. D'après Jain *et al.* [75].

b) Mécanisme d'action de la subtilisine

La réaction catalytique se fait en deux étapes. Dans un premier temps (acylation), le groupe-OH du résidu de Ser221 transfère son proton sur le résidu d'His64 suivi de la formation d'une liaison avec le groupe carbonyle de la liaison peptidique qui va subir l'hydrolyse. On aboutit alors à un oxyanion intermédiaire (nommé E-S⁺⁺) dont le carbone possède une configuration tétraédrique, stabilisée par deux liaisons hydrogènes, l'une avec l'Asn155 et l'autre avec l'His64. Dans un deuxième temps (désacylation), il y a formation de l'acétyl-enzyme (E-Ac) avec migration du proton sur le NH₂ libéré. Enfin, une molécule d'eau intervient pour hydrolyser l'acyl-enzyme. Le résidu d'Asn155 intervient aussi dans la catalyse en se liant à l'oxyanion dans l'état de transition E-S⁺⁺ (figure I.12) [76].

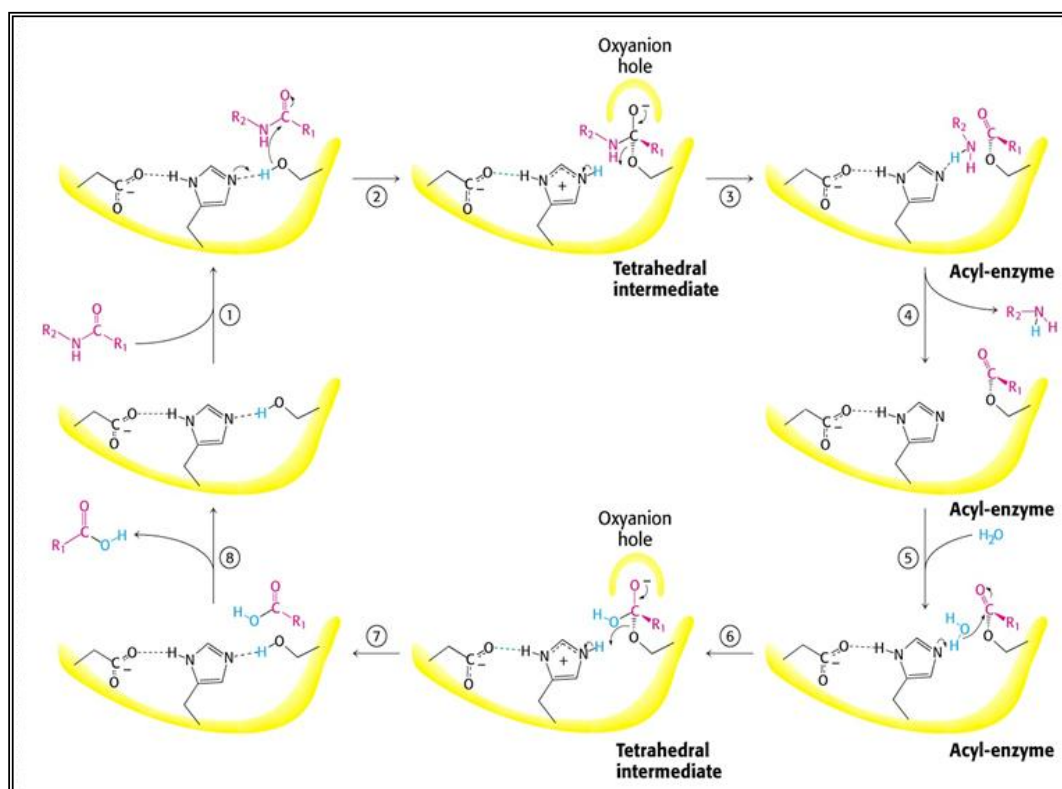


Figure I.12 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des subtilisines [76].

c) Maturation de la subtilisine

La figure I.13 est proposée par Yabuta *et al.* [77] décrit le repliement d'une protéine, en l'occurrence la subtilisine, assumé par un pro-peptide et résume le mécanisme d'activation de la prosubtilisine.

Le repliement de la prosubtilisine, qui requiert la présence du pro-peptide, est un processus extrêmement rapide aboutissant à un intermédiaire dit «non-native intermediate». Celui-ci subit à son tour des changements au niveau de sa structure de sorte à donner après autolyse un complexe subtilisine-pro-peptide stable du fait de la fonction inhibitrice du pro-peptide. La formation de ce complexe peut être démontrée directement par HPLC [78]. Puisque à ce stade toutes les subtilisines sont complexées à leur pro-peptide, chacune d'elles se libère de son pro-peptide par ses propres moyens pour promouvoir la protéolyse. Cette libération se produit dans un intervalle de temps allant de 230 à 260 min dans les conditions expérimentales employées par Yabuta *et al.* [77]. L'addition de subtilisine mature peut accélérer cette dissociation. Dès qu'une molécule protéolytique est formée, celle-ci peut fixer un pro-

peptide appartenant à un complexe pro-peptide-subtilisine et peut faciliter sa dégradation en trans.

De plus, Shülein *et al.* [79] ont montré que la maturation et la sécrétion du pré-pro-subtilisine Carlsberg sont bloquées à la suite de la délétion des acides aminés 97 à 101 localisés au niveau du domaine mature de l'enzyme. Cette boucle, formée des acides aminés Asn₉₇-Ser₉₈-Ser₉₉-Gly₁₀₀-Ser₁₀₁, est donc requise pour la sécrétion de la subtilisine.

d) Effet des mutations du pro-peptide sur la maturation de la subtilisine

Ikemura et Inouye [56, 80] et Cash *et al.* [56, 80] ont montré que la proséquence joue un rôle essentiel en guidant le repliement de la subtilisine sous une forme active. Il est donc probable que certaines substitutions au niveau du pro-peptide peuvent être à l'origine d'un défaut dans la production de la subtilisine active.

La caractérisation de certaines mutations au niveau du pro-peptide a permis d'élucider sa fonction dans le repliement de la protéine. Plusieurs méthodes chimiques et enzymatiques, induisant une mauvaise incorporation de nucléotides ou d'oligonucléotides, ont été utilisées pour générer des mutations au hasard "*in vitro*". Grâce à ces méthodes, une variété de gènes a été mutée avec succès mais la faible fréquence des mutations et la difficulté à limiter les mutations à une région définie ont réduit ces applications [52].

Kobayashi et Inouye [61] ont isolé des pro-peptides mutés incapables d'assurer la maturation correcte de la subtilisine "*in vivo*". Li *et al.* [53] ont sélectionné 6 mutations parmi 25 isolées antérieurement et les ont exprimées dans *E. coli* au moyen du système d'expression T7. Les cellules transformées par le plasmide abritant le gène codant la prosubtilisine mutée forment ou non un très petit halo autour des colonies sur milieu contenant la caséine. Ces pro-peptides mutés ont été purifiés et leur capacité à renaturer la subtilisine dénaturée "*in vitro*" a été étudiée. Ils ont montré que certains de ces pro-peptides mutés étaient capables de renaturer les subtilisines dénaturées assez efficacement. Cette aptitude des pro-peptides mutants est en corrélation avec la valeur de leur constante d'inhibition (K_i) et indique que l'affinité du pro-peptide mutant vis-à-vis de la subtilisine mature est en relation directe avec sa capacité à assurer sa fonction de chaperon moléculaire.

Le choix a porté sur les mutants : Ile-⁶⁷ → Val, Ile-⁴⁸ → Thr, Gly-⁴⁴ → Asp, Lys-³⁶ → Glu, Ala-³⁰ → Thr et Pro-¹⁵ → Leu pour diverses raisons :

- Il existe 3 petites régions hydrophobes H1, H2 et H3 au niveau du pro-peptide qui semblent jouer un rôle dans le repliement de la prosubtilisine [61]. Les régions H1 et H2 sont le siège de beaucoup de mutations dont Ile-⁶⁷ → Val au niveau de H1 et Ala-³⁰ → Thr au niveau de H2.
- Deux mutants, Gly-⁴⁴ → Asp et Lys-³⁶ → Glu ont été sélectionnés à cause du changement de la charge.
- Au niveau de l'Ile-⁴⁸, trois mutations ont été observées. La mutation Ile-⁴⁸ → Thr a été sélectionnée.
- Il n'existe qu'un résidu proline (position -15) au niveau du pro-peptide, c'est pourquoi le mutant Pro-¹⁵ → Leu est sélectionné.
- Quatre mutations au niveau du site de clivage du peptide signale ne sont pas incluses dans cette étude car ces mutations inhibent la sécrétion de la prosubtilisine.

Les mutants Ile-⁶⁷ → Val, Ile-⁴⁸ → Thr et Gly-⁴⁴ → Asp ne développent pas de l'halo sur milieu à base de caséine contrairement aux autres mutants.

L'aptitude de ces pro-peptides mutés à renaturer "*in vitro*" la subtilisine dénaturée par la Guanidine-HCl 6 M a été étudiée par Li *et al.* [53]. Le mutant Ala-³⁰ → Thr est capable de renaturer la subtilisine BPN' dénaturée avec une efficacité de 80 %, comparé au pro-peptide sauvage. De même, les mutants Ile-⁶⁷ → Val et Gly-⁴⁴ → Asp sont aptes à renaturer la subtilisine BPN' avec, respectivement, 18 et 13 % d'efficacité.

e) Bases moléculaires de la thermostabilité

- Effet du calcium sur la subtilisine

La subtilisine sécrétée par *B. licheniformis* [50], est formée d'une chaîne polypeptidique unique de 274 acides aminés avec deux sites de fixations du calcium [81-83] : un site fort (Ca₁) et un site faible (Ca₂).

Une étude menée par Kidd *et al.* [84], sur la subtilisine BPN' (subtilisine similaire à la subtilisine Carlsberg sur le plan structural) indique que la fixation du Ca²⁺ au niveau du site fort et du site faible améliore considérablement la stabilité de la protéine. De même, Lee et Jang [85] ont montré que le détachement de l'ion Ca²⁺

du site Ca₁ diminue considérablement la température de dénaturation de la protéine, alors que la libération du site Ca₂ n'avait qu'un effet léger sur la température de dénaturation. Ainsi le site Ca₁ semble plus important que le site Ca₂ pour la stabilité thermique. De plus, à la suite de l'élimination des calciums Ca₁ et/ou Ca₂, on assiste à une augmentation significative des structures en boucles et de la flexibilité de la subtilisine.

La structure, aux rayons X, du site fort de fixation du calcium (Ca₁) révèle que celui-ci présente une structure octaédrale sphérique avec trois carbonyles, deux carboxyamides et un carboxylate [81-83, 86]. Lee et Jang [87] ont cependant suggéré, qu'en solution, le Ca²⁺ fixé au site fort de la subtilisine Carlsberg (Ca₁) forme une liaison supplémentaire avec le solvant ou le substrat. La constante d'affinité de ce site est de 10⁸ [88]. Le site faible de fixation du calcium (Ca₂) présente quant à lui une constante d'affinité de 10² et une structure quadrangulaire pyramidale avec trois groupes carbonyles et deux molécules d'eau [81, 82, 86].

Les subtilisines sont très largement utilisées comme additifs en détergence, mais, du fait de la présence de chélateurs dans ces détergents, la stabilité ainsi que l'activité de l'enzyme sont amoindries. Toutefois, la délétion du site Ca₁ de la subtilisine, a formé d'une boucle de 9 résidus (75 à 83), a abouti à une enzyme active même en présence de chélateurs, en contre partie, la thermostabilité est nettement diminuée.

Cette modification entraîne l'apparition de nombreuses perturbations structurales localisées au niveau de la région délétée [89]. Les principaux changements affectent : les acides aminés amino-terminal 1 à 6, la boucle formée des résidus 36 à 44, l'hélice α formée des résidus 63 à 85 et le feuillet β composé des acides aminés 202 à 219.

Cette analyse de la structure met en évidence les positions des acides aminés qui peuvent être mutés en vue de restaurer la stabilité de l'enzyme délétée. Les acides aminés pouvant intervenir dans la stabilisation, ont été identifiés ; il s'agirait des résidus 2, 3, 5, 41, 43, 73 et 206. Quand les mutations sont combinées, la subtilisine mutante qui en résulte atteint la stabilité de l'enzyme mature mais n'est plus dépendante du calcium [90].

- Effet des ponts disulfures

De nombreuses références suggèrent l'importance des ponts disulfures dans la stabilité structurale des protéines. Pour aborder ce problème, des ponts disulfures ont été introduits au niveau d'enzymes telles que la dihydrofolate réductase [91] et la T4 lysozyme [92] par mutagenèse site spécifique. Ces ponts disulfures confèrent une certaine stabilité à ces deux protéines aussi bien vis-à-vis de l'inactivation thermique, pour la T4 lysozyme, que vis-à-vis de la dénaturation par la guanidine-HCl ou l'urée, pour la dihydrofolate réductase.

La subtilisine BPN' de *B. amyloliquefaciens* constitue un bon modèle pour l'étude de l'effet de la formation de ponts S-S sur la stabilité des protéines sécrétées. La modélisation informatique suggère que des ponts disulfures peuvent, en effet, être introduits au niveau de la subtilisine BPN' entre le résidu 22 (au niveau de l'enzyme native, c'est une Thr) et le résidu 87 (Ser) ou entre les positions 24 (Ser) et 87 (Ser). Le plasmide recombinant, portant le gène codant pour l'enzyme mutée (au niveau de laquelle deux cystéines a été introduites), est exprimé dans *B. subtilis*. L'enzyme mutée est sécrétée aussi efficacement que l'enzyme native, et le pont disulfure est formé "*in vivo*". Ce pont S-S est introduit approximativement à une distance de 24 Å du site catalytique, il semble n'avoir aucun effet sur l'activité spécifique ou le pH optimum des enzymes mutées [92].

De même, Takagi *et al.* [91] ont introduit des ponts S-S au niveau de la subtilisine E de *B. subtilis*. Le choix des résidus à substituer est réalisé sur la base de la structure de l'aqualysine I de *Thermus aquaticus* YT-1, une sérine protéase thermostable de la famille des subtilisines. La température optimale d'activité sur caséine étant de 80°C. L'aqualysine I contient 4 résidus cystéines qui forment deux ponts disulfures: Cys₆₇-Cys₉₉ et Cys₁₆₃-Cys₁₉₄. Ces ponts semblent être responsables de la thermostabilité de l'aqualysine I.

- Effet des mutations sur la thermostabilité

De nombreux efforts ont été fournis pour comprendre le mécanisme moléculaire de la thermostabilité et pour générer des enzymes thermostables.

L'objectif des chercheurs est d'introduire un nombre relativement faible de substitutions d'acides aminés de sorte à convertir une enzyme à l'origine thermolabile en un variant thermostable sans affecter l'activité catalytique [93].

A cet effet, Zhao et Arnold [93] ont converti la subtilisine E en une enzyme équivalente, sur le plan fonctionnel, à la thermitase de *Thermoactinomyces vulgaris*. Cinq générations de mutagenèses recombinaisons et sélections ont abouti à la création de la subtilisine E5-3H5. Celle-ci a une durée de demi-vie de 35 min à 83 °C (la subtilisine E s'inactive au bout d'une minute à 65 °C alors que la thermitase pour une inactivation immédiate doit être incubée à 80 °C) et une température optimale d'activité de 76 °C, identique à celle de la thermitase. De plus, E5-3H5 est très active en présence de succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide dans un intervalle de température allant de 10 à 90 °C contrairement à la subtilisine E native.

La subtilisine E ne présente que 43 % (157 Aa sont différents) d'homologie avec la thermitase, pourtant seules 8 substitutions sont nécessaires pour convertir la subtilisine E en une enzyme équivalente à la thermitase du point de vue stabilité thermique. Ces substitutions sont en plus distribuées sur toute la surface de l'enzyme (ex : N₂₁₈S ; N₁₈₁D,...).

I.4.7.4. Clonage, séquençage et expression du gène codant pour la subtilisine

En 1983, Wells *et al.* [94] ont réalisé le clonage, le séquençage et l'expression de la subtilisine BPN' de *B. amyloliquefaciens*, dans *B. subtilis* I-168. Le gène a été cloné et exprimé avec son promoteur dans un plasmide à grand nombre de copies, pBS42. Jacobs *et al.* [95] se sont intéressés à la subtilisine Carlsberg de *B. licheniformis* dont ils ont cloné et séquencé le gène.

En 1995, Yamagata *et al.* [96] ont purifié une sérine-protéase extracellulaire produite par une souche de *Bacillus* sp. G-825-6, la subtilisine Sendai. Ils ont cloné et séquencé le gène, *apr* S, qui code pour cette subtilisine, et ont montré par une analyse en "southern-blot" que *apr* S existe en copie unique au niveau du génome de *Bacillus* sp. L'étude de la séquence nucléotidique révèle la présence d'un seul cadre ouvert de lecture, initié par le codon TTG et se terminant par le codon stop TAA à la position 1147 (382 Aa). La séquence Shine-Dalgarno (SD : AGGAGG) est localisée à 9 pb en amont du codon initiateur. La séquence potentielle du promoteur (région -35 : TTGTAA ; région -10 : TATAAT ou TAGAAT) est localisée à 47 ou 262 pb de la séquence SD. Les séquences répétées et inversées du terminateur sont localisées entre les positions 1229 et 1270.

La séquence en acides aminés, déduite à partir de la séquence nucléotidique, révèle que les 27 premiers acides aminés correspondent probablement au peptide signal. Il s'en suit un site du clivage pour une peptidase, le pro-peptide de 86 résidus et la séquence de l'enzyme proprement dite. La séquence en acides aminés déduite coïncide avec celle déterminée à la suite du séquençage de l'extrémité N-terminale d'un fragment peptidique issu de la digestion de l'enzyme par le lysyl endopeptidase.

Au cours de la même année (1995), Jacobs a réalisé le clonage et le séquençage de la région 5'-UTR (5' Un Translated Région) du gène de la subtilisine Carlsberg (*sub C*) de *B. licheniformis* 6816. L'expression a été étudiée au moyen du gène rapporteur LacZ fusionné à ces régions et intégré dans le chromosome d'un hôte hétérologue de *B. subtilis*. L'activité β -Gal des mutants délétés dans la région promotrice a permis à Jacobs d'identifier les régions requises pour la stimulation par les protéines activatrices de la transcription, Deg U et Deg Q. Cette région est proche du tsp (transcription start point) ou point d'initiation de la transcription et est adjacente aux séquences homologues participant à la stimulation par Deg U/Q du gène de la subtilisine (*apr E*) de *B. subtilis* [95].

L'expression de Subtilisine Carlsberg dans *B. subtilis* est optimisée par l'utilisation d'un promoteur hétérologue et par la délétion de la séquence UTR qui semble intervenir dans la structure secondaire du mRNA natif de la Subtilisine Carlsberg. La comparaison avec les autres gènes codant la subtilisine Carlsberg révèle un degré de conservation élevé de la région 5' UTR incluant les séquences régulatrices et le promoteur, en plus de la partie du gène correspondant à l'enzyme proprement dite.

I.5. Application biotechnologiques des protéases

Les enzymes sont des catalyseurs de nature protéique, synthétisées par tous les organismes vivants. Dans l'organisme, ils ont autant pour fonction de synthétiser que de dégrader les constituants d'une cellule. Ces réactions métaboliques ne prennent que quelques fractions de seconde à se réaliser. C'est en étudiant le métabolisme des êtres vivants que les propriétés catalytiques rapides et spécifiques des enzymes ont été découvertes. Elles sont aujourd'hui mises à profit par l'industrie des biotechnologies et sont actuellement largement utilisées comme auxiliaires technologiques. 60 % de ces enzymes sont des protéases dont les domaines

d'application sont assez variés : détergents, tannerie, industrie alimentaire (produits laitiers, vin, pain, poisson, viande, etc...), synthèse peptidique, traitement de la soie, traitement des rejets industriels, etc. Les propriétés catalytiques des protéases sont aussi exploitées par l'industrie des produits chimiques et pharmaceutiques pour la synthèse de nutraceutiques, d'acides aminés, et d'autres bio-ingrédients [97-101], dont la plus grande part est représentée par les protéases alcalines [17, 47].

I.5.1. Détergence

L'idée d'utiliser des enzymes en détergence remonte à 1913, quand Otto Röhm en 1940 a breveté l'utilisation d'enzymes pancréatiques pour l'élimination des taches de sang. Le premier détergent contenant une enzyme bactérienne a été introduit dans le marché des détergents en 1956 sous le nom de BIO-40. En 1960, la société Novo Nordisk a introduit l'alcalase produite par *Bacillus licheniformis* dans un détergent dont le nom commercial était BIOTEX [16]. Cependant, elles ne sont réellement devenues des additifs importants dans les détergents ménagers qu'à partir de 1962 [102].

À la fin des années 70, le développement de réactions allergiques chez certains ouvriers a contrecarré l'utilisation des protéases en détergence. Le problème a été résolu par l'introduction de produits encapsulés.

Aujourd'hui, les enzymes de détergence représentent environ 89 % des ventes totales des protéases dans le monde avec une prédominance des subtilisines et des protéases alcalines issues de bactéries du genre *Bacillus*. Du fait de cette évolution et de l'intérêt grandissant du consommateur pour l'environnement, les fabricants de produits détergents ménagers ont dû s'engager à réaliser les efforts nécessaires pour réduire l'impact des constituants des détergents sur l'environnement. Ceci est possible en diminuant le volume de la dose unitaire du détergent tout en conservant son efficacité, en diminuer le taux d'ingrédients organiques faiblement biodégradables et en réduire l'énergie nécessaire au lavage. Pour ce faire la composition des détergents a été modifiée et mieux adaptée.

La première protéase alcaline industrielle capable de tolérer les conditions de lavage a été lancée par la firme Novozymes en 1962. Cette enzyme nommée

Alcalase, n'est pas un extrait animal, mais plutôt le produit d'une fermentation microbienne issue de *B. licheniformis* [103].

L'intérêt des fabricants a porté essentiellement sur les protéases dont le point isoélectrique est proche du pH de la solution détergente dans laquelle la protéase va agir. D'autres paramètres tels que la compatibilité de l'enzyme avec les autres composants du détergent [103-105] et la force ionique de la solution détergente, le potentiel de résistance de l'enzyme aux pH et températures de lavage, la stabilité de l'enzyme vis-à-vis des conditions de lavages sont prises en compte.

I.5.1.1. Définition

La détergence est définie comme étant un processus de nettoyage durant lequel des salissures sont séparées d'un milieu solide par mise en suspension ou en solution dans un bain de nature aqueuse au moyen d'un détergent. Ce dernier assure trois fonctions :

- La fonction d'usage principale est l'élimination de tous les types de salissures et les odeurs corporelles adsorbées sur les fibres textiles.
- Les fonctions secondaires correspondent à la conservation ou la restauration de la souplesse du linge.
- Le ravivage des couleurs et les fonctions tertiaires associées à la satisfaction du consommateur et au respect de l'environnement [106].

I.5.1.2. La composition d'un détergent

Les ingrédients qui constituent les détergents peuvent être classés en matières actives et auxiliaires de formulation qui assurent différents rôles (tableau I.1). Les enzymes constituent un ingrédient essentiel des détergents mais en aucun cas suffisant. En effet, les détergents sont constitués de plusieurs éléments (figure I.15), dont le rôle permet d'agir sur différents types de salissures et de taches. Il s'agit de garantir la blancheur du linge, d'adoucir les eaux dures pour optimiser les conditions d'action des ingrédients actifs, de préserver la part des couleurs et l'aspect général du linge et de lutter contre la redéposition de la saleté.

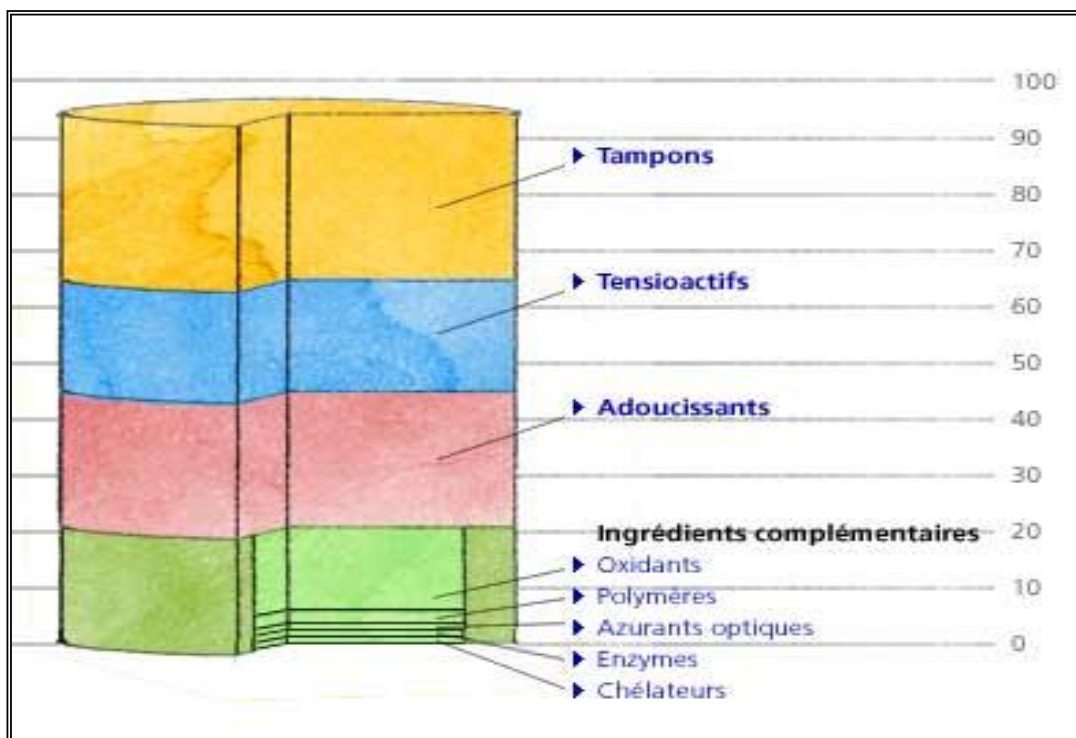


Figure I.13 : Proportions des différents composants des détergents.

Depuis 1998, les lessiviers se sont engagés à réaliser les efforts nécessaires pour réduire l'impact des constituants des lessives sur l'environnement en diminuant le volume de la dose unitaire du détergent tout en conservant son efficacité, à diminuer le volume des emballages, à abaisser le taux des ingrédients organiques faiblement biodégradables et à réduire l'énergie nécessaire au lavage (tableau I.2). Tous ces critères exigent aux fabricants de détergents une évolution permanente des formulations de lessive en incorporant de nouveaux ingrédients permettant d'éliminer les taches plus efficacement, à plus basse température, tout en respectant au mieux le linge et l'environnement [106].

Tableau I.1 : Exemple simplifié de formules de poudre de lavage du linge [102].

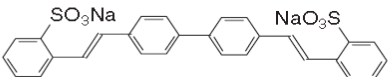
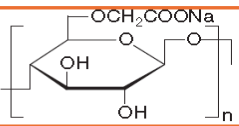
Ingrédients	Structures chimiques	Rôles	%
Matières actives			
Tensioactifs	LAS $\text{NaO}_3\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}(\text{CH}_2)_x-\text{CH}_3$ $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}-\text{SO}_4\text{Na} \quad n=12-15$ $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_7-\text{OH} \quad n=12-15$ $x + y = 9-15$	• Abaissent la tension interfaciale et facilitent le "mouillage" du linge	10-20
	PAS	• Décollent les salissures et les maintiennent en suspension dans le bain lessiviel	2-5
	FAE	• Décolore, par oxydation, les taches colorées	5-12
Perborate de sodium	$\left[\begin{array}{c} \text{HO}-\text{B}-\text{O}-\text{O}-\text{B}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{HO}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{OH} \end{array} \right]^{2-} (\text{Na}^+)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	• Décolore, par oxydation, les taches colorées	12-18
TAED (tétraacétyl-éthylènediamine)	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O} \quad \quad \quad \text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3 \end{array}$	• Activateur du perborate de sodium	5-8
Enzymes	Lipase, protéase, amylase, cellulase	• Dégradent les salissures d'origine biologiques et les fibrilles de coton	1-2
Azurant optique		• Confère au linge un blanc éclatant en fluoresçant dans le bleu	0-1
Auxiliaires de formulation			
Savon	$\text{C}_n\text{H}_{2n+1}-\text{COONa} \quad n=16-22$	• Antimousses	0-1
Silice hydrophobée	Silicones adsorbées sur silice	• Anticalcaire	0-1
Zéolithe	$\text{Na}_{12}(\text{AlO}_2)_{12}(\text{SiO}_2)_{12} \cdot 27\text{H}_2\text{O}$	• Anticalcaire	15-20
Copolymère maléique et acrylique	$\left[\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \\ \text{O}^- \quad \text{O}^- \end{array} \right]_n \left[\begin{array}{c} \text{CH}-\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \\ \text{O}^- \quad \text{O}^- \end{array} \right]_m$	• Renforce l'action des anticalcaires	4-6
Disilicate de sodium	$\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$	• Alcalinisant, anticalcaire, inhibiteur de corrosion	4-8
Carbonate de sodium	Na_2CO_3	• Alcalinisant (anticalcaire)	12-16
Carboxyméthylcellulose de sodium		• Empêche la redéposition sur le linge des salissures du bain lessiviel	0-1
Parfum	Mélange complexe de molécules organiques volatiles	• Confère au linge une odeur agréable après lavage	0-1
Eau et sulfate de sodium	Na_2SO_4	• Charges assurant la cohésion des granulés	Qsp 100

Tableau I.2 : Historique de l'innovation technologique dans le domaine des lessives [102].

Année	Innovation	Marque
1907	1 ^{ier} détergent à base de perborate et de silicate mélangé au savon en poudre : « lave tout seul »	PERSIL (Henkel)
1946	1 ^{ier} détergent de synthèse lancé aux Etats-Unis à base d'alkylbenzènesulfonate (ABS) : « un océan de mousse »	TIDE (P & G)
1952	Agents complexants ou « builders » : Les tripolyphosphates de sodium (STPP)	OMO (Unilever)
1959	1 ^{ère} lessive en poudre non moussante : « recommandé par 49 marques de machines à laver »	SKIP (Unilever)
1964	Remplacement des ABS par les LAS (« linearalkylbenzenesulfonate ») en Allemagne puis en France, en Italie et au Japon	Toutes les marques selon la réglementation
1968	1 ^{ères} lessives biologiques en poudre contenant des enzymes dégradant les taches protéiniques à basse température : (« enzymes gloutons »)	ARIEL poudre (P & G) ALA (Unilever)
1978	Activateur du perborate : Le tétra-acétyl-éthylène-diamine (TAED)	SKIP (Unilever)
1982	Lessives liquides isotropes à dissolution rapide dans l'eau	VIZIR (P & G)
1983	Lessives liquides structurées à base de liposomes permettant d'incorporer un taux important de STPP 1 ^{ère} lessive concentrée pour tous lavages	WISK (Unilever)
1987	1 ^{ère} lessive en poudre compacte lancée au Japon : « 10 fois plus concentrée »	ATTACK (Kao Corporation)
1989	1 ^{ère} lessive à base de zéolithes en remplaçant les phosphates : « la propreté éclatante et la contribution à un meilleur environnement »	LE CHAT (Henkel)
1994	1 ^{ère} lessive à base de catalyseur au manganèse permettant d'éliminer les taches à basse température : « un concentré d'innovations »	SKIPpower (Unilever)
1998	1 ^{ère} lessives en pastilles : « la propreté au meilleur de sa forme »	SKIP tablets (Le ChatTabs)

L'industrie des détergents représente le marché de masse par excellence (20 millions de tonnes/an mondial) et de haute technologie, l'industrie des détergents est dominée par quatre sociétés multinationales, à côté de quelques opérateurs locaux dont le marché reste national (figure I.14) [106].

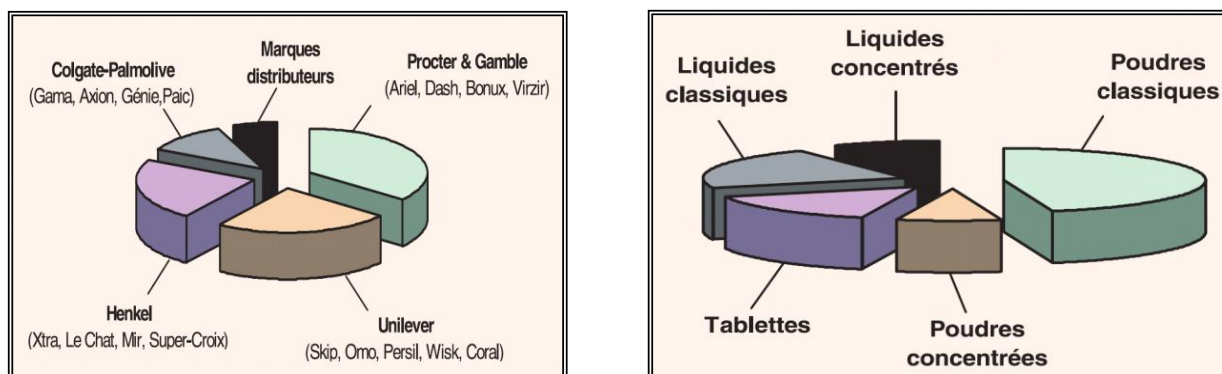


Figure I.14 : Parts du marché européen par société en 1998 et segmentation des différentes formes de lessives : liquides (classiques, concentrés), poudres (classiques, concentrées) et tablettes [102].

I.5.1.3. Les enzymes détergentes

En raison du développement des lessives compactes et de l'abaissement des températures de lavage, les enzymes d'origine bactérienne (genre *Bacillus*), sont actuellement utilisées et représentent très certainement les ingrédients de l'avenir essentiel pour la formulation des détergents de future [107-109]. Elles sont efficaces à des taux extrêmement faibles et même à température modérée (20-40 °C) vis-à-vis de certaines taches difficiles à éliminer [106]. En effet, l'utilisation des enzymes dans les produits détergents sera la clef du problème écologique résultant de l'utilisation excessive des détergents chimiques lesquels sont corrosifs, toxiques et non biodégradables entraînant ainsi la pollution de l'environnement.

Les enzymes détergentes peuvent être utilisées sous forme poudre, granules ou liquide. Bien que leur incorporation sous forme liquide soit pratique. Les enzymes granulées se sont avérées les plus stables au cours du stockage dans les formulations détergentes solides et liquides.

I.5.1.4. Critère de choix

La stabilité des enzymes est une préoccupation pour les fabricants de détergents, qui veulent assurer que les enzymes incorporées dans un détergent demeurent actives et stables jusqu'au lavage.

Plusieurs paramètres importants dans la sélection de bonnes enzymes de détergence à savoir:

✓ Un des paramètres les plus importants dans la sélection des enzymes de détergence est la valeur de leur point isoélectrique (pI). Il est connu que les performances des biocatalyseur de détergence sont meilleures quand la valeur du pH de la solution de détergent est approximativement la même que la valeur du (pI) de l'enzyme [17].

✓ La compatibilité avec les composants du détergent, tels que les surfactants, les parfums, les agents de blanchiment [103, 104, 110].

➡ Les tensioactifs anioniques sont utilisés généralement dans les détergents, forment facilement avec les protéines peu hydrosolubles des complexes protéine/tensioactif mettant en jeu des interactions de type polaire et apolaire entraînant l'inactivation de l'enzyme. Ils peuvent même provoquer la dénaturation complète des enzymes, tel que l'effet du LBAS (sulfonate alkyl benzène linéaire) sur les protéases et les amylases [111].

➡ Les adjuvants de détergence : un certains nombre d'adjuvants exercent un effet déstabilisant sur les enzymes comme :

- L'eau : les enzymes sont instables dans les compositions aqueuses [112].
- L'agent de blanchiment : il accélère la dégradation des protéases [113].
- Les enzymes protéolytique : les protéases décomposent différents types d'enzymes tels que les lipases, les cellulases et les amylases au cours du stockage [114] et peuvent se dégrader mutuellement. Par ailleurs, le phénomène de dénaturation et d'agrégation des protéases est très rencontré [115].

✓ La compatibilité avec la force ionique de la solution de détergent.

✓ La dégradation des taches et élimination potentielle.

✓ La bonne activité à des pH alcalins et des températures modérées [116-118].

✓ La stabilité de l'enzyme vis-à-vis des conditions de la détergence [119].

I.5.1.5. Exemple de protéases détergentes

Les enzymes sont utilisées dans les détergents sont toutes produites par des bactéries du genre *Bacillus* (tableau I.3). Elles sont essentiellement des sérines endopeptidases, non spécifiques qui coupent préférentiellement au niveau du site carboxyle des acides aminés hydrophobes, mais qui sont capables d'hydrolyser la majorité des liaisons peptidiques.

Seules les protéases à sérine qui peuvent être utilisées dans la formulation des détergents. En fait, les protéases à thiol sont oxydées par les agents de blanchiment et les métalloprotéases perdent leur métal (cofacteur) par complexation avec les agents chélateurs. La protéase la plus utilisée est la subtilisine Carlsberg (Alcalase) produite par la souche *Bacillus licheniformis*, qui présente toutes les caractéristiques d'une excellente protéase détergente.

Différents types d'enzymes permettent, d'obtenir un haut niveau de performance en terme d'élimination des taches, le nettoyage total, la protection du textile, garantir la blancheur du linge, préserver l'éclat des couleurs et lutter contre la redéposition de la saleté. Ces enzymes sont:

- L'Alcalase® de Novozymes, formée par la subtilisine A de Carlsberg est produite par une souche de *B. licheniformis*. Elle est très employée et active dans les conditions neutres ou légèrement alcalines (pH 7-9), donc parfaitement adaptée aux détergents ménagers liquides qui présentent en général un pH de 8 à 9. Sa température optimale d'action est de 60 °C, alors que son pH optimum d'activité est de 7,5 à 8,5. L'enzyme est stable après incubation 1 h à 50 °C, garde environ 45 % de son activité initiale à 65 °C et s'inactive après incubation à 70 °C.

- La Savinase®, formée par la subtilisine 309, également de Novozymes agit dans des conditions plus alcalines (pH 8-11) que l'Alcalase, et elle est particulièrement efficace aux moyennes températures de lavage. Elle présente une activité optimale à 55 °C, mais elle est également efficace à basse température. Cette protéase est la plus vendue dans le monde et employée par de nombreuses grandes marques de détergents ménagers. La Savinase, comme les autres protéases, est sensible aux attaques des agents de blanchiment. Depuis quelques années, Novozymes travaille à la mise au point de variantes de Savinase plus stables au blanchiment, exploitant les dernières techniques d'ingénierie des

protéines pour améliorer l'enzyme. L'**Everlase™** est le résultat de ces travaux qui offre une meilleure stabilité au cours du stockage en présence d'agents de blanchiment dans les détergents avec une meilleure performance au lavage.

➤ L'**Espérase®** de Novozymes, conserve son effet lavant en milieu hautement alcalin (jusqu'à pH 12) et à haute température. Elle est active dans les conditions qui inactivent les autres protéases. Elle est parfaitement adaptée aux détergents pour blanchisseries industrielles qui fonctionnent à des températures de 60 à 70 °C et à des pH alcalins supérieurs à 10. Elle s'est aussi imposée dans les détergents pour lave-vaisselle automatique car ceux-ci présentent pour la plupart un pH élevé et de nombreux programmes de lave-vaisselle fonctionnant à des hautes températures.

➤ La **Kannase™** ou protéase (« cool ») conserve toute son efficacité à des températures de 10 à 20 °C. Cette efficacité à basse température est un élément clé de la performance des protéases dans les détergents, surtout dans certains pays de l'Asie (Japon), de l'Australie ou de l'Amérique latine où la lessive se fait à l'eau froide après une longue période de trempage.

A côté des protéases qui dégradent les taches protéiques telles que le sang, l'œuf ou le lait, de nombreux détergents de lessive contiennent d'autres enzymes, seules ou en combinaison. Les lipases (exemple : **Lipolase®**) agissent sur les salissures grasses en catalysant l'hydrolyse des triglycérides insolubles comme ceux du sébum, des huiles végétales ou des produits cosmétiques. Les amylases (exemple : **Termamyl®**) scindent les liaisons α -(1,4) des molécules d'amidon rencontrées dans les pâtes ou les pommes de terre. Enfin, les cellulases (exemple : **Celluzyme®**) dégradent les micro-fibrilles qui apparaissent sur le coton au fil des lavages.

Tableau I.3 : Exemple de protéases commerciales utilisées dans les détergents [15].

Variantes de subtilisines actuellement utilisées en detergence					
Marque	Producteur	Origine	WT/PE ^c	Souche productrice	Synonyme
Alcalase [®]	Novozymes	<i>B. licheniformis</i>	WT	<i>B. licheniformis</i>	Subtilisine Carlsberg
FNA ^a	Genencore	<i>B. amyloliquefaciens</i>	PE	<i>B. subtilis</i>	
Savinase [®]	Novozymes	<i>B. clausii</i>	WT	<i>B. clausii</i>	Subtilisine 309
Purafect [™]	Genencore	<i>B. lentus</i>	WT	<i>B. subtilis</i>	
KAP ^b	Kao	<i>B. alkalophilus</i>	WT	<i>B. alkalophilus</i>	
Everlase [™]	Novozymes	<i>B. clausii</i>	PE	<i>B. clausii</i>	
Purafect OxP [™]	Genencore	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. clausii</i>	
FN4 ^a	Genencore	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. subtilis</i>	
BLAP S ^b	Henkel	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. licheniformis</i>	
BLAP X ^b	Henkel	<i>B. lentus</i>	PE	<i>B. licheniformis</i>	
Esperase [™]	Novozymes	<i>B. halodurans</i>	WT	<i>B. halodurans</i>	Subtilisine 147
Kannase [™]	Novozymes	<i>B. clausii</i>	PE	<i>B. subtilis</i>	
Properase [™]	Genencore	<i>B. alkalophilus</i> PB92	PE	<i>B. alkalophilus</i>	

^a Molécules exclusives pour consommateurs spécifiques.

^b Molécules exclusives à usage industrielle. Les noms des produits sont souvent basés sur des termes techniques ou acronymes.

^c Enzyme obtenu par ingénierie des protéines, PE (« Protein Engineered »); Enzyme native, WT (« Wild-type »).

I.5.2. Synthèse de peptides

Bien que les protéases soient des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse (réactions de synthèse de peptides) dans des milieux non conventionnels [120-123]. Elles représentent l'une des premières familles d'enzymes qui ont longtemps été utilisées pour catalyser la synthèse de peptides en présence des solvants organiques [124].

Comparée aux méthodes chimiques, la synthèse enzymatique de peptides offre de nombreux avantages. En effet, la réaction peut être stéréospécifique et les réactions ne requièrent plus de groupements protecteurs, de plus, on assiste à une augmentation de la solubilité des substrats apolaires ou à un changement de l'équilibre thermodynamique qui favorise la réaction de synthèse au détriment de la réaction de l'hydrolyse [99].

Cette réaction de synthèse consiste en une suite de réactions (formation d'un lien amide) entre différents acides aminés pour obtenir une molécule plus complexe, un peptide, en utilisant d'enzymes qui sont actives dans les solvants organiques à faible quantité d'eau avec une bonne solubilité du substrat et du produit [125].

Deux méthodologies sont adoptées dans les réactions de synthèse peptidiques qui sont la synthèse en phase homogène et la synthèse en phase solide. La première méthode consistait en la condensation de fragments. Un octapeptide pouvait être obtenu par condensation de deux tétrapeptides eux-mêmes obtenus à partir de deux dipeptides. La méthode de synthèse par couplage de fragments est particulièrement utilisée pour la synthèse de peptides longs ou encore pour la synthèse de séquences dites difficiles.

L'avantage majeur de cette méthode est que d'une part les différents fragments intermédiaires sont purifiés et caractérisés, mais surtout, les propriétés physico-chimiques des différents fragments sont très nettement différentes du peptide désiré ce qui facilite les étapes de purification. Une autre approche consistait à synthétiser le peptide, d'autre part une des premières synthèses de peptide par cette approche remonte à 1953.

A cette époque, Du Vigneau et ses collaborateurs avaient réussi la synthèse de l'ocytocine qu'est une hormone peptidique de neuf acides aminés. A première

vue, la synthèse peptidique par cette stratégie peut paraître simple, mais il ne faut pas négliger que les différents acides aminés comportent des fonctionnalités différentes qui peuvent conduire à de nombreux produits secondaires. Prenons le cas du couplage d'une glycine sur l'alanine. Lors de la mise en réaction de ces deux composés, on peut obtenir un mélange de produits composés d'H-Ala-Ala-OH, H-Gly-Gly-OH, H-Ala-Gly-OH (peptide désiré), mais aussi H-Gly-Ala-OH [126].

Cette stratégie de synthèse implique donc des étapes de purification et d'analyse entre chaque couplage et la complexité du mélange augmentent lorsque les acides aminés utilisés possèdent des chaînes latérales réactives. L'utilisation des esters activés permet de diminuer la complexité du mélange en favorisant la formation du produit désiré. On peut également diminuer la complexité du mélange en recourant à une protection de la fonction amine ce qui permet d'obtenir uniquement le produit désiré. Lorsque les acides aminés utilisés possèdent une chaîne latérale réactive (ex : lysine), il faut également protéger la chaîne latérale afin d'éviter son implication dans la réaction. Ce type de synthèse ne permet pas l'utilisation d'un large excès de réactif, puisque tout excès de réactif devient une impureté pour le produit final. La stratégie de synthèse peptidique en phase homogène, bien qu'efficace, reste très contraignante, car elle nécessite une étape de purification après chaque étape. L'introduction de la synthèse en phase solide a révolutionné la synthèse peptidique [127]. En 1963 Merrifield a eu l'idée géniale d'ancrer le premier acide aminé à une matrice de polymère insoluble [128].

Un premier avantage de la synthèse peptidique en phase solide est que le composé intermédiaire d'intérêt, est ancré sur la phase solide, ce qui supprime les étapes de purification car un simple lavage suffit pour éliminer les réactifs restés en solution. Le second avantage de l'ancrage de molécules sur un support solide, qui découle du premier est que la synthèse sur support solide permet l'utilisation d'un excès de réactifs, puisque la molécule d'intérêt reste sur le support solide jusqu'à la fin de la synthèse et à nouveau l'excès peut être éliminé par un simple lavage.

La synthèse de peptides consiste donc en une répétition des étapes de couplages et de déprotections jusqu'à l'obtention du peptide désiré, qui est ensuite séparé du support par coupure chimique et ensuite purifié et analysé [129].

Ainsi, les protéases ont été utilisées avec succès pour la synthèse de dipeptides [130] et tripeptides [131], dans l'estérification régiosélective de peptides [132] et l'hydrolyse stéréosélective de peptide-ester [133]. Par exemple, sous certaines conditions cinétiquement contrôlées, une préparation de thermolysine immobilisée de *Bacillus thermoproteolyticus* est impliquée dans la synthèse de l'ester méthylique de l'aspartyl-phénylalanine, connu sous le nom d'aspartame [134]. Il est produit industriellement par Toya Soda (Japon) [11, 135]. Il est encore utilisé comme édulcorant dans beaucoup d'aliments et de boissons hypocaloriques [136].

D'ailleurs, plusieurs travaux de recherche sont intéressés à découvrir des enzymes protéolytiques stables convenablement dans les solvants organiques et qui répondent à la biotechnologie de synthèse peptidique. Ainsi, le coût de production est intéressant et compétitif avec celui des méthodes chimiques [120], puisque cette réaction enzymatique nécessite moins de groupes de protection, de solvants organique et de produits chimiques nocifs, ce qui amène à un coût de production compétitif avec ceux des méthodes chimiques. Il est à noter que la nature et le type du solvant organique utilisé a un effet important sur l'activité de la protéase [137]. En 1999, Castro a étudié l'effet de 14 solvants organiques sur l'activité enzymatique de la subtilisine. Il a montré que la subtilisine présente dans le glycérol une activité 500 fois plus importante que celles obtenues dans l'éthylène glycol, le N-méthylformamide ou le 1-2 ou 1-3-propanediol [138]. Nagashima et *al.*, et Gololobov et *al.* ont étudié les répercussions sur la réaction de synthèse de peptides, de la nature de l'enzyme, du solvant, du milieu et du substrat en utilisant l' α -chymotrypsine, la subtilisine BPN' et la subtilisine Carlsberg de *B. subtilis* 72 sur la synthèse des peptides dans les solvants organiques [139-142]. La thermolysine de *B. thermoproteolyticus* immobilisée est utilisée pour la synthèse de l'aspartame, un dipeptide formé par du L-aspartate et de méthyle ester de la L-phénylalanine [143].

D'autres ont étudié l'effet de divers solvants organiques sur l'activité et la stabilité d'une protéase extracellulaire produite par l'archée haloalcalophiles *natrionalba magadii*. Cette protéase est active et stable dans un mélange de solvants aqueux-organiques contenant 1,5 M de NaCl et de glycérol, le diméthylsulfoxyde (DMSO), le N,N-diméthylformamide, le propylèneglycol, et le dioxane qui ont été efficaces pour préserver la stabilité de l'enzyme. Ces résultats montrent que cette enzyme est

tolérante au solvant et suggère pour une application potentielle de synthèse peptidique dans un solvant organique [144].

Une étude a testé la tolérance d'une protéase purifiée exprimée par une bactérie halophile *Salinivibrio* sp., vis-à-vis des solvants organiques et a révélé que cette enzyme présente une stabilité complète dans le toluène, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et le n-hexane à 10 et 50 % (v/v) et une stabilité modérée même dans 50 % de DMSO et d'éthanol [145].

I.5.3. L'industrie agroalimentaire

Les protéases microbiennes sont exploitées dans différents secteurs d'industrie alimentaire [99]. Du fait de leur activité hydrolytique, les protéases ont été exploitées pour la préparation des hydrolysats protéiques de haute valeur nutritionnelle. Ces hydrolysats protéiques peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la pression sanguine, ils sont introduits aussi dans la formulation des produits alimentaires pour nourrissons, dans des produits thérapeutiques spécifiques des régimes alimentaires et dans la fortification des jus de fruit et des boissons non alcoolisées [146, 147].

Les protéases alcalines ont également servi à la production, à partir de poissons bon marché ou de déchets de poissons, d'hydrolysat de protéines ou encore la fabrication de certains produits fermentés (sauce de poisson, ..). Craven et *al.* [148] ont rapporté la production d'hydrolysats de poisson de haute valeur nutritionnelle en utilisant les protéases de *B. subtilis*.

Les protéases sont ainsi utilisées dans la préparation d'une variété d'hydrolysats protéiques naturels dont l'une des applications la plus intéressante est le renforcement des arômes [149]. En effet, plus l'hydrolyse produit des acides aminés libres et des peptides de petite taille, plus l'arôme est intense. Les complexes d'endopeptidases et d'exopeptidases de la préparation Flavourzyme de Novozymes présentent cette caractéristique : il permet d'atteindre un degré d'hydrolyse supérieur à 50 % ou plus de la moitié des liaisons peptidiques de protéines hydrolysées. Cette préparation enzymatique est utilisée par les fabricants d'exhausteurs d'arômes, d'hydrolysats de levures, de protéines végétales hydrolysées (PVH) et de protéines animales hydrolysées (PAH) pour relever les arômes. Ces produits aromatiques sont

très utilisés dans les soupes, les bouillons cubes, les assaisonnements et les plats cuisinés. Fugimaki et *al.* [150] ont utilisé des protéases alcalines pour la production d'hydrolysats de protéines de soja.

De même, des applications plus récentes ont vu le jour dans l'industrie des produits marins ; l'utilisation de protéases s'est révélée efficace pour l'élimination de la peau ou des écailles dans le cas de certaines espèces, l'hydrolyse des membranes et enveloppes des œufs de poisson (production de caviar), l'élimination du collagène entourant le foie de morue avant l'étape d'emboîtement dans les conserveries, l'extraction de composés aromatiques à partir de coquilles ou autres matières premières ou de caroténoïdes à partir de crustacés.

Les protéases alcalines sont utilisées dans la production mondiale du fromage, et de petit lait avec une estimation de production mondiale de 145×10^6 t/an [151].

L'alimentation animale est aussi l'une des applications des enzymes dans l'industrie alimentaire. En effet, les protéases sont utilisées dans la dégradation des polymères constitutifs de la matière végétale afin d'améliorer la digestibilité et la qualité nutritive de certaines substances alimentaires. Des essais effectués au Japon ont montré que les combinaisons d'enzymes produites par Novo Nordisk et conçues pour dégrader les protéines et les fibres (Biofeed pro et Biofeed plus) améliorent de façon significative la digestibilité chez les porcelets, ce qui accroît nettement la production de la viande [103].

I.5.4. Synthèse chimique

Certaines protéases sont impliquées aussi dans la synthèse de divers produits chimiques. La protéase alcaline de *B. subtilis* a été récemment utilisée en synthèse chimique en milieu non conventionnel contenant la pyridine. En effet, elle a permis de polymériser la cytarabine avec une sélectivité et un rendement important [152]. Ce polymère est un médicament anticancéreux.

Wang et *al.* [153] ont utilisé la même protéase alcaline de *B. subtilis*, dans les réactions de trans-estérification dans un solvant organique (DMF) pour préparer d'autres drogues.

I.5.5. La tannerie

L'utilisation des enzymes en tannerie, comme alternative des produits chimiques, a été un succès dans l'amélioration de la qualité du cuir et dans la réduction de la pollution de l'environnement. Cette approche enzymatique présente de nombreux autres avantages, notamment, le contrôle facile et rapide du processus avec réduction des pertes [154].

Les protéases qui possèdent des activités élastolytiques et kératinolytiques peuvent être utilisées dans ce type d'industries. Les enzymes protéolytiques sont utilisées dans les trois étapes de transformation successives du traitement des cuirs : trempage, épilage ou pélanage et confitage [99, 155], et doivent présenter une bonne activité enzymatique à des températures allant de 25 à 35 °C [101]. Elles permettent l'hydrolyse sélective du constituant non collagèneux de la peau et la transformation des protéines non fibrillaires comme l'albumine et la globuline. Lors de l'étape de trempage les protéases sont employées pour la dégradation des protéines inter- fibrillaires au niveau des peaux séchées, ce qui facilite l'absorption de l'eau et diminuer le temps nécessaire à cette étape. L'utilisation des protéases durant l'étape d'épilage permet quant à lui d'améliorer les propriétés physiques de la peau et de réduire presque de moitié le temps de pélanage. Le dernier traitement protéolytique qui précède le tannage permet d'assouplir le cuir.

Varela et *al.* [156] ont rapporté l'utilisation de la protéase alcaline de *B. subtilis* IIQDB32 pour le traitement des peaux de mouton. De même, George et *al.* [157] ont utilisé la protéase alcaline de *B. amyloliquefaciens* pour le traitement des peaux.

I.5.6. Traitement des films photographiques

Les protéases notamment alcalines, peuvent potentiellement être appliquées dans le traitement des films photographiques pour récupérer l'argent qu'ils contiennent. Les films photographiques sont constitués de polyester, comme matière de base, enveloppés par une couche de gélatine et une couche d'argent (1,5 à 2 % par unité de masse). Conventionnellement, cet argent est récupéré par le traitement thermique des films, ce qui est l'origine de pollution et d'émanations indésirables. De plus, cette méthode ne permet malheureusement pas la récupération du polyester (matière de base du film). Cependant, l'hydrolyse enzymatique des couches de gélatine sur le film radiographique permet non seulement la récupération de l'argent,

mais également à la base du film de polyester, d'être réutilisée [98, 99]. Plusieurs protéases ont été utilisées dans ce type d'application, telle que la protéase alcaline de *B. subtilis*. Celle-ci permet la décomposition de la couche de gélatine et la récupération de l'argent à la suite d'une incubation à 50-60 °C pendant 30 min [158]. Ainsi, les protéases alcalines de *Bacillus sp.* B21-2 [159], *Bcillus sp.* B18' [160] et *B. coagulans* PB-77 [161] sont capables de dégrader la gélatine des films photographiques et permettent ainsi de recycler l'argent. D'autres souches du genre *Bacillus* produisant des protéases gélatinolytiques ont été isolées par d'autres chercheurs [161-163].

I.5.7. Traitement des rejets industriels et des ordures ménagères

L'utilisation de protéases a été également introduite dans le traitement des déchets de différentes industries alimentaires et des activités ménagères. En effet, les protéases solubilisent les déchets protéiques et contribuent à la diminution de la demande biologique en oxygène (DBO) dans les systèmes aquatiques. C'est pourquoi, les protéases alcalines ont été récemment utilisées dans la gestion des ordures de diverses industries et activités ménagères.

Plusieurs chercheurs ont utilisé des protéases alcalines de microorganismes pour le traitement des déchets de volailles (plumes) qui représentent environ 5% de leur poids et qui représentent une source importante de protéines pour l'alimentation animale [164].

Dalev [165] a rapporté l'utilisation d'une protéase de *B. subtilis* pour le traitement des déchets de volailles (plumes). Jacobson [166] a décrit la composition d'un produit contenant des enzymes protéolytiques de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* et *Streptomyces sp.*, avec un agent réducteur qui active la dégradation des cheveux et aide dans le nettoyage des conduites bouchées. Ce produit a été préparé et breveté par Genex.

I.5.8. Traitement de la soie

L'une des plus récentes exploitations des protéases concerne le traitement de la soie. Celle-ci est formée de deux types de fibres : les fibres de fibroïne (substance protéique blanche, douce et brillante) et les fibres de séricine (substance protéique

raide et terne), ces dernières doivent être éliminées pour rendre la soie plus soyeuse [8].

Les fibres de séricine représentent 25 % de la soie brute, elles sont d'ordinaire éliminées par immersion des fibres dans l'eau chaude savonneuse et légèrement alcaline [167]. Ce processus était généralement coûteux, une méthode alternative suggérant l'utilisation des préparations enzymatiques, telles que les protéases, a été mis au point. Le traitement enzymatique consiste à placer les fibres dans une solution contenant l'Alcalase de Novo à pH 8 et à une température de l'ordre de 55 à 60 °C [168]. Un traitement efficace des fibres de soie par une protéase alcaline produite par *Bacillus* sp., RGR-14 a été étudié. Les résultats sont analysés par gravimétrie (réduction en masse des fibres) et par microscope électronique à balayage (MEB). Après 5 h d'incubation des fibres avec la protéase de *Bacillus* sp., une diminution de 7,5 % en masse de celles-ci a été enregistrée. L'observation microscopique de ces fibres montre qu'il y a eu dispersion des amas fibreux par rapport aux fibres non traitées qui sont compactes [169].

I.5.9. L'usage médical et l'industrie pharmaceutique

Les protéases sont aussi utilisées dans le développement de produits d'intérêt médical. Kudrya et Simonenko [170] ont exploité l'activité élastase de *B. subtilis* 316 M pour la préparation d'élastotérase qui est appliquée pour le traitement des brûlures, des plaies, des furoncles, etc. Kim et al. [171] ont rapporté l'utilisation de protéases alcalines de *Bacillus* sp CK, ayant une activité fibrinolytique dans le traitement de thromboses.

D'autre part, une large diversité de protéases est utilisée pour la production d'agents à usage thérapeutique telle que les peptides et les dipeptides comme l'aspartame qui est utilisé comme édulcorant non énergétique. En effet, l'administration orale de protéases : Luizym et Nortase d'*Aspergillus oryzae*, a été utilisée comme une aide digestive pour corriger certains syndrômes de déficience en enzymes lytiques. De même, la collagénase clostridiale est utilisée en combinaison avec un large spectre d'antibiotiques dans le traitement des brûlures et des blessures [172]. L'activité élastase de certains microorganismes a été exploitée pour la préparation d'élastotérase qui est utilisée dans le traitement des brûlures, de plaies infectées [173]. La protéase alcaline de *Conidiobolus coronatus* s'est révélée

capable de remplacer la trypsine dans les cultures de cellules animales pour séparer les cellules en hydrolysant les protéines responsables de l'adhérence [16].

Certaines protéases bactériennes sont également impliquées dans la synthèse de divers produits chimiques à usage thérapeutique. L'enzyme a permis l'hydrolyse de différents types de collagènes sans libération d'acides aminés mais plutôt des peptides à faible poids moléculaire possédant un potentiel thérapeutique [174].

De plus, la plupart des espèces du genre *Bacillus* ont été reconnues en tant qu'organismes sans danger pour les humains [174], elles sécrètent des protéases alcalines ayant des activités fibrinolytiques et qui sont utilisées comme agent thrombolytique [174, 175]. C'est le cas par exemple de la protéase alcaline de *B. subtilus* qui a été utilisée pour la synthèse chimique en milieu non conventionnel contenant de la pyridine. En effet, l'enzyme a permis de polymériser la cytarabine avec une sélectivité et un rendement importants. Ce polymère est un médicament anticancéreux [176]. La protéase alcaline de *B. subtilis* a également été utilisée dans des réactions de trans-estérification avec un solvant organique : le DMF pour préparer trois autres drogues anti-inflammatoires non stéroïdiennes : β -cyclodextrines de configurations différentes : (2a ; 3a ; R), (2b ; 3b ; R) et (2c ; 3c ; R) [177].

I.5.10. Autres application des protéases

Certaines protéases sont utilisées aussi en :

- Panification : Amélioration de l'élasticité de la pâte (les protéases fongiques).
- Biscuiterie : Amélioration des qualités organoleptiques.
- Charcuterie : Amélioration de la qualité de la viande.
- Industries laitière et fromagerie : Coagulation des protéines du lait et son aromatisation par action de la présure puis de la Neutrase.
- Brasserie : Prévention du trouble au froid de la bière par action de la papaïne.
- Préparation des hydrolysats de protéines à usage microbiologique tel que peptone, tryptone...

I.6. Conclusion

La technologie enzymatique traverse actuellement une phase de maturation et d'évolution. La maturation est montrée par le développement de la théorie concernant la façon dont les enzymes fonctionnent et comment cela est lié à leur structure primaire par la formation et la configuration de leur structure tridimensionnelle. L'évolution est marquée par la gamme d'applications enzymatiques dans différents domaines.

Les enzymes seront évidemment plus largement utilisées dans l'avenir et cela sera reflété dans le nombre d'enzymes disponibles à l'échelle industrielle (et de recherche), la variété des réactions catalysées et la gamme de conditions environnementales dans lesquelles ils opèrent. Des enzymes seront mis à de nouveaux usages et de nouvelles enzymes, découvertes dans leurs niches biologiques ou produites par des organismes vivants, seront appliquées dans différents domaines industriels afin de généraliser l'utilisation des méthodes biologiques.

Aujourd'hui, certaines protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et utilisé en biotechnologie industrielle et d'autres sont de merveilleux outils dans la recherche. On commence également à extraire des enzymes plus stables dans des environnements physico-chimiques extrêmes. Il s'agit donc d'un thème à la fois très intéressant et prometteur au point de vue économique.

Chapitre II

Production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis*

II.1. *Bacillus licheniformis*

II.1.1. Présentation de la souche

Bacillus licheniformis est un bacille mobile à Gram positif, aérobie. La bactérie est ubiquitaire dans la nature. Elle existe surtout sous forme de spores résistantes aux conditions environnementales stressantes et elle est souvent saprophyte [178].

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*. Il se distingue des autres représentants de la famille par sa morphologie et son type respiratoire. Ce genre rassemble des bacilles à Gram positif, aérobies ou anaérobies facultatifs et capables de former une endospore. Ce groupe apparaît extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique, le pourcentage (%) en (G + C) des diverses espèces varie de 32 à 69 que phénotypique (type respiratoire, métabolisme des sucres, composition de la paroi, habitat, ...) [178]. L'étude des ARNr 16S et 23S confirme cette hétérogénéité.

Traditionnellement, les espèces du genre *Bacillus* sont réparties en 3 groupes selon la morphologie de la spore. *B. licheniformis* appartient au groupe I qui regroupe des bacilles de Gram positif présentant une spore centrale ou terminale, sphérique ou ovoïde, ne déformant pas la cellule.

B. licheniformis, *B. subtilis* et *B. pumilis* sont des espèces très proches qui appartiennent au groupe *Bacillus*. Les études basées sur l'hybridation ADN/ADN ont montré que les membres de ce groupe sont génétiquement homogènes [178].

Récemment, les génomes de deux souches de *B. licheniformis* ATCC 14580 [179] et *B. licheniformis* DSM13 [180] ont été totalement séquencés et leurs séquences sont disponibles sur le site web de l'NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) .

Le génome de *B. licheniformis* ATCC 14580 est formé d'un chromosome circulaire de 4.222.336 pb (4,2 Mpb) avec un pourcentage en GC de 46,2. Il renferme 4208 CDS (Coding DNA Sequences), qui constituent 87 % de la totalité du génome.

La souche *B. licheniformis* est largement utilisée dans la fermentation industrielle. Elle est caractérisée par la production de protéases, d'amylases et d'antibiotiques. Le catalogue ATCC des bactéries et des phages, cite certaines souches qui sont capables de produire des protéases alcalines, d'alpha-amylases, de penicillinase, et d'acide citrique [181].

II.1.2. Caractéristiques générales

Bacillus licheniformis est une bactérie hétérotrophe chimioorganotrophe, qui s'apparente étroitement à *Bacillus subtilis*. Les cellules de *B. licheniformis* sont des bâtonnets droits mesurant entre 1 et 2 µm de longueur et ayant un diamètre de moins de 0,9 µm. Elles sont mobiles et se présentent à l'état seul ou en chaînes de longueurs variables. Il s'agit d'une bactérie Gram positif, et sporulante. Cette bactérie produit une seule spore, de forme ellipsoïdale, qui est située en position sub-terminale dans la cellule. Sur gélose nutritive, *B. licheniformis* produit des colonies à la morphologie changeante. Les jeunes colonies sont petites, ondulées, rondes à bordure régulière et transparente. Les colonies plus âgées grossissent et deviennent plates, rondes à bordure crénelée, opaques et dures, évoquant l'aspect du lichen. De plus, elles adhèrent fortement à la gélose. *Bacillus licheniformis* se distingue par sa capacité à produire de nombreux métabolites d'intérêt commercial, énumérés au tableau II.1 [182-184].

Tableau II.1 : Métabolites d'intérêt commercial produits par *Bacillus licheniformis*.

Classes	Métabolites
Enzymes	Protéases Alpha-amylases Pénicillinasés Cellulases
Antibiotiques	Bacitracines
Solvants	Butylène-glycol, glycérol
Polypeptides	D-glutamylpolypeptides

À l'heure actuelle, *B. licheniformis* est principalement utilisée pour la production de protéases alcalines. Ces derniers sont des protéases de type sérine [185-187].

II.1.3. Croissance et métabolisme

Bacillus licheniformis tire son énergie de molécules organiques et utilise préférentiellement les glucides comme source d'énergie et de carbone. Durant la croissance, *B. licheniformis* catabolise les glucides présents dans la cellule en l'un des intermédiaires des principales voies de dégradation des glucides, soit la voie d'Embden-Meyerhof (glycolyse) et la voie des pentoses-phosphates [188]. Comme plusieurs de ces intermédiaires sont des acides organiques, leur accumulation peut contribuer à la diminution du pH du milieu de culture durant la croissance. *B. licheniformis* assimile préférentiellement l'azote sous forme de NH_4^+ , mais il peut utiliser une grande variété de composés comme source d'azote. *B. licheniformis* croît de façon optimale en milieu aérobie, mais peut croître en anaérobiose, grâce à sa capacité de fermenter les sucres ou, en dernier recours, en effectuant la respiration anaérobie avec le nitrate comme accepteur final d'électron [189]. *B. licheniformis* peut croître sur une grande plage de températures, de 20 °C jusqu'à 60 °C. Par contre, les températures optimales pour la production de protéases alcalines varient de 35 °C à 60 °C, selon les souches [99]. Le pH optimal de croissance varie entre 7,0 et 7,5.

Les fermentations ont le plus souvent courtes en mode discontinu (« batch culture ») dans lequel le milieu de culture n'est pas régénéré [183, 190]. Les procédés en continu ou en semicontinu ne sont pas couramment utilisés en industrie pour la production de protéases, même si certains procédés expérimentaux s'avèrent efficaces [99, 155, 191, 192]. En mode discontinu, *B. licheniformis* croît selon un modèle représenté graphiquement par une courbe ayant six phases bien distinctes [193].

II.2. Protéases de *B. licheniformis*

Les protéases alcalines sont définies comme étant des enzymes qui sont hautement actives dans une gamme de pH de neutre à alcalin [194]. En effet, elles fonctionnent le mieux à un pH de 8 à 11, leur température optimale est d'environ 60 °C, et elles ont une large spécificité de substrat [195].

Selon Eveleigh [196], la majorité des protéases industrielles, surtout celles utilisées dans l'industrie de la détergence, sont produites par *B. licheniformis*. On peut citer l'Alcalase, le Biofeedpro ou le Novozym 243 de Novo.

Les souches de *B. licheniformis* sont mentionnées dans la troisième édition de *Food Chemicals Codex* comme sources de carbohydrases et de préparations enzymatiques de protéases utilisées dans différents processus alimentaires [197].

L'Alcalase de Novo, dont le principal composant est la subtilisine A de Carlsberg est produite par une souche de *B. licheniformis* DSM641. La température optimale de l'activité enzymatique est de 60 °C avec un pH optimal d'action entre 7,5 et 8,5 sur l'hémoglobine modifiée comme substrat. L'enzyme est stable après incubation 1 h à 50 °C jusqu'à 60 °C elle garde environ 45 % de son activité initiale. L'activité enzymatique devient quasiment nulle après incubation à 70 °C. En fait, la subtilisine Carlsberg est une endoprotéase alcaline qui représente l'une des enzymes industrielles les plus importantes surtout en détergence. Il s'agit d'une protéase à sérine, sans spécificité particulière.

Vitkovic et Sadoff [198] ont purifié trois protéases à sérine d'une souche de *B. licheniformis*. Ces protéases possèdent une même masse moléculaire de l'ordre de 28 kDa, mais qui diffèrent par leur charge à pH 6. Elles sont sécrétées sous forme de

complexes protéase-Bacitracine qui sont stables au cours de la purification, mais une préextraction avec le chloroforme suivie d'une filtration sur G-25 permet la séparation de l'enzyme de l'antibiotique. Les trois protéases sont ensuite séparées par une chromatographie sur carboxyméthyl cellulose. Il s'agit de trois protéases à sérine.

Hubner et *al.* [199] ont montré que la production de la subtilisine Carlsberg par *B. licheniformis* est nettement améliorée lorsque la souche est cultivée sur un milieu contenant de l'amidon, du glucose ou de la caséine comme source de carbone et dans des conditions de fermentation bien contrôlées.

En 1996, Ferrero et *al.* [200] ont isolé une souche de *B. licheniformis* MIR 29 productrice de protéases alcalines thermostables. Cette souche est capable de croître à des températures allant jusqu'à 60 °C et à des pH allant jusqu'à 9. La caséine est la meilleure source de carbone inductrice de la production de protéases, alors que le nitrate est la meilleure source d'azote. Le pH et la température optimale de l'activité enzymatique sont de 12 et 60 °C, respectivement. La préparation enzymatique est stable après pré-incubation pendant 10 min à des températures allant de 30 à 60 °C. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant 1 % de gélatine a révélé la présence de deux bandes montrant des activités protéasiques et dont les masses moléculaires sont comprises entre 25 et 40 kDa. Ces protéases sont inhibées par le PMSF, il s'agit de deux protéases à sérine.

En 1998, Manachini et Fortina [201] ont isolé, à partir de sédiments marins, une souche halotolérante de *B. licheniformis* productrice de protéases alcalines. La purification partielle de la préparation protéolytique, par chromatographie échangeuse d'ions DEAE-Sephadex A-50 suivie d'une dialyse par ultrafiltration et filtration sur Sephadex G-50, a mis en évidence la présence de trois protéases de masses moléculaires de l'ordre de 15, 22,5 et 33 kDa. Ces protéases présentent une activité optimale à pH 9 et à 70 °C. Elles sont activées par le NaCl (l'augmentation de l'activité est de 2 à 3 fois en présence de 1-1,5 M de NaCl) et elles ne sont pas affectées par les ions métalliques tels que le CaCl₂, le MgCl₂ et le FeSO₄.

En 1999, Mabrouk et *al.* [202] ont étudié l'optimisation des conditions de culture pour la production de protéases par la souche *B. licheniformis* ATCC 21415. Ils ont montré que la meilleure production de protéases est obtenue en utilisant un mélange de lactose (4 %) et de glucose (1,5 %) comme sources de carbone et un

mélange d'extraits de soja (6 %) et de phosphate d'ammonium (1,2 %) comme sources d'azote.

II.2.1. Facteurs biotiques influençant la production de protéases

Comme vu précédemment, la production de protéases par la cellule bactérienne peut être stimulée ou réprimée par certaines molécules. En fait, un substrat qui permet une bonne croissance végétative ne mène pas forcément à la production de grandes quantités de protéases. La production de ces protéases est grandement affectée par l'environnement extérieur de la cellule, dont la nature et la concentration des sources de carbone et d'azote. Il est donc nécessaire de connaître l'effet de ces facteurs sur la production de protéases alcalines afin de bien contrôler les procédés de production et de les rendre plus performants.

II.2.1.1. Influence de la source de carbone

Les milieux servant à la production de protéases en industrie sont généralement complexes et contiennent des concentrations élevées de sources de carbone et d'azote [203]. Le choix de la source de carbone a une grande importance car il influence les performances du procédé. Une grande variété de substrats peut être utilisée, dont de nombreux glucides. L'emploi du glucose a été largement étudié. Il a été établi que le glucose inhibe la production de protéases par un mécanisme de répression catabolique [155, 191, 200, 203-205]. En effet, lors d'une fermentation employant le glucose comme source de carbone, la production de protéases commence au moment où le glucose est épuisé dans le milieu [200, 203]. Ensuite, si du glucose est ajouté au milieu, la production de protéases cesse immédiatement [206]. D'autres sucres simples peuvent aussi être utilisés et leurs effets sur la production de protéases sont variables. Par exemple, dans un milieu à base de soja, l'emploi de lactose ou de fructose à de faibles concentrations (3 à 4 %) permet une meilleure production de protéases que le même milieu comprenant une quantité équivalente de glucose. Par contre, une diminution dans la production de protéases est observée lorsque tous ces sucres sont présents en grandes concentrations [202]. D'ailleurs, dans les pratiques commerciales de production de protéases avec *Bacillus* sp., il est reconnu que de concentrations élevées de sucre dans les milieux de culture inhibent la production de protéases [203]. Comme la concentration des substrats carbonés influe sur les performances des procédés, cela tend à démontrer l'influence du rapport C/N sur la production de protéases [155]. En revanche, le

sucrose, le maltose et le xylose donnent des rendements très faibles à nuls [200, 202].

En contradiction avec tous ces résultats, Fujiwara *et al.* [159, 202, 205] et Mabrouk *et al.* [159, 202, 205], ainsi que Sinha *et al.* [159, 202, 205] ont observé que le lactose et le fructose étaient moins efficaces que le glucose pour la production de protéases.

Également, des substrats plus complexes peuvent être employés. C'est le cas notamment de l'amidon. En effet, un milieu soja employant l'amidon comme source de carbone permet une meilleure production de protéases que le fructose et le lactose. L'amidon peut aussi être remplacé par le son de blé et les résultats demeurent très intéressants [205]. Puri *et al.* [204] ont montré que l'amidon permet une production supérieure à la pectine, au son de blé et au glucose. Par contre, dans les essais menés par Mabrouk *et al.* [202] sur un milieu différent à base de soja, l'amidon donne des résultats inférieurs que lorsqu'il est remplacé par le glucose. La mélasse et la farine de maïs sont d'autres sources de carbone qui donnent aussi de faibles productions. Tant, d'autres sources de carbone de nature protéique peuvent être employées. Ainsi, la caséine permet une bonne production de protéases. Ferrero *et al.* [200] ont observé une augmentation de la production de protéases alcalines en remplaçant dans leur milieu le glucose par la caséine. Le petit lait est aussi une source de carbone alternatif pour la production de protéases alcalines [203].

II.2.1.2. Influence de la source d'azote

Bacillus licheniformis peut métaboliser l'azote sous forme organique et inorganique pour produire les acides aminés, les acides nucléiques, les protéines, dont les protéases, et les composantes de parois cellulaires nécessaires à sa survie. La production de protéases est donc dépendante de la biodisponibilité des sources d'azote appropriées [203]. Certains auteurs mentionnent que la présence d'azote inorganique est nécessaire pour la production de protéases. Ainsi, dans un milieu à base de caséine, l'ajout d'ion ammonium ou de nitrate en faibles concentrations stimule la production. Par contre, l'ajout d'ion ammonium en grande quantité a un effet répresser [192, 200]. Le même phénomène a été constaté par Mabrouk *et al.* [202] dans un milieu à base de soja et supplémenté de faibles concentrations de

phosphate d'ammonium. Généralement, de faibles productions de protéases sont obtenues avec l'emploi d'azote inorganique comme seule source d'azote. La synthèse d'enzymes est inhibée par la présence de sources d'azote inorganiques rapidement métabolisables comme les acides aminés et l'ion ammonium [192, 203]. Le même phénomène est observé chez *B. subtilis* auquel *B. licheniformis* s'apparente étroitement [207]. Par contre, quelques rapports indiquent l'absence de répression associée à l'usage de sels d'ammonium [203, 205]. Avec l'utilisation de sources d'azote organiques, la production de protéases est généralement plus élevée. Par exemple, le soja est une excellente source d'azote qui permet d'obtenir une production plus élevée de protéases [202, 203, 205]. Des substrats comme les peptones, l'extrait de boeuf, les liqueurs de maïs et le son de blé peuvent aussi être utilisés, mais la production n'est pas aussi élevée que celle observée avec du soja [202, 204, 205].

II.2.1.3. Influence des éléments traces

Certains ions comme le calcium, le cobalt, le cuivre, le bore, le magnésium, le manganèse et le molybdène peuvent avoir un effet bénéfique sur la croissance de *B. licheniformis* et la production de protéases. Certains éléments comme le calcium contribuent à la stabilité des protéases [203]. Le phosphate de potassium est utilisé comme source de phosphore dans la majorité des études et peut avoir un effet tampon sur le milieu de culture. De faibles concentrations (2 g/L) seraient optimales pour la production de protéases. En revanche, de plus grandes concentrations ont un effet inhibiteur sur la croissance et la production de protéases [203, 207].

II.2.2. Facteurs abiotiques influençant la production de protéases

II.2.2.1. pH et température

Le pH est un facteur important qui influence la croissance des microorganismes [193]. Le pH a également une forte influence sur la production de protéases. Calik *et al.* [208] ont démontré que le pH affecte les mécanismes de régulation métabolique de la production de protéases chez *B. licheniformis*. Également, Kembhawi *et al.* [207, 209] et Hameed *et al.* [207, 209] ont démontré que la production de protéases par *B. subtilis* est maximale lorsque le pH est contrôlé durant la culture microbienne. Des résultats semblables ont été observés dans plusieurs autres études [99, 203]. De plus, des variations importantes de pH au cours de la fermentation peuvent mener à la désactivation des protéases excrétées dans le

milieu [203]. Il est donc nécessaire de maintenir en tout temps le pH à un niveau optimal lors de la fermentation afin d'obtenir de bons rendements de production de protéases.

La température est encore un autre paramètre critique qui doit être contrôlé et varié entre l'organisme. Le mécanisme de la commande de température de la production d'enzymes n'est pas bien compris [210]. Cependant, les études par Frankena et al. [211] ont prouvé qu'un lien existait entre la synthèse d'enzymes et le métabolisme énergétique dans le genre *Bacillus*, qui a été contrôlé par la température et l'absorption d'oxygène.

II.2.2.2. Agitation et aération

L'agitation assure un environnement nutritionnel et physique homogène pour toutes les cellules. Un tel environnement est indispensable pour une production maximale de protéases [187]. L'agitation et l'aération contrôlées et optimales sont nécessaires afin d'assurer un transfert d'oxygène adéquat lors des fermentations. En effet, le transfert d'oxygène dans le milieu de culture est un des facteurs influençant de façon majeure la production de protéases [185, 187, 209, 212]. Calik et al. [187] ont démontré que la mise au point d'une bonne stratégie de transfert d'oxygène par l'optimisation des paramètres d'agitation et d'aération permet d'augmenter de façon importante la quantité de protéases produites par *B. licheniformis* en milieu synthétique.

L'optimisation des paramètres d'agitation et d'aération a également permis d'obtenir une production de protéases supérieure chez *B. subtilis* [207, 209]. Également, l'agitation et l'aération peuvent avoir un effet néfaste si elles sont maintenues à des niveaux trop élevées. En effet, il a été noté lors de plusieurs études que le maintien d'une agitation et d'une aération trop élevée augmente les forces de cisaillement dans le milieu de culture, ce qui peut mener à la dénaturation des protéases excrétées à l'extérieur de la cellule bactérienne [187, 209].

Chapitre III

MATERIEL ET METHODES

Notre travail de recherche a été réalisé entre janvier 2015 et juin 2018 au niveau du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSNBioM), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Blida 1 en collaboration avec le Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie.

Le travail a été divisi sur trois parties successives, à savoir :

➤ Criblage et identification d'une souche bactérienne codée K7A thermophile isolée à partir d'un sol sableux du champ de Hassi Messaoud, productrice d'une protéase alcaline.

➤ Optimisation des conditions de culture pour la production d'une protéase thermostable par la souche K7A.

➤ Purification, caractérisation biochimique et moléculaire de la protéase alcaline produite par la souche K7A et application biotechnologique dans la détergence et la synthèse peptidique.

III.1. MATERIEL

III.1.1. Matériel biologique

III.1.1.1. Souche K7A

La souche bactérienne sujet du présent travail a été nouvellement isolée à partir d'un sol sableux contaminé par des rejets de forage au niveau des puits du champ de Hassi-Messaoud, w d'Ouargla sud d'Algérie. Le choix de ce biotope (figure III.1) est justifié par sa contamination en pétrole brut afin d'isoler des microorganismes adaptés à la production des protéases alcalines au cours d'un travail antérieure réalisée au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de BioMolécules (LCSNBioM) au l'Université de Blida 1. C'est une souche a été thermophile. L'isolement a été réalisé par Dr. Edouaouda Kamel (Juin 2012).



Figure III.1 : Photos de sols contaminés par les fluides de forage (Hassi-Messaoud).

III.1.1.2. Souche d'*Escherichia coli*

La souche d'*Escherichia coli* (BL21) est utilisée lors des clonages, dont le génotype est le suivant :

- **BL21** : *E. coli* BF⁻dcm ompT hsdS (r m) gal λ(DE3). Elle est utilisée comme hôte pour la surexpression de l'activité protéasique puisqu'elle porte une copie chromosomique du gène d'une ARN polymérase bactérienne.

III.1.1.3. Conservation des souches

Pour la conservation, les souches sont mises en culture dans un milieu liquide approprié, additionné ou pas d'antibiotique. La suspension cellulaire est mélangée avec du glycérol stérile à une concentration finale de 20 %. Elle est répartie dans des cryotubes puis conservée à -80 °C.

III.1.2. Produits chimiques et réactifs utilisés

Les produits utilisés pour la préparation des solutions et des tampons lors de la réalisation de ce travail sont fournis par Sigma, Fluka, Prolabo, Bio-Rad, Amersham et Pharmacia.

III.1.2.1. Milieux de culture

Les milieux de culture de notre travail sont :

➡ Milieu LB liquide

Le milieu Luria Bertani (LB) est utilisé pour la préculture des souches bactériennes. Il est composé (g/L) de 10 g peptone; 5 g NaCl ; 5 g extrait de levure avant la stérilisation.

➡ Milieu LB solide

Il est obtenu après l'addition de 15 g/L d'agar au milieu LB liquide. Il est

souvent utilisé pour la conservation à court terme des souches bactériennes.

➤ Gélose nutritive au lait (GNL)

C'est un milieu solide utilisé pour mettre en évidence le pouvoir protéolytique des souches bactériennes en hydrolysant la caséine du lait introduite dans le milieu. Sa composition (g/L): 5 g peptone; 3 g extrait de levure et 15 g d'agar dans 750 mL d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7 avec NaOH. Après stérilisation et refroidissement jusqu'à une température de 60 °C, 250 mL du lait écrémé sont ajoutés. Après homogénéisation du milieu, il est coulé dans des boîtes de Pétri.

La technique de diffusion dans l'agar est mise en œuvre pour la détection de l'activité protéolytique. En effet, c'est un test qualitatif qui repose sur le fait que les protéases sécrétées par les souches protéolytiques vont diffuser dans le milieu gélosé environnant et vont ainsi hydrolyser les protéines du lait. L'action protéolytique des enzymes se traduit par l'apparition des halos transparents autour des colonies qui produisent des protéases.

➤ Milieu de production de protéase

Les protéases alcalines sont produites sur milieu liquide dont la composition est la suivante (g/L): 10 g Caséine ; 5 g NH_4NO_3 ; 2 g CaCl_2 ; 1 g K_2HPO_4 ; 1 g KH_2PO_4 ; 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans un litre d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 10 avec NaOH (0.1 N) avant la stérilisation.

Ce même milieu est amélioré pour la production des protéases en ajoutant 2 % (v/v) d'oligoéléments (0.4 g ZnCl_2 ; 2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.065 g H_3BO_3 ; 0.135 g $\text{MoNa}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ qui sont solubilisés dans l'eau qsp 1 L) [213].

III.1.2.2. Enzymes

a) Enzymes de restriction

Elles sont utilisées selon les instructions du fournisseur.

b) ARNase pancréatique (ARNase)

Elle est solubilisée dans l'eau distillée à une concentration de 10 mg/mL puis traitée thermiquement pendant 15 min à 100 °C. La solution refroidie est répartie en aliquotes et conservée à -20 °C.

c) Protéinase K

La protéinase K est dissoute dans l'eau distillée stérile à raison de 5 mg/mL puis elle est répartie en aliquotes 1mL et gardé à -20 °C.

III.1.2.3. Marqueurs de taille et de masse moléculaire

Les marqueurs de taille pour ADN utilisés sont préparés par une simple digestion de l'ADN du phage Lambda (λ) par les enzymes de restriction *HincIII* ou *HincII*. On a utilisé également le marqueur de taille 1 kbp DNA Ladder.

III.1.2.4. Vecteurs

a) Vecteurs de clonage

- pCR-Blunt (3512 pb) : Ce plasmide porte le gène *lacZ α* codant pour la β -galactosidase, permettant l' α -complémentation et donc la sélection des clones par criblage bleu/blanc. Il est également porteur des gènes de résistance à la kanamycine et à la zéocine, deux marqueurs de sélection, permettant ainsi une sélection positive des plasmides recombinants. Le gène létal *ccdB* (« control of cell death ») est incorporé dans le site multiple de clonage ou (« polylinker ») du vecteur et est fusionné au fragment *lacZ α* . Comme l'expression de la protéine CcdB est toxique, le vecteur pCR-Blunt empêche la croissance des bactéries à moins que l'expression de la protéine de fusion LacZ α -CcdB ne soit interrompue du fait de l'insertion d'une séquence d'ADN en son sein.
- pCR 2.1 (3.9 kpb) : Ce vecteur porte, également, un gène *lacZ* et deux gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. Il contient une désoxy-Thymidine (dTTP) à chaque extrémité 3' et permet ainsi le clonage des fragments amplifiés par l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (*Taq*®) qui génère des produits PCR portant une seule désoxy-Adénine (dATP) à chaque extrémité 3'. Les fragments générés par l'ADN polymérase de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*, Appligene) peuvent également être clonés dans ce vecteur après ajout par PCR de dATP. Enfin, il permet l'utilisation des amorces universelles et inverses M13 ainsi que les amorces T3 et T7 s'hybridant de part et d'autre du site de clonage, permettant le séquençage de la séquence insérée.
- pGEM-T Easy (3015 pb) : Ce vecteur porte un gène de résistance à l'ampicilline en plus du gène *lacZ*. Il diffère du vecteur pCR 2.1 par la présence d'une dTTP à chaque extrémité 3' lui permettant le clonage des fragments PCR ayant un dATP à l'extrémité 3'. Ceci lui permet l'utilisation des amorces universelles

et inverses M13 ainsi que les amorces SP6 et T7 s'hybridant de part et d'autre du site de clonage ce qui permet le séquençage de la séquence insérée

b) Vecteurs d'expressions

- pHL (4522 pb) : C'est un plasmide qui porte le gène *sapHM* codant pour la protéase SAPHM étudiée au cours de ce travail. Ce plasmide a été utilisé pour transformer la souche d'*E. coli* citée au dessus.

- pDEST 14 (6422 pb) : C'est un vecteur d'entrée qui est un plasmide contenant le gène et les sites de recombinaison attR du clonage gateway, il contient aussi le promoteur T7 et l'origine de replication du plasmide pBR322 pour aider à réduire les niveaux d'expression de base dans la souche d'*E. coli* BL21 (Figure IV.1). Ce vecteur à été créé pour le clonage rapide de type gateway à l'aide du phage lambda recombinaison site-spécifique.

- pUT57 (2900 pb) : C'est un vecteur ayant un nombre de copie élevé, portant le gène de résistance à l'ampicilline, seul marqueur de sélection et un **site multiple de clonage**. C'est un plasmide dérivé du plasmide pUC19 il contient une partie du plasmide pBR322 et du bactériophage M13mp 19, il est à nombre de copies élevé et il porte aussi le gène *lacZ*. L'expression dans ce vecteur est sous le contrôle d'un promoteur assez fort (promoteur Lac) et elle est inducible par l'IPTG grâce à la présence du gène *lacZ*.

- pTrc99A (4176 pb) : C'est un vecteur de surexpression renfermant une résistance à l'ampicilline. L'expression dans ce vecteur est sous le contrôle d'un promoteur fort (promoteur Taq ou Trc) et elle est inducible par l'IPTG grâce à la présence du gène *lac* / [214-216].

III.1.2.5. Les plasmides

Les plasmides générés au cours de ce travail sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau III.1 : Plasmides générés (nommés pHL)

Insert	Vecteurs de clonage			Vecteurs d'expression	
	pCR Blunt	pCR 2.1	pGME-T Easy	pUT-57	pTrc99A
Gène de l'ARNr 16S			pHL-16S		
Gène <i>sapHM</i> (sauvage)	pHLT0				
Gène <i>sapHM</i> (recombinant)				pHLT1	

III.1.2.6. Oligonucléotides

Les oligonucléotides sont utilisés dans cette étude sont représentés dans le tableau III.2. Ces amorces sont utilisées pour l'identification de la souche retenue, les amplifications d'ADN génomique (ADNg) et d'ADN plasmidique (ADNp) ainsi que pour le séquençage d'ADN.

Les séquences des différents oligonucléotides utilisés dans cette étude : Pour les amplifications du gène de l'ARNr 16S (externes : Oligo D-S73 et Oligo R-S74 et internes : Oligo D-S156 et Oligo R-S157) et du gène *sapHM* sauvage (Oligos F-TBA, R-TBA, TBAe1, TBAe2, TBAi1 et TBAi2).

Tableau III.2. Les séquences des différents oligonucléotides utilisés

Oligonucléotide	Séquences d'oligonucléotide	Taille (pb)	T (°C)
Oligo D-S73	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ^{3'}	20	48
Oligo R-S74	5'AAGGAGGTGATCCAAGCC ^{3'}	18	51
Oligo D-S156	5'ATTCCACGTGTAGCGGTG ^{3'}	18	52
Oligo R-S157	5'ATCTCACGACACGAGCTG ^{3'}	18	52
Oligo F-TBA	5'GAAAAAGGGATGTGGAATGTGCG ^{3'}	19	52
Oligo R-TBA	5'CAAGCGGCTTCTAACTAATCC ^{3'}	20	56
Oligo TB Ae1	5'GAAAAAGGGATGTGGAATG ^{3'}	19	54
Oligo TB Ae2	5'GTCACACTTATTTTAGTTAG ^{3'}	20	52
Oligo TB Ai1	5'CATGACCCTAGCATTGCTTA ^{3'}	20	58
Oligo TB Ai2	5'TAGAATGAGTCACCAAGCGGT ^{3'}	21	56

III.1.3. Solutions et tampons

III.1.3.1. Solutions

Les solutions utilisées au cours de ce travail sont :

- Solution I : 45 mL glucose 20 %, 25 mL Tris-HCl 1 M et 20 mL EDTA 0,5 M à pH 8,0 ;
- Solution II : NaOH 0,2 N et 1 % SDS (p/v) ;
- Solution III : d'acétate de potassium 3 M et d'acide acétique glacial 2 M à pH 4,8 ;
- Solution d'acide trichloracétique TCA (20 %) ;
- Réactif de Biorad pour le dosage des protéines solubles ;
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) à 10 % ;

- Solution d'acrylamide (29,2 %)/ bisacrylamide (0,8 %) ;
- Solution de coloration du gel, de bleu de Coomassie : 0,25 g bleu de Coomassie, 45 % éthanol, 45 % eau et 10 % acide acétique glacial ;
- Solution de décoloration : éthanol 20 %, eau 70 % et acide acétique 10 %.

III.1.3.2. Tampons

- Tampon A : tampon Tris-HCl 100 mM, additionné avec 5 mM CaCl_2 à pH 7,4.
- Tampon B : tampon 20 mM HEPES contenant 2 mM CaCl_2 à pH 7.
- Tampon C : tampon Tris-HCl 100 mM (7,5) contenant 2 mM.
- Tampon glycine 100 mM ;
- Tampon I: 50 mM glucose anhydre, 25 mM Tris-base et 10 mM EDTA à pH 8,0 ;
- Tampon II: 10 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA et 1 % du dodécyl sulfate de sodium (SDS) à pH 8,0 ;
- TE 1 : 100 mM Tris-base et 10 mM EDTA à pH 8,0 ;
- TAE 1 : 40 mM Tris-acétate et 5 mM EDTA ;
- TBE 1 : 90 mM Tris-borate et 20 mM EDTA ;
- Tampon CaCl_2 -MOPS-glucose : 100 mM CaCl_2 ; 10 mM MOPS et 0,5 % glucose ;
- Tampon acétate 100 mM ;
- Tampon Tris HCl 100 mM ;
- Tampon de dépôt : Tris-HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 1mM ; SDS 2,5 % ; β -mercaptoéthanol 5 % ; Glycérol 10 % et Bleu de bromophénol 0,05 % ;
- Tampon de migration : Tris-HCl 25 mM ; Glycine 14,4 g/l et SDS 1 % ;
- Tampon CaCl_2 -MOPS-glucose : 100 mM CaCl_2 , 10 mM MOPS et 0,5 % glucose.

III.2. Méthodes

III.2.1. Criblage des souches à fort potentiel d'activité protéase

En effet, à partir de 100 souches testées sur gélose nutritif au lait (test semi-qualitatif), 20 souches ont été retenues du fait qu'elles présentent un rapport du diamètre de l'halo sur le diamètre de la colonie (constitue un premier critère de sélection). Ces 20 souches ont été sujettes à une étude de production sur milieu

liquide pour une étude quantitative. Cette dernière a conduit à la sélection de 2 souches intéressantes qu'elles présentent un niveau de production supérieur (constitue un deuxième critère de sélection).

III.2.2. Purification et conservation des souches

Les colonies sélectionnées sont purifiées par stries sur milieu GNL. Ces dernières sont incubées pendant 24 h puis conservées à +4 °C. Les souches les plus actives sont aussi conservées à long terme dans des cryotubes contenant le glycérol à 20 % puis conservées à -20 °C.

III.2.3. Identification phénotypique de la souche sélectionnée

L'identification de la souche a été accomplie par des études morphologiques et physiologiques basées sur des observations microscopiques et des tests biochimiques [219-221], et par l'analyse moléculaire du gène de l'ARNr 16S.

III.2.3.1. Etude morphologique et observation microscopique

a) Observation microscopique

L'observation microscopique à l'état frais d'une goutte de culture permet de déterminer la morphologie et la mobilité de la bactérie.

b) Coloration de Gram

Une suspension bactérienne est étalée sur une lame en verre propre, puis séchée et fixée à la flamme. La lame est recouverte pendant une minute du réactif N°1 (2 % cristal violet, 20 % alcool éthylique et 0,8 % oxalate d'ammonium) puis lavée doucement à l'eau. La lame est ensuite recouverte par du réactif N°2 (1,3 % iode, 2 % iodure de potassium et 10 % polyvinyl pyrrolidone) pendant une minute et de même lavée doucement à l'eau. On ajoute par la suite du réactif N°3 (50 % alcool absolue et 50 % acétone) pour la décoloration. En recouvre enfin la lame par le réactif N°4 (0,25 % safarine et 10 % alcool) pendant une minute et on réalise un lavage doux avant séchage de la lame, puis on observe au microscope (Objectif 100 × à l'huile d'immersion).

III.2.3.2. Etudes physiologiques

a) Test de l'oxydase

Ce test est essentiel pour orienter l'identification des bacilles et coques Gram négatifs. Une parcelle de culture est déposée sur un disque de papier filtre (disque oxydase) imprégné de ce réactif. Une coloration rose se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive.

b) Test de la catalase

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram positifs. La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée (H_2O_2) qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air, des hydrogènes transportés par la voie oxydative directe. Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche de H_2O_2 à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de H_2O_2 sous l'action de la catalase.

c) Test de l'indole

Une portion de culture est déposée sur un disque de papier imbibé de réactif d'indole à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. La réaction est positive lorsqu'une coloration marron apparaît.

III.2.3.3. Etudes moléculaires

a) Identification en utilisant la galerie API 50 CH

La galerie API 50 CH (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) permet d'étudier le métabolisme de 49 substrats de carbohydrates et ses dérivés de la bactérie. La lecture s'effectue après incubation à 45 °C pendant 20 h puis 48 h. Le logiciel APILAB (bioMérieux) permet ensuite d'obtenir, à un pourcentage admis, l'identité de la bactérie recherchée par comparaison à des profils types.

b) Identification génotypique par la technique ARN 16S

La plupart des techniques d'identification génotypique sont décrites dans le livre de « Molecular Cloning » [221]. L'étude moléculaire a été achevée suite à l'amplification par PCR du gène d'ARNr 16S en utilisant l'ADNg de la souche sélectionnée et des amorces nucléotidiques : Oligo DS-73 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG³) et Oligo RS-74 (5'AAGGAGGTGATCCAAGCC³)

dont les séquences appartiennent aux régions conservées flanquant ce gène, respectivement de 8 à 27 et de 1541 à 1525 de l'opéron d'ARNr chez *E. coli* (appendice 1). Les fragments PCR de tailles attendues sont purifiés puis clonés et leurs séquences nucléotidiques sont déterminées.

III.2.4. Cinétique de croissance

Les pré-cultures sont effectuées sur milieu LB dans des Erlenmeyers de 250 mL avec un volume utile de 50 mL. L'incubation se fait pendant 24 h aux températures correspondantes et sous une agitation de 200 rpm.

Les cultures de cinétiques sont inoculés par 1 mL de la pré-culture à 3 unités DO₆₀₀. L'incubation se fait pendant 72 h à la température adéquate et sous agitation de 200 rpm. Des prélèvements réguliers de 2 mL sont effectués.

Les activités protéolytiques et la croissance bactérienne (DO₆₀₀) sont évaluées en fonction du temps afin de déterminer le temps de la production maximale de protéase.

III.2.5. Dosage de l'activité enzymatique

Il existe plusieurs techniques permettant d'analyser la réaction d'hydrolyse d'un substrat protéique par les protéases :

III.2.5.1. L'activité caséinolytique

La plus connue est l'hydrolyse enzymatique de la caséine permettant la libération d'acides aminés aromatiques détectés sous UV à 280 nm. L'activité est évaluée comme étant la quantité d'équivalent Tyrosine libérée par unité de temps. L'activité protéolytique a été mesurée dans le surnageant de la culture obtenu après centrifugation pendant 15 minutes à 12000 rpm, en déterminant la concentration des peptides solubles dans l'acide trichloro-acétique (TCA) à la concentration finale de 6,6 %. L'activité protéolytique est estimée selon la méthode de Zaraï Jaouadi *et al.* [222].

III.2.5.2. Méthode de Kembhavi

Elle est évaluée selon le protocole suivant Kembhavi, et al. [207]:

- Mélanger 0,5 mL d'une solution de caséine (1 % p/v) dans un tampon désiré en présence de 2 mM CaCl₂ (tampon A) avec 0,5 mL de la solution enzymatique

préalablement diluée.

- Incuber la réaction enzymatique, à une température appropriée pendant 15 min.
- Arrêter la réaction par addition de 0,5 mL de TCA à 20 % (p/v) (le TCA précipite la caséine non hydrolysée).
- Incuber à température ambiante pendant 15 min.
- Centrifuger le milieu réactionnel à 15000 rpm pendant 15 min.
- Mesurer l'absorbance à 280 nm (correspond au maximum d'absorbance des Aa).

Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/mL/min dans ces conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage (appendice 2), de 0 à 100 µg/mL, de tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions à partir de laquelle nous avons déduit que 1 µg/mL de tyrosine correspond à une DO_{280 nm} de 0,0055. L'activité protéasique (U/mL) est déduite à partir de l'équation ci-dessous:

$$\text{Activité (UI)} = \frac{\text{DO} \times d \times D}{T \times 0,0055}$$

Avec :

D : dilution de l'enzyme ;

d : dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel ;

III.2.5.3. Dosage de l'activité protéase sur peptide synthétique

L'activité protéolytique sur peptide synthétique (ex : *N*-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-*p*-nitroanilide ou AAPF) est mesurée en déterminant la concentration des acides aminés solubles dans l'acide trichloroacétique (TCA) à la concentration finale de 6,6% suite à la réaction avec le groupement *p*-nitroanilide (*p*-NA) [223].

L'activité protéolytique est estimée selon le protocole suivant :

- Préparer extemporanément une solution stock de AAPF à 25 mM dans le DMSO à 5 % v/v et le Triton-X100 à 0,05 % v/v, afin d'éviter l'autolyse du

groupement *p*-NA au cours du stockage. La concentration de *p*-NA a été déterminée en utilisant le coefficient de distinction molaire de $10500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 410 nm.

- Mélanger 600 μl d'une solution de AAPF (2 mM) dans un tampon Glycine-NAOH 100 mM à pH 10 contenant 2 mM Ca^{2+} avec 400 μl de la solution enzymatique préalablement diluée.
- Incuber 10 min à 70 °C.
- Arrêter la réaction par addition de 600 μl de TCA à 20 % (w/v) (le TCA précipite le peptide synthétique non hydrolysé).
- Incuber 15 min à température ambiante.
- Centrifuger le milieu réactionnel pendant 15 min à 13000 rpm.
- Mesurer l'absorbance à 410 nm.

Une unité (U) d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 mM de *p*-NA/mL/min dans ces conditions expérimentales.

III.2.6. Méthode de biologie moléculaire

La plupart de ces techniques que nous avons utilisé, sont décrites dans le manuel de « Molecular Cloning » [224].

III.2.6.1. Extraction de l'ADN chromosomique à partir de la souche K7A

Un clone isolé sur boîte est mis en culture pendant une nuit dans 500 mL de milieu approprié. Après cette incubation de 24 h, nous centrifugeons dans un tube NALGENE pendant 10 min à $8000 \times g$. Le culot cellulaire est lavé avec 10 mL de tampon I. Les cellules sont alors lysées dans 20 mL de tampon I contenant 5 mg/mL de lysozyme et sont incubées une heure à 45 °C. La solution est alors centrifugée une autre fois à $8000 \times g$ pendant 15 min à 4 °C et le culot cellulaire est resuspendu dans 30 mL de tampon. On ajoute au surnageant 30 mL de phénol/chloroforme (v/v) et après centrifugation pendant 20 min à $8000 \times g$ on ajoute 2,5 V d'éthanol absolu et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2.

On récupère à l'aide d'une pipette Pasteur effilée les filaments d'ADN apparus puis on remet en solution les filaments dans 2 mL de TE 1. On centrifuge ensuite la solution restante pendant 15 min à $10000 \times g$, le précipité récupéré est resuspendu dans 6 mL de TE 1 $\times$ contenant 10 mg/mL de RNase A et incubé à 45 °C pendant 1 à

2 h. Puis on ajoute de la protéinase K à une concentration finale de 5 mg/mL et on incube la solution à 50 °C pendant 2 à 3 h. Après une extraction avec un volume de phénol suivie d'une autre extraction par un volume égal de phénol/chloroforme puis une dernière extraction avec un volume de chloroforme, la solution est précipitée avec 2 volumes d'éthanol 100 % et 10 % de chlorure de sodium 5 M ou d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et laissée au moins 2 h à -20 °C ou gardée 15 min à -80 °C. La solution est alors centrifugée à $12000 \times g$ pendant 15 min et le précipité est lavé avec une solution d'éthanol 70 % et séché à température ambiante pendant 15 min. Enfin, le précipité est resuspendu dans 50 µl d'eau MilliQ ou de TE 1 et conservé à -20 °C.

III.2.6.2. Préparation de l'ADN plasmidique par la méthode de lyse alcaline

Cette méthode est dite modifiée de la lyse alcaline de Sambrook [225]. L'ADN chromosomique s'hydrolyse plus facilement en milieu alcalin que l'ADN plasmidique (super-enroulé). Après neutralisation par l'acétate de potassium, la masse d'ADN chromosomique se renature et s'agrège avec la précipitation des complexes protéines-SDS et des ARN de hautes masses moléculaires. Tandis que l'ADN plasmidique reste dans la fraction soluble.

Nous avons choisi cette méthode pour la préparation et la purification d'ADNp qui nous permet d'obtenir un ADN de meilleure qualité et en plus grande quantité, utilisé par exemple pour le séquençage ou pour un clonage.

Un clone isolé sur boîte est mis en culture pendant une nuit dans 3 mL de milieu LB contenant l'antibiotique choisi, le plus souvent 100 µg/mL d'ampicilline (dans le cas des vecteurs pCR-Blunt et pCR 2.1, nous avons utilisé 50 µg/mL de kanamycine). Après 24 h, nous centrifugeons dans un tube Eppendorf 1,5 mL de culture à $12000 \times g$ pendant 15 min. Les cellules sont resuspendues dans 100 µl de solution I, puis bien homogénéisées. Les cellules sont alors lysées pendant 15 min avec 200 µl d'une solution de NaOH 0,2 N contenant 1 % SDS (p/v) (Solution II). On ajoute immédiatement 150 µl d'acétate de potassium 3 M et d'acide acétique glacial 2 M à pH 4,8 (Solution III) et les cellules sont incubées 10 min dans un bain de glace. Le mélange est alors centrifugé à $12000 \times g$ pendant 10 min à 4 °C et on ajoute au surnageant obtenu 0,6 volume d'isopropanol. Le précipité se forme au bout de 10 min à température ambiante. Après une centrifugation à $12000 \times g$ pendant 10 min, le précipité est resuspendu dans 100 µl TE 1 contenant 10 mg/mL de RNase A et

incubé à 45 °C pendant 1 à 2 h. La protéinase K est alors ajoutée au mélange à une concentration finale de 5 mg/mL et incubée à 50 °C pendant 2 à 3 h et 30 min. Après une extraction au solvant organique (phénol/chloroforme), la solution est précipitée avec 2 volumes d'éthanol 100 % et 10 % de NaCl 5 M ou d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et laissée au moins 2 h à -20 °C ou gardée 15 min à -80 °C. La solution est alors centrifugée à 12000 × g pendant 15 min et le précipité est lavé avec une solution d'éthanol 70 % et séché à température ambiante pendant environ 15 min. Enfin, le précipité est resuspendu dans 50 µl d'eau MilliQ ou de TE 1× et conservé à -20 °C.

III.2.6.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique permet de séparer les fragments d'ADN selon leurs tailles. L'électrophorèse d'ADN est réalisée sur gels d'agarose à des concentrations variables. Nous avons le plus souvent utilisé des gels à 1 % d'agarose. L'agarose est fondu dans un tampon à pH 8,0 [TAE 1 ou TBE 1], auquel on ajoute du bromure d'éthidium (BET) à une concentration finale de 0,5 µg/mL. La migration se fait dans un champ électrique à voltage constant. Le BET est un agent intercalant de l'ADN qui fluoresce quand il est excité par des rayons UV à 254 ou 365 nm. Il permet donc de détecter au moyen d'un transilluminateur la présence d'ADN.

Afin de déterminer la taille de l'ADN, il est nécessaire de faire migrer en même temps que les échantillons un marqueur de taille (exemples : λ HindIII et λ HincII).

III.2.6.4. Quantification de l'ADN

Selon la pureté de l'échantillon, la quantité d'ADN peut être déterminée soit par spectrophotométrie, soit par estimation sur gel d'agarose coloré au BET.

a) Méthode spectrophotométrique

La lecture des densités optiques est effectuée à 280 nm et à 260 nm. Une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 µg/mL d'ADN double brin. La pureté de l'ADN est estimée par le rapport DO_{260}/DO_{280} . Ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2.

b) Méthode utilisant la fluorescence émise par le BET (méthode empirique)

L'intensité de la fluorescence émise par les molécules de BET intercalées au sein de l'ADN est proportionnelle à la masse totale de ce dernier. Ainsi, la quantité d'ADN présente dans l'échantillon est estimée par comparaison de la fluorescence

de l'échantillon et celle d'une gamme de concentration connue après électrophorèse sur gel d'agarose.

III.2.6.5. Restrictions enzymatiques

La digestion de l'ADN par une ou plusieurs endonucléases de restriction est menée en microtubes et se fait selon les instructions du fournisseur. Le mélange réactionnel contenant la solution d'ADN, le tampon adéquat et l'enzyme de restriction (généralement à raison de 2 à 5 U/ μ g d'ADN), est incubé à 30 ou 37 °C selon l'enzyme utilisée. La durée des réactions est variable et dépend par exemple de la quantité et de la qualité de l'ADN à digérer et de la quantité d'endonucléases de restriction en solution. La réaction est arrêtée par traitement thermique puis refroidie dans la glace. Les produits de digestion sont évalués par électrophorèse sur gel d'agarose (0.8 à 1 %).

III.2.6.6. Purification de fragments d'ADN par des kits

La purification de fragments d'ADN a été réalisée en utilisant le kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA) ». Ce kit permet la purification de fragment (ou produit) de PCR directement. La solution d'ADN à purifier est donc chargée dans une colonne de silice en présence de grandes quantités de sels. L'ADN est retenu et les contaminants sont élués directement. La colonne est ensuite lavée afin d'éliminer toutes impuretés et l'ADN pur est élué avec une solution de Tris-HCl 10 mM à pH 8,5 ou de l'eau MilliQ. Le volume élué est de 30 à 50 μ l.

III.2.6.7. Technique de PCR

La technique d'amplification PCR consiste à effectuer de multiples cycles de réplication in vitro de l'ADN en utilisant comme amorce des oligonucléotides de synthèse s'hybridant avec les séquences complémentaires bordant la séquence à amplifier. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de la matrice, une étape d'hybridation des oligonucléotides à la matrice et une étape de polymérisation. Nous avons adopté les conditions ci-dessous :

Tampon d'ADN polymérase Taq ou Pfu	5 µl
<i>MgCl₂</i> (25 Mm)	1 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Amorces directe (10 pmol)	5 µl
Amorce reverse (10 pmol)	5 µl
ADN (~300 ng)	1 µl
ADN polymérase Taq ou Pfu (2 U)	1 µl
DMSO 50% (facultatif)	5 µl
<i>H₂O</i> (ultrapure) q.s.p	50 µl

Dans nos conditions, une étape de dénaturation de la matrice pendant 5 min à 94 °C est suivie de 30 cycles de polymérisation dont chacun comprend :

- Une étape de dénaturation de la matrice (30 secondes à 94 °C).
- Une étape d'hybridation des nucléotides amorcés à la matrice (45 s à la température d'hybridation convenable comprise entre 45 et 65 °C).
- Une étape de polymérisation par une ADN polymérase (1 minute à 72 °C).
- Une étape de polymérisation supplémentaire de 10 min à 72 °C est généralement réalisée afin que la *Taq* polymérase puisse additionner un dATP à l'extrémité 3' du fragment amplifié ce qui permet le clonage dans des vecteurs adéquats (pCR 2.1 et pGEM-T Easy).

Lorsque l'amplification est réalisée par la *Pfu* polymérase, incapable d'ajouter des dATP à l'extrémité 3', cette étape supplémentaire est réalisée après purification de l'ADN moyennant la *Taq* polymérase en présence de dATP.

III.2.6.8. Séquençage d'ADN

Pour déterminer les séquences d'ADN, nous avons utilisé le séquenceur automatique « Automated 3100 Genetic Analyser » (Applied Biosystems) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS, Tunisie). Ces séquences ont été faites dans des plaques PCR de 96 puits en utilisant le kit de séquençage (« BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit »). Le volume de réaction est de 10 µl contenant : 2 µl de produit PCR ; 1,5 µl de tampon (ABI 5×) ; 1µl d'un mélange d'enzyme/dNTP/ddNTP marqués (Rmix 2,5×) ; 0,25 µl de différentes amorces à (200 ng/µl = 30 µM) et on complète avec de l'eau ultra pure à 10 µl. Le programme de la réaction comporte 35 cycles : 30 s de dénaturation à 94 °C, 60 s d'hybridation à 55 °C et 150 s d'élongation à 72 °C. Les produits de séquences sont alors purifiés en utilisant le kit « Montage SEQ 96 cleanup » de millipore. Cette étape de purification permet d'avoir des réactions de séquence de bonne qualité.

Les résultats de la séquence du gène de l'ADN ribosomal 16S ont été importés dans BioEdit v5.0.9 et la séquence complète ou partielle du fragment a été reconstituée. Une recherche sur BLAST (blastn, non redondant) [226-228] avec la séquence complète, par l'intermédiaire de GenBank [229-231] a permis d'identifier la souche étudiée en comparant avec les souches les plus proches.

III.2.6.9. Clonage

Le clonage se déroule en deux étapes. La première étape est la ligation entre le gène d'intérêt et un vecteur digérés auparavant qui aboutit à la formation d'une molécule recombinée et la deuxième est la propagation, la multiplication de cette molécule à travers la transformation d'un hôte, le plus souvent *E. coli*.

a) Ligation

Les plasmides sont digérés avec l'endonucléase de restriction de choix pour libérer le fragment d'ADN à cloner, qui sera purifié après électrophorèse en réalisant l'extraction de la bande d'intérêt du gel d'agarose. Afin de réaliser la réaction de ligation, les concentrations du fragment d'ADN et du vecteur sont déterminées le plus souvent par estimation sur gel après migration. Nous utilisons alors un rapport molaire de 5:1 entre l'insert et le plasmide linéarisé. La ligation a lieu, et à température variable selon la ligase utilisée, pendant une nuit dans un tampon de ligation livré par le fournisseur avec 1 U d'ADN ligase du phage T4. Cette dernière

permet la formation d'une liaison covalente entre une extrémité 3' hydroxylée et une extrémité 5' phosphate de deux molécules d'ADN.

b) Transformation d'*Escherichia coli*

Nous avons utilisé la technique de transformation au chlorure de calcium (CaCl_2). Pour ce faire, une colonie isolée de la souche d'*E. coli* désirée est inoculée dans 3 mL de milieu LB et incubée durant une nuit à 37 °C. Le lendemain, 99 mL de milieu LB sont inoculés avec 1 mL de préculture et incubés environ 3 h à 37 °C sous une agitation de 250 rpm jusqu'à atteindre une absorbance comprise entre 0,4 et 0,6. Les cellules en plein phase exponentielle sont alors centrifugées à 5000 rpm durant 5 min à 4 °C et resuspendues dans 10 mL d'une solution tampon CaCl_2 -MOPS-glucose stérile et préalablement refroidie. Toutes les étapes suivantes se déroulent dans un bain de glace. Après 30 min d'incubation dans la glace, les cellules sont centrifugées dans les mêmes conditions que précédemment et le culot résultant est repris dans 2 mL de la même solution tampon. Les cellules sont alors prêtes à être transformées. Pour cela, 200 μL de cellules sont utilisées pour une réaction de transformation. L'ADN est ajouté aux cellules dans un microtube et le tout est incubé 1 h dans un bain de glace. Un choc thermique est alors réalisé à 42 °C durant 2 min et on ajoute immédiatement 1 mL du milieu LB. Les cellules sont alors incubées une heure à 37 °C pour l'expression du phénotype puis étalées sur milieu sélectif pour la sélection des transformants. L'efficacité de la transformation est généralement de 10^6 à 10^7 transformants par μg d'ADN pour un ADNp et de 10^4 à 10^5 pour une ligation.

III.2.7. Procédure de purification de la protéase SAPHM

La biomasse issue de la culture (500 mL) de 24 h de la souche K7A est éliminée par centrifugation à $9000 \times g$ pendant 30 min et à 4 °C. Le surnageant récupéré, contenant l'enzyme est clarifié par filtration à travers une membrane de 0,45 μm et gardé en vue de la purification selon les étapes suivantes:

III.2.7.1. Traitement thermique (30 min à 70 °C)

Le surnageant obtenu subit un traitement thermique à 70 °C pendant 30 min, puis centrifugés pendant 30 min à $14000 \times g$. Cette opération a pour but de précipiter une part importante de protéines du surnageant par dénaturation thermique. Chaque surnageant récupéré contient l'activité protéolytique.

III.2.7.2. Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium (40-70 %)

La précipitation est une technique sélective utilisée pour purifier partiellement et concentrer les protéines solubles dans un surnageant. Le sulfate d'ammonium à forte concentration entre en compétition avec les protéines pour réagir avec les molécules d'eau. Ceci entraîne une désolvatation suivie d'une précipitation.

La précipitation fractionnée des protéines de l'extrait brut a été réalisée de la manière suivante : On ajoute au surnageant contenant l'activité protéolytique, en faible quantité sous une agitation douce et à froid, du sulfate d'ammonium solide jusqu'à 40 % de saturation (242 g/L). On laisse sous agitation pendant 2 h puis on centrifuge (13000 x g pendant 30 min), le surnageant recueilli est additionné de sulfate d'ammonium solide jusqu'à 70 % de saturation (202 g/L). Après 2 h d'agitation, on centrifuge (13000 x g pendant 30 min), le culot est repris immédiatement dans 15 mL du tampon acide citrique additionné avec 2 mM CaCl_2 (tampon B) puis on centrifuge à 13000 x g pendant 30 min. Le surnageant obtenu est dialysé à +4 °C contre le tampon B pendant une nuit.

III.2.7.3. Chromatographie échangeuse de cations sur UNO Q12-FPLC

C'est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs propriétés ioniques. Dans notre travail on a utilisé une colonne de UNO Q12 (BioRad) ayant : un diamètre de 15 mm et une longueur de 68 mm, il s'agit d'une échangeuse de cations qui est capable de fixer des molécules chargées positivement, permettant de séparer des molécules chargées négativement qui vont passer à travers la colonne sans être retenues. Les molécules restées accrochées sur le gel ont été éluées par une solution de chlorure de sodium.

Le surnageant récupéré après l'étape de dialyse est alors déposé sur une colonne de UNO Q12, utilisant le système FPLC « Fast Pressure Liquid Chromatography », préalablement équilibrée avec le tampon A. L'éluion des protéines, avec le même tampon contenant une concentration croissante de NaCl de 0 à 500 mM, se fait à un débit de 3 mL/h et suivie par la lecture de la DO à 280 nm et le test d'activité protéasique.

III.2.7.4. Chromatographie d'exclusion diffusion sur ZORBAX PSM 300-HPLC

Cette technique, est appelée encore chromatographie par perméation de gel ou filtration sur gel. Elle permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise pour cela des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières au niveau du volume mort (appelé V_0). Les petites et les moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'élution et le logarithme de la masse moléculaire.

L'échantillon est préparé dans le plus petit volume manipulable possible. Nous avons choisi d'utiliser une boucle d'injection de 500 μ l dans laquelle nous injectons 100 μ l puis 500 μ l en diluant si besoin pour ne pas dépasser 10 mg de protéine par injection. Le contenu de cette boucle est alors injecté sur la colonne et séparé avec un débit de 0,8 mL/min. La colonne utilisée a été calibrée en utilisant un kit standard renfermant des protéines de masses connues et distribuées commercialement par Bio-Rad, France, sous forme de poudre. 1 mg de poudre de kit est ainsi dissout dans 1 mL de tampon Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) contenant 2 mM CaCl_2 (tampon C) utilisé pour purifier notre protéine d'intérêt, et centrifugé (10000 rpm pendant 30 min) pour éliminer tous les agrégats qui pourraient altérer la colonne.

III.2.8. Méthodes analytiques

III.2.8.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford [232]. Nous avons utilisé le kit (« Bio-Rad Protein Assay ») Bio-Rad, France, en mélangeant à chaque fois 200 μ l de colorant, le bleu de Coomassie G250, à 800 μ l d'une solution diluée de la protéine. La densité optique est mesurée à 595 nm contre un blanc qui ne contient pas d'extrait enzymatique. Afin d'obtenir des résultats fiables, la densité optique des échantillons étudiés doit être comprise entre 0,2 et 0,7. Cette méthode nécessite aussi une courbe d'étalonnage établie en utilisant l'Albumine Sérum Bovine (BSA) comme protéine standard, ce qui nous permet d'estimer la quantité de protéine en μ g/mL (appendice 3).

III.2.8.2. Séparation des protéines sur gel d'acrylamide

La pureté de l'enzyme est estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE à 10 %. Cette analyse des préparations enzymatiques par électrophorèse dans des conditions dénaturantes est réalisée selon la technique de Laemmli [233].

III.2.8.3. Coloration au bleu de Coomassie

Cette méthode colore les protéines de façon à peu près indépendante de la séquence. Après migration électrophorétique, le gel est plongé dans une solution de coloration (1 g de bleu de Coomassie R-250 (BioRad) dans 50 mL d'acide acétique, 250 mL d'éthanol et H₂O q.s.p. 500 mL), le gel est ensuite transféré dans une solution de décoloration (acide acétique 100 mL ; éthanol 350 mL et H₂O q.s.p. 1 litre). Le gel est stocké dans de l'eau avec 20 % d'éthanol, ce qui achève la décoloration et évite la contamination microbienne, puis séché ou photographié (scanné).

III.2.8.4. Détermination de l'activité protéasique sur zymogramme

Après migration sur gel de polyacrylamide, incorporant un substrat de protéase (azocaséine), dans des conditions dénaturantes. Le gel lavé dans l'eau distillée pendant 1 h en présence de 2,5 % Triton X-100 afin de remplacer le SDS puis incubé pendant 3 h à 40 °C en présence du tampon B. Une zone claire est visualisée sur le gel traité, après fixation pendant 1 h du TCA 20 % (p/v), coloration au bleu de Coomassie G-250 et décoloration par l'eau distillée/méthanol/ acide acétique.

III.2.8.5. Détermination des acides aminés des extrémités N-terminales par la méthode automatisée d'Edman

Les séquences N-terminales des différentes protéines sont purifiées native (SAPHM) et recombinante (rSAPHM) ont été déterminées par la méthode automatisée d'Edman sur microséquenceur de protéines [234, 235].

Elle comporte les trois étapes classiques de séquençage, à savoir : le couplage, le clivage et la conversion (appendice 4). L'alignement de la séquence obtenue avec les différentes séquences présentes dans GenBank est effectué en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) et les outils analytiques disponibles sur le site ExPASy (<http://expasy.org/tools/glycomod/> et <http://www.predictprotein.org/>).

III.2.8.6. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse mono-isotopique et de caractériser leur structure chimique, en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Elle comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z et les comptent (appendice 5).

III.2.8.7. Expression et purification de la protéase SAPHM recombinante

Les vecteurs recombinants construits par la SAPHM sont doublement digérés par les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII*. Les fragments (*EcoRI/HindIII*) ainsi libérés sont alors clonés dans le vecteur pTrc99A (souche DH5 α) préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction puis déphosphorylé.

Pour la purification, les cellules *E. coli* DH5 α /SAPHM transformées par le plasmide recombinant pTrc99A sont cultivées pendant une nuit à 45 °C et à 200 rpm dans le milieu LB (2 litres) contenant 100 μ g/mL d'ampicilline. À une absorbance de 0,6-0,8 à 600 nm, la production de la protéase (recombinante) est induite par l'ajout d'IPTG à une concentration de 0,4 mM pendant 8 h. La fraction périplasmique, contenant l'activité protéolytique, est obtenue par choc osmotique selon un protocole modifié [48]. Après centrifugation 15000 rpm pendant 20 min et à 4 °C, le surnageant retenu constitue la fraction extracellulaire. Le culot cellulaire est lavé deux fois avec l'eau froide puis resuspendu dans 10 mL de tampon de lyse (30 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 20 % saccharose) suivie d'une lyse dans la glace pendant 1 h par ajout de lysozyme à 200 μ g/mL. Après une seconde centrifugation (15000 rpm pendant 20 min), le surnageant ainsi obtenu représente la fraction périplasmique. Pour récupérer la fraction intracellulaire, le culot cellulaire résultant, est resuspendu dans 5 mL de tampon acétate de sodium 50 mM (pH 4,5) contenant 2 mM CaCl₂ et 5 mM dithiothreitol (DTT), puis soumis à une sonication par (« Vibra-Cell™ 72405 Sonicator ») pendant 6 $\times$ 10 s d'amplitude pour briser la membrane bactérienne puis centrifugé et le surnageant ainsi obtenu constitue la fraction intracellulaire.

III.2.9. Caractérisation biochimique de la protéase SAPHM

III.2.9.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la SAPHM

Pour étudier l'effet du pH sur l'activité de SAPHM et déterminer le pH optimal, des réactions d'hydrolyse de la caséine azure sont réalisées à différents pH allant de 3 jusqu'à 13 à 70 °C. L'enzyme pure est pré-incubée pendant 24 h à 70 °C à des pH variant de 7 à 12. Tous les tampons sont utilisés à des concentrations de 100 mM et en présence de 2 mM CaCl₂. Tampon glycine-HCl pour les pH 2 à 5 ; acide 4-(2-hydroxy éthyl)-1-piperazine éthane sulfonique (HEPES) pour les pH 6 à 8 ; Tris-HCl ou acide 2-(N-morpholino) éthane sulfonique (MES) pour les pH 8 à 9 ; glycine-NaOH pour les pH 9 à 11 ; bicarbonate-NaOH pour les pH 11 à 11,5 ; Na₂HPO₄-NaOH pour les pH 11,5 à 12 et KCl-NaOH pour les pH 12 à 13.

Les activités résiduelles sont mesurées aux optima de pH (10) et de température (70 °C) de l'enzyme et l'enzyme non incubée est considérée comme témoin.

III.2.9.2. Effet de la température sur l'activité et la thermostabilité de la SAPHM

Les réactions d'hydrolyse sont réalisées en maintenant le pH à 10 (pH optimal) pendant 20 min et en faisant varier la température de 40 à 100 °C en présence ou en absence du calcium (2 mM). Ceci permet la détermination de la température optimale de l'enzyme.

La thermostabilité de la SAPHM purifiée est examinée en incubant l'enzyme pendant 24 h à des températures de 70 et 80 °C. Des aliquotes sont prélevées à des intervalles de temps réguliers pour évaluer l'activité restante dans les conditions standards. Les enzymes non chauffées sont considérées comme témoin (100 %).

III.2.9.3. Effet des inhibiteurs sur l'activité enzymatique de la SAPHM

La protéase SAPHM est incubée en présence de différents inhibiteurs spécifiques pendant 1 h à la température ambiante avec un rapport ratio inhibiteur/enzyme égale à 100. Les activités résiduelles sont mesurées aux conditions optimales de l'enzyme. Les inhibiteurs de protéases utilisés sont:

- Inhibiteurs de protéases à sérine : PMSF, DFP.
- Inhibiteurs de la chymotrypsine : TPCK, TLCK.
- Inhibiteur de la trypsine : SBTI.

- Inhibiteurs compétitive de la trypsine : Benzamidine.
- Inhibiteurs de protéases à thiol : *LD-DTT* ; 2-ME ; DTNB; EPNP ; NEM ; Iodoacétamide; Leupeptine.
- Inhibiteur des protéases acides : Pepstatine A.
- Inhibiteurs de métallo-protéases : EDTA; EGTA.

III.2.9.3. Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique de la SAPHM

L'activité protéolytique est testée à pH 10 et à 70 °C pendant 1 h, en absence ou en présence de 2 mM de sels de métaux bivalents: Ca^{2+} (CaCl_2) ; Mn^{2+} (MnCl_2) ; Mg^{2+} (MgCl_2) ; Zn^{2+} (ZnCl_2) ; Co^{2+} (CoCl_2) ; Cu^{2+} (CuCl_2) ; Ba^{2+} (BaCl_2) ; Fe^{2+} (FeCl_2) ; Ni^{2+} (NiCl_2) ; Cd^{2+} (CdCl_2) et Hg^{2+} (HgCl_2).

L'activité est exprimée comme étant le pourcentage du niveau d'activité en absence d'ions métalliques. Les activités protéolytiques mesurées en absence des ions métalliques (en présence de 2 mM d'EDTA, agent chélateur) sont prises comme témoin (100 %).

III.2.9.4. Effet de la nature du substrat sur l'activité enzymatique de la SAPHM

Deux natures différentes de substrats protéiques sont utilisées. Des substrats naturels: Caséine, Albumine, Gélatine, kératine, et Ovalbumine. Et des substrats modifiés : azo-caséine, albumine azure, kératine azure et le collagène types I et II.

En plus, d'autres substrats protéiques sont utilisés tels que : les esters (BTEE ; ATEE ; BCEE ; BAEE et TAME) et les peptides synthétiques utilisés sont Succinyl-XXX ou XXXX-pNA avec XXX ou XXXX qui représentent FAAF, AAPF, AAVA, AAPM, AAPL, AAF, AAA, AAL, AAV, AAI et YLV, respectivement. Ces peptides ont été dissous dans 10 % (v/v) DMF avant d'être dilués dans le tampon, et ils doivent être préparés extemporanément du fait que les substrats nitroanilides montrent des degrés variables de l'autolyse pendant le stockage.

L'activité enzymatique est déterminée pour chaque substrat selon les conditions optimales.

III.2.9.5. Effet des polyols sur la thermostabilité de l'enzyme SAPHM

La thermostabilité des enzymes peut être améliorée par modification de leur microenvironnement par addition de sucres ou de polyols. L'effet protecteur des polyols est lié à leurs groupements hydroxyles. L'ajout de certains polyols évite la

dénaturation des molécules enzymatiques en renforçant les interactions hydrophobes à l'intérieur des molécules protéiques. L'influence de l'addition de polyols à 10% (comme le PEG 1000, PEG 1500, PEG 6000, le sorbitol, le glycérol, le mannitol et le xylitol) sur la thermostabilité de la protéase SAPHM a été étudiée après pré-incubation à 80 °C pendant 1 h. Les activités résiduelles ont été déterminées à pH 10 et à 70 °C, par rapport à deux témoins réalisés en absence de polyols (I) et non incubé (NI).

III.2.9.6. Effet combiné du calcium et de sorbitol sur la thermostabilité de l'enzyme SAPHM

Les expériences précédentes ont montré le rôle du calcium et des polyols dans l'amélioration de la thermostabilité de la protéase SAPHM. Pour cela on a essayé de tester l'effet du calcium (2 mM) combiné au sorbitol (10 %) sur la thermostabilité de la protéase SAPHM après pré-incubation de 12 h à 80 °C. Le temps de demi-vie (en min) à 80 °C de l'enzyme non incubée, déterminée en absence du sorbitol (10 %) et de CaCl_2 est considérée comme contrôle.

III.2.9.7. Détermination des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques des trois protéases la SAPHM et les enzymes commerciaux Alcalase 2,5 L, Themolysine: constante de dissociation ou de Michaelis-Menten (K_m) et vitesse maximale (V_{max}) sont déterminées à partir de la représentation graphique linéaire de Lineweaver–Burk (doubles inverses: $1/V$ en fonction de $1/[S]$) moyennant le programme Hyper32 utilisant différentes concentration de caséine de 0 à 10 mM et une concentration de protéase purifié à 1,5 mg dans les conditions optimales de cette enzyme (pH 10 et à 70 °C).

III.2.10. Application biotechnologique de la protéase SAPHM de la souche K7A

III.2.10.1. Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité enzymatique de la protéase SAPHM et Themolysine

Les réactions d'hydrolyse de la caséine sont réalisées à pH 10 en présence de 50 % (v/v) de solvants organiques [N-hexadécane, N-decane, isooctane, N-heptane, N-hexane, cyclohexane, toluène, benzène, chloroforme, 1-hexanol, 1-butanol, acétate d'éthyle,

isopropanol, alcool isopropylique, acétonitrile, éthanol, méthanol, N,N-diméthylformamide (DMF), et diméthylsulfoxyde (DMSO)].

La stabilité en présence des solvants organiques est testée après pré-incubation de chaque protéase sous agitation à 45 °C, pendant 72 h en absence ou en présence de 50 % de solvants organiques. Les activités protéolytiques résiduelles sont mesurées après une incubation de 72 h sous une agitation à 200 rpm aux conditions optimales d'activité enzymatique (pH 10 et à 70 °C).

III.2.10.2. Effet des additifs de détergent sur la stabilité de la protéase SAPHM

La stabilité enzymatique de la SAPHM a été déterminée en présence de poly(oxyéthylène) sorbitan monolaurate (Tween) 20 et 80 (5 % v/v), d'octylphenolpoly(éthylène glycol éther) (Triton) X-100 (5 % v/v), de SDS (2 % v/v), de l'urée (10 % v/v), de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 10 % v/v et du perborate de sodium (1 % v/v) en pré-incubant chaque protéase en présence de ces additifs pendant 1 h à 40 °C, puis les activités résiduelles ont été déterminées par rapport au témoin.

III.2.10.3. Effet des détergents commerciaux liquides et solides sur l'activité enzymatique de la SAPHM

La stabilité et la compatibilité de la SAPHM a été pré-incubé pendant 1 h à 40 °C en présence des détergents liquides : Pril-iSiS (Henkel, Alger, Algeria), Tide (Procter & Gamble, Suisse), Ariel (Procter and Gamble, Suisse), Nadhif (Henkel-Alki, Tunisie), OMO et Skip (Unilever, Tunisie), et les détergents solides : Dixan (Henkel, France), et Dipex (Klin Production, Sfax, Tunisie), Judy (Ennadhafa, Sfax, Tunisia), et Detech (Sodet, Sfax, Tunisie), ayant une concentration de 7 mg/mL, puis les activités résiduelles sont mesurées par rapport au témoin (absence de détergent).

Nous signalons que toutes les solutions détergentes ont été incubées à 40 °C pendant 1 h pour inactiver les enzymes endogènes. Les activités résiduelles sont ensuite mesurées à pH 10 et à 70 °C (l'enzyme non incubée en absence de détergent est considérée comme témoin).

III.2.10.4. Tests de performance de lavage de la SAPHM

Des pièces du tissu en coton (4 × 4 cm) portant des taches du sang ont été traitées durant 30 min à 40 °C sous différentes conditions:

- a) 100 mL d'eau de robinet.
- b) 100 mL d'eau de robinet + solution de détergent commercial Pril-iSiS à 7 mg/mL.
- c) 100 mL d'eau de robinet + solution de détergent commercial Pril-iSiS à 7 mg/mL additionnée de solution de l'Alcalase Ultra 2,5 L à 500 U/mL (enzyme commerciale).
- d) 100 mL d'eau de robinet + solution de détergent commercial Pril-iSiS à 7 mg/mL additionnée de solution de la SAPHM (500 U/mL).

Les pièces de tissus sont par la suite rincées à l'eau distillée, puis séchées afin d'être évaluées visuellement suite à une simple comparaison avec un contrôle (coton non traité).

Chapitre IV

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre IV .1

Criblage, optimisation et identification de nouvelle souche productrice de protéase alcaline

IV.1.1. Introduction

Le défi consiste, actuellement à découvrir des enzymes qui répondent convenablement aux contraintes techniques et économiques des procédés de biocatalyse industrielle moderne à s'avoir des enzymes plus stables dans des conditions extrêmes (pH alcalins, températures élevés, pression, présence d'agents dénaturants, de détergents, solvants organiques, etc.), et qui soient les plus actives, stables et sélectives possible. La diversité microbienne est en fait la majeure ressource pour les processus de production biotechnologiques. Cette diversité est liée aux habitats microclimats des microorganismes. Donc, la recherche de microorganismes producteurs d'enzymes, pouvant présenter des caractéristiques innovantes et nouvelles, et de plus en plus importantes.

Au cours d'un criblage de nouvelles souches productrices de protéases alcalines agissant dans des conditions extrêmes, une souche bactérienne a été isolée à partir d'un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers (région de Hassi Messaoud, sud d'Algérie). La souche a été identifiée comme étant K7A de *Bacillus licheniformis* et a fait l'objet de notre présence étude.

Il est souvent reconnu que la production des protéases extracellulaires chez les microorganismes est largement influencée d'une part, par les conditions physiques à savoir la température, le pH, l'aération et le temps d'incubation et d'autre part, par la composition chimique des milieux de culture, essentiellement la source de carbone, la source d'azote et les ions métalliques [236]. En fait, un milieu de culture doit contenir quantitativement et qualitativement les matières premières exigées pour la croissance et pour la production d'enzyme.

À l'échelle industrielle, les enzymes extracellulaires du genre *Bacillus* telles que les protéases alcalines, sont produites sur milieux contenant de fortes concentrations en sources complexes de carbone et d'azote. En effet, ces substrats complexes sont lentement hydrolysés, évitant ainsi la répression catabolique et permettent d'atteindre des concentrations intéressantes d'enzymes. Cependant, l'utilisation de milieux synthétiques avec de fortes concentrations de sources de carbone ou d'azote facilement assimilables comme le glucose et le sulfate d'ammonium, respectivement, est à l'origine de la répression catabolique des enzymes extracellulaires [16, 99, 117].

Au cours de ce travail, nous avons poursuivi le programme d'isolement et de criblage de nouvelles souches bactériennes productrices de protéases alcalines d'intérêt biotechnologique et par la suite l'identification de la bactérie la plus intéressante.

IV.1.2. Criblage des souches bactériennes sécrétrices de protéases

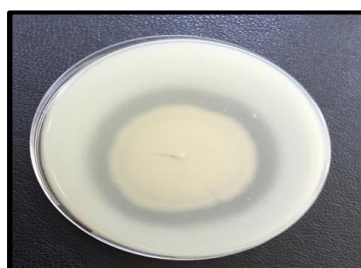


Figure IV.1.1 : Mise en évidence d'activité protéolytique produite par la souche bactérienne K7A sur gélose nutritive au lait.

L'isolement a abouti à la sélection de 100 nouvelles souches. Les souches nommées K1A jusqu'à K70A et K1B jusqu'à K30B. En se basant sur le rapport du diamètre de l'halo (mm) sur le diamètre de la colonie (mm), nous avons montré que parmi les 100 souches testées:

- 80 souches ne présentent pas d'activité protéasique ou elles possèdent une activité très faible.
- 20 souches montrent des rapports supérieurs à 4. Ces souches ont été retenues pour notre étude. Leur activité a été quantifiée après culture sur milieu liquide à base de caséine.
- Et par la suite, parmi ces 20 souches on obtient 2 souches K7A et K2B sont retenues pour les études plus détaillées.

IV.1.3. Culture des souches sur milieu liquide

Tableau IV.1.1 : Tableau récapitulatif de l'activité protéolytique sur milieu liquide initial de deux souches bactériennes retenues K7A et K2B. Les valeurs de la DO et du pH correspondent pour le temps de culture où nous avons observé la meilleure production.

Souche	Production (U/mL)				pH pour l'activité max	DO ₆₀₀ pour l'activité max
	0 h	24 h	48 h	72 h		
K7A	0	8500	7025	6850	10	4,95
K2B	0	1054	545	205	7,7	3,6

Nous avons également évalué pour chaque souche, l'absorbance à 600 nm et le pH final lorsque la culture atteint la production maximale de protéase. L'ensemble des résultats est noté dans le tableau IV.1.1.

À la lumière des études préliminaires du pH, d'activité protéolytique et de biomasse DO₆₀₀ nous avons constaté que la souche K7A semble la plus intéressante et retenue pour la poursuite de notre travail.

IV.1.4. Optimisation de la production de protéases par la souche K7A

La production des protéases par les souches protéolytiques est influencée d'une part, par les conditions physiques à savoir la température, le pH et l'aération et d'autre part, par la composition chimique des milieux de culture [237, 238]. En fait, un milieu de culture doit contenir une source de carbone, une source d'azote et des sels minéraux exigés pour la croissance et pour l'induction de l'enzyme [239]. Il doit également contenir quantitativement et qualitativement les matières premières nécessaires pour la substance inductrice de la production d'enzymes et des facteurs de croissance, susceptibles d'intervenir dans le métabolisme des substrats utilisés [240, 241].

Au cours de notre travail, nous nous sommes proposés d'évaluer la production de protéase par la souche K7A. Au fait nous avons démarré par un milieu initial (non

optimisé) composé (g/L) de : 10 g/L source de carbone ; 5 g/L source d'azote ; 2 g/L CaCl_2 ; 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/L K_2HPO_4 et 1 g/L KH_2PO_4 à pH 7,4. À partir de ce milieu nous avons alors cherché à optimiser les différents composants.

IV.1.4.1. Sélection de meilleures sources de carbone et d'azote

IV.1.4.1.1. Effet de différentes sources de carbone sur la production de protéase

Tableau IV.1.2 : Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de protéase par la souche K7A.

Source de carbone (10 g/L)	Témoin sans addition	Caséine	Gélatine	Glucose	Xylose
Activité protéase (U/mL)	380	8500	6590	3863	1130
Absorbance à 600 nm	4,01	4,95	4,72	3,27	1,22
pH final	6,12	6,56	6,31	5,89	5,9

Le niveau de production de protéases, de la croissance de la souche K7A ainsi que le pH final de la culture ont été déterminés et l'ensemble des résultats sont consignés dans le tableau IV.1.2.

L'analyse des résultats montrés sur ce tableau, met en évidence une bonne croissance de la souche K7A sur les différents substrats carbonés testés. En effet, une meilleure production (environ 8500 U/mL) et une croissance significative (absorbance à 600 nm de 4,95) sont observées sur milieu à base de caséine. Par conséquent, la caséine représente la source de carbone la plus adéquate pour la production de protéases et la croissance de K7A. Cette affinité vis-à-vis de la caséine peut être expliquée par l'existence des inducteurs issue de la protéolyse de la caséine qui favorisent la production de protéases par la souche K7A.

En fait, *B. licheniformis* comme d'autres espèces de *Bacillus* croît dans des milieux qui favorisent la biosynthèse des protéases. La caséine représente un composant important du milieu de culture ayant un effet inducteur [242]. Ferrero et al.

[200] ont montré aussi que la meilleure production d'une protéase par la souche *B. licheniformis* MIR 29 est à base de caséine comme source de carbone, alors que cette production est réprimée en présence de glucose, de saccharose et de maltose.

IV.1.4.1.2. Effet de la concentration de caséine sur la production de protéase

Tableau IV.1.3 : Optimisation de la concentration de la caséine pour la croissance et la production de protéase par la souche K7A.

Concentration de la caséine (g/L)	0	5	10	15	20
Activité protéase (U/mL)	385	4773	7950	3500	2040
Absorbance à 600 nm	4,10	3,47	5,68	5,34	3,23
pH final	6,26	6,42	6,64	6,21	6,4
Rendement (10^3 U protéase/g de la caséine ajoutée)	0	954,6	795	233,4	102

Les résultats présentés sur ce tableau montrent que la croissance bactérienne et la production de protéases par la souche K7A augmentent avec la concentration en caséine jusqu'à 10 g/L. En effet, l'augmentation de la production est significative pour des concentrations supérieures à 5 g/L et atteint un maximum de 7950 U/mL à 10 g/L. Au delà de 15 g/L, on observe une diminution de la production ainsi que la croissance.

En tenant compte du rendement ainsi que du niveau de la production de protéase par la souche K7A, une concentration en caséine de 10 g/L a été retenue pour la suite de notre travail.

IV.1.4.1.3. Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéase

Tableau IV.1.4 : Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéases par la souche K7A.

Source d'azote (2 g/L)	Témoin sans addition	Extrait de levure	Extrait de veau	Sulfate d'ammonium	Nitrate d'ammonium
Activité protéase (U/mL)	785	981	1590	2370	3400
Absorbance à 600 nm	5,23	6,54	3,68	5,85	7,90
pH final	6,72	6,47	6,65	6,28	9,92

Chez les microorganismes, l'azote organique ou inorganique est métabolisé pour produire essentiellement des acides aminés, des acides nucléiques, des protéines et certaines composantes des parois cellulaires. La production de protéases alcalines dépend considérablement de la disponibilité de la source de carbone et d'azote dans le milieu de culture. Les deux sources ont un effet régulateur sur la synthèse d'enzymes [243, 244].

L'analyse des résultats présentés sur le tableau IV.1.4 montre que la meilleure production de protéases par la souche K7A (3400 U/mL) est obtenue lorsqu'elle nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) est utilisée comme source d'azote. Ainsi, il sera utilisé comme source d'azote dans la suite de ce travail. Ces résultats sont concordance avec plusieurs travaux qui ont montré que les sources d'azote organique sont meilleures pour la production d'enzymes par les bactéries du genre *Bacillus* [159, 245, 246]. De même, la repression de la synthèse des protéases chez les espèces du genre *Bacillus* par excès d'ammonium a été largement décrite [247-249].

IV.1.4.1.4. Effet de la concentration de nitrate d'ammonium sur la production de protéase

Tableau IV.1.5 : Optimisation de la concentration de nitrate d'ammonium sur la croissance bactérienne et sur la production de protéases par la souche K7A.

Concentration de NH_4NO_3 (g/L)	0	1	2	5	10
Activité protéase (U/mL)	825	8860	9360	12500	8180
Absorbance à 600 nm	5,20	4,19	5,77	8,2	8,04
pH final	6,88	5,94	5,69	5,49	10,14
Rendement (10^3 U protéase/g de NH_4NO_3 ajouté)	0	8860	4680	2500	818

L'analyse des résultats montre qu'il y a une meilleure production de protéases avec la concentration en NH_4NO_3 et atteint 12500 U/mL pour une concentration de 5 g/L. Ces résultats montrent également une augmentation de la biomasse (DO à 600 nm = 8,2) avec la concentration 5 g/L de NH_4NO_3 .

À la lumière de cette optimisation, un nouveau milieu de composition (en g/L) : 10 caséine ; 5 NH_4NO_3 ; 1 K_2HPO_4 ; 1 KH_2PO_4 ; 2 CaCl_2 ; 1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; et 2 % (v/v) d'oligoéléments à pH 10 a été retenu pour la suite du travail puisqu'il permet une meilleure croissance (DO = 8,2 nm) et une meilleure production de protéase (12500 U/mL).

IV.1.5. Cinétique de la production de protéase et de croissance bactérienne de la souche K7A

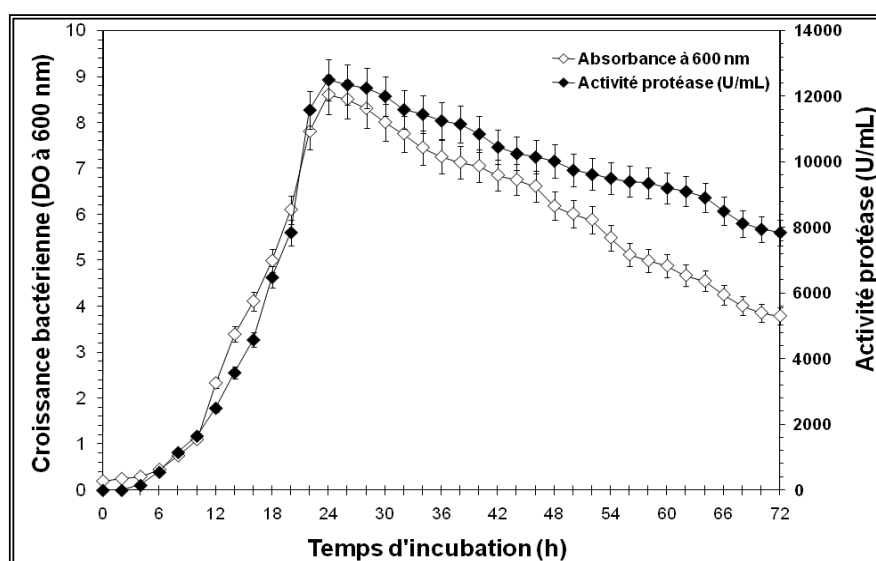


Figure IV.1.2: Cinétique de production de protéase et de croissance bactérienne de la souche K7A.

Le suivi de la production de protéase et de la croissance bactérienne de la souche K7A de *Bacillus licheniformis* en fonction du temps, montre que la sécrétion de protéase commence après une phase de latence de 4 h et dès le début de la phase de croissance exponentielle. Elle évolue par la suite de façon concomitante avec la croissance bactérienne et atteint son maximum d'activité (12500 U/mL) après 24 h de culture avec une DO à 600 nm d'environ 8,2. Ainsi, le maximum de croissance coïncide avec le maximum d'activité enzymatique. Au-delà de cette période, la production commence à diminuer légèrement (figure IV.1.2). Cette diminution est probablement due soit à une instabilité de l'enzyme, soit à une auto-dégradation ou à l'action protéolytique d'autres protéases libérées lors de la lyse cellulaire et/ou la sporulation. Le phénomène d'instabilité de l'activité protéolytique lors de la fermentation a été également décrit pour d'autres souches comme *Bacillus subtilis* ATCC 14416 [243] et *Erwinia chrysantemi* [250].

L'ensemble de résultats obtenus montre clairement que la souche sélectionnée se développe très bien dans le milieu de culture utilisé. Toutefois, elle présente des niveaux de production de protéase variable avec de maximum d'activité attrapant après 24 h pour la souche K7A. La différence des niveaux de production de

protéase sur milieu liquide dépendrait de plusieurs paramètres tel que : les exigences nutritionnelles des souches (la composition du milieu, les concentrations des substrats) et les conditions de l'environnement (vitesse d'agitation, température, aération, temps d'incubation) [251]. En plus, nous remarquons que les valeurs du pH ont légèrement varié et qu'aucune souche ne présente un pH plus alcalin que celui de départ (pH 10).

On note que la production de l'enzyme évolue avec la croissance, les protéases sont secrétées dès le début de la croissance du microorganisme. La production continue jusqu'à la fin de la phase exponentielle et même pendant la phase stationnaire. Des résultats similaires ont été obtenus pour *B. cereus* MCM B-326 [252] et *B. cereus* BG1 [253].

En outre, on remarque que la souche K7A s'adapte rapidement au milieu avec une phase de latence très courte, suivie d'une phase d'accélération pour atteindre la vitesse maximale. Au-delà de la période de croissance exponentielle la production commence à diminuer légèrement. Cette diminution est probablement due aux plusieurs phénomènes :

- Epuisement des éléments nutritifs dans le milieu de culture.
- Une dégradation par les enzymes endogènes libérés suite à la lyse cellulaire (les cathapsines).
- Inhibition par excès de surproduction d'enzymes.
- Instabilité de l'enzyme.

On remarque aussi que le pH est variable et très rare que les souches présentent un pH plus alcalin que celui du départ (pH=10).

IV.1.6. Identification de la souche K7A

Pour identifier la souche K7A, nous avons eu recours à des approches morphologiques, physiologiques et moléculaires.

IV.1.6.1. Taxonomie classique

IV.1.6.1.1. Caractéristiques morphologiques et physiologiques

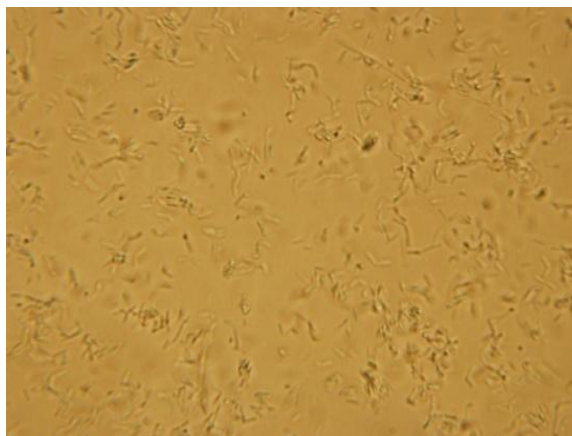


Figure IV.1.3 : Aspect des cellules bactériennes de la souche K7A sous microscope optique G $\times$ 100 (Photo originale).

L'observation microscopique, à l'état frais, a montré que la souche K7A est une bactérie en forme de bacille (figure IV.1.3).

Tableau IV.1.6: Résultats préliminaires des tests d'identification phénotypique.

Test	Résultat
Observation à l'état frais	Forme de bacille de petite taille à spore central non déformé
Coloration de Gram	+
Catalase	+
Oxydase	+
Mannitol	+
Mobilité	Mobile

Par la suite, nous avons effectué des tests bactériologiques préliminaires d'orientation (tableau IV.1.6) afin de choisir la galerie API adéquate. Cette analyse a prouvé qu'il s'agit d'une souche aérobie et Gram positive. Ainsi, en se référant aux résultats décrits dans le manuel de Bergey Systématique de la Bactériologie [254], il a été suggéré que la souche K7A est une bactérie appartenant au genre *Bacillus*. À la lumière de ces résultats, nous avons choisi la galerie adéquate en l'occurrence la galerie API 50 CH (tableau IV.1.7).

IV.1.6.1.2. Identification en utilisant la galerie API 50 CH

Tableau IV.1.7: Résultats de la galerie API 50 CH (fermentation de 49 carbohydrate).

Carbohydrate	Résultat du test
Esculine	-
Salicine	-
Cellobiose	+
Maltose	+
Lactose	-
Saccharose	+
Trehalose	+
Gentiobiose	-
Melibiose	-
Raffinose	-
Melezitose	+
Amidon	-
Glycogène	-
Inuline	-
D-Turanose	+
D-Tagatose	+
D-Fucose	-
L-Fucose	-
D-Lyxose	±
D-Arabitol	-
L-Arabitol	-
Xylitol	-
Gluconate	-
2-Céto gluconate	-
5-Céto gluconate	-

Carbohydrate	Résultat du test
Glycérol	+
Erythritol	-
D-Arabinose	+
L-Arabinose	-
Ribose	+
D-Xylose	+
L-Xylose	-
Adonitol	-
β-Méthyl xyloside	±
Galactose	+
Glucose	+
Fructose	+
Mannose	+
L-Sorbose	-
Rhamnose	-
Dulcitol	±
Inositol	-
Sorbitol	-
Mannitol	-
L-Méthyl-D-mannoside	+
D-Méthyl-D-glucoside	+
N-Acétyl glucosamine	-
Amygdaline	+
Arbutine	-

La lecture de la galerie API 50 CH confirme qu'il s'agit des souches du genre *Bacillus* et qu'elle métabolise plusieurs sucres carbohydratés et possèdent d'activités enzymatiques caractéristiques des autres souches de *Bacillus* et que la détermination de l'espèce nécessite d'autres tests supplémentaires.

IV.1.6.2. Taxonomie moléculaire (identification moléculaire par la technique de l'ARN 16S)

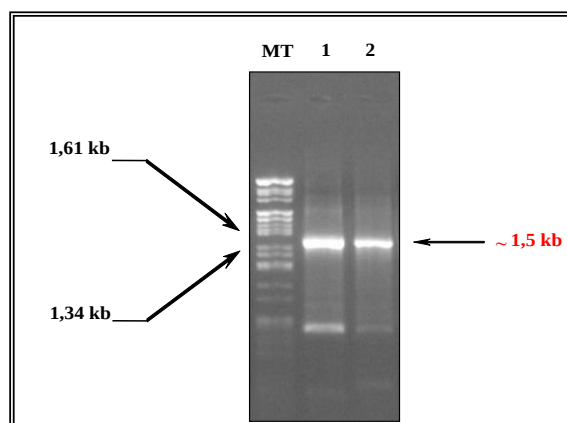


Figure IV.1.4: Analyse du produit PCR de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche K7A. Piste 1: Produit PCR avec *Taq* polymérase ; Piste 2: Produit PCR avec *pfu* polymérase ; Piste MT: Marqueur de taille λ -*HincII* (4,58 ; 3,51 ; 3,27 ; 2,84 ; 2,19 ; 1,96 ; 1,79 ; 1,67 ; 1,61 ; 1,34 ; 1,26 ; 1,1 ; 0,86 ; 0,73 ; 0,56 kb).

La méthode d'identification moléculaire (l'ARN ribosomique : ARNr) est considérée actuellement comme méthode rapide et plus fiable pour la détermination de l'espèce. En plus, elle permet la réalisation des études phylogénétiques comparées aux techniques classiques de la taxonomie [254, 255]. De ce fait, pour amplifier tout le gène de l'ARNr 16S par PCR, nous avons choisi un couple d'amorces (Directe, Oligo F-27 et Reverse, Oligo R-1525) dont les séquences appartiennent aux régions conservées flanquant ce gène. Ainsi, nous avons amplifié un fragment d'ADN de taille attendue estimée à ~1,5 kb (figure IV.1.4).

Oligo F-27 : 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' (Position 8 à 27 chez *E. coli*).

Oligo R-1525 : 5'AAGGAGGTGATCCAAGCC3' (Position de 1541 à 1525 chez *E. coli*).

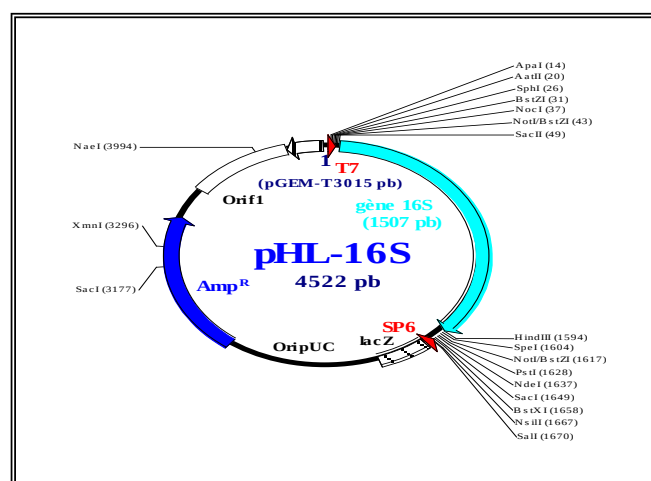


Figure IV.1.5 : Carte de restriction du plasmide pHL-16S (4522 pb).

Ce fragment PCR (1507 pb) a été purifié puis cloné dans un vecteur approprié, en l'occurrence le pGEM-T (3015 pb), pour générer le plasmide pHL-16S de taille 4522 pb (figure IV.1.5).

```

GTGCTAAGACAGTTATTAATAACCAAAAAATTTTAAATTGGTCCTCCAAAAAATAGGCCTACCATATAAT
TCATTTTTTTTTCTATAATAAATTAACAGAATAATTGGAATAGATTATATTATCCTTCTATTTAAATTATTC
TGAATAAAGAGGAGGAGAGTGAGTAATGATGAGGAAAAAGAGTTTTTGGCTTGGGATGCTGACGGCCTTCA
TGCTCGTGTTCACGATGGCATTACGCGATTCCGCTTCTGCTGCTCAACCGGCGAAAAATGTTGAAAAGGAT
TATATTGTCGGATTTAAGTCAGGAGTGAAAACCGCATCTGTCAAAAAGGACATCATCAAAGAGAGCGGCGG
AAAAGTGGACAAGCAGTTTAGAATCATCAACGCGGCAAAAGCGAAGCTAGACAAAGAAGCGCTTAAGGAAG
TCAAAAATGATCCGGATGTCGCTTATGTGGAAGAGGATCATGTGGCCCATGCCTTGGCGCAAAACCGTTCTCT
TACGGCATTCTCTCATTAAAGCGGACAAAAGTGCAGGCTCAAGGCTTTAAGGGAGCGAATGTAAAAGTAGC
CGTCTTGGATACAGGAATCCAAGCTTCTCATCCGACTTGAACGTAGTCGGCGGAGCAAGCTTTGTGGCTG
GCGAAGCTTATAACACCGACGGCAACGGACACGACACATGTTGCCGGTACAGTAGCTGCGCTTGACAAT
ACAACGGGTGTATTAGGCGTTGCGCCAAGCGTATCCTTGTACGCGTTAAAGTACTGAATTCAGCGGAAG
CGGATCATACAGCGGCATTGTAAGCGGAATCGAGTGGGCGACAACAAACGGCATGGATGTTATCAATATGA
GCCTTGGGGGAGCATCGGGCTCGACAGCGATGAAACAGGCAGTCGACAATGCATATGCAAGAGGGGTGTGTC
GTTGTAGCTGCAGCAGGGAACAGCGGATCTTCAGGAAACACGAATACAATTGGCTATCCTGCGAAATACGA
TTCTGTCATCGCTGTTGGTGCAGTAGACTCTAACAGCAACAGAGCTTCATTTTCCAGTGTGGGAGCAGAGC
TTGAAGTCATGGCTCCTGGCGCAGGCGTATACAGCACTTACCCAACGAACACTTATGCAACATTGAACGGA
ACGTCAATGGCTTCTCCTCATGTAGCGGGAGCAGCAGCTTTGATCTTGTCAAAACATCCGAACCTTTTCAGC
TTCACAAGTCCGCAACCGTCTCTCCAGCACGGCGACTTATTTGGGAAGCTCCTTCTACTATGGGAAAGGTC
TGATCAATGTCGAAGCTGCCGCTCAATAACATATTCTAACAAATAGCATATAGAAAAAGCTAGTGTTTTA
GCACTAGCTTTTTTCTTCTGATGAAGGTTGTTCAATATTTTGAATCCGTTCCATGATCGTCGGATGGC
CGTATTTAAAAATCTTGA

```

Figure IV.1.6 : Séquence nucléotidique du gène d'ARNr 16S (4522 pb) de la souche K7A.

La séquence nucléotidique totale de ce fragment a été déterminée moyennant les techniques de séquençage automatique (figure IV.1.6). La séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche K7A a été déposée dans la banque de données « GenBank BLAST » sous le numéro d'accèsion **MG748549**.

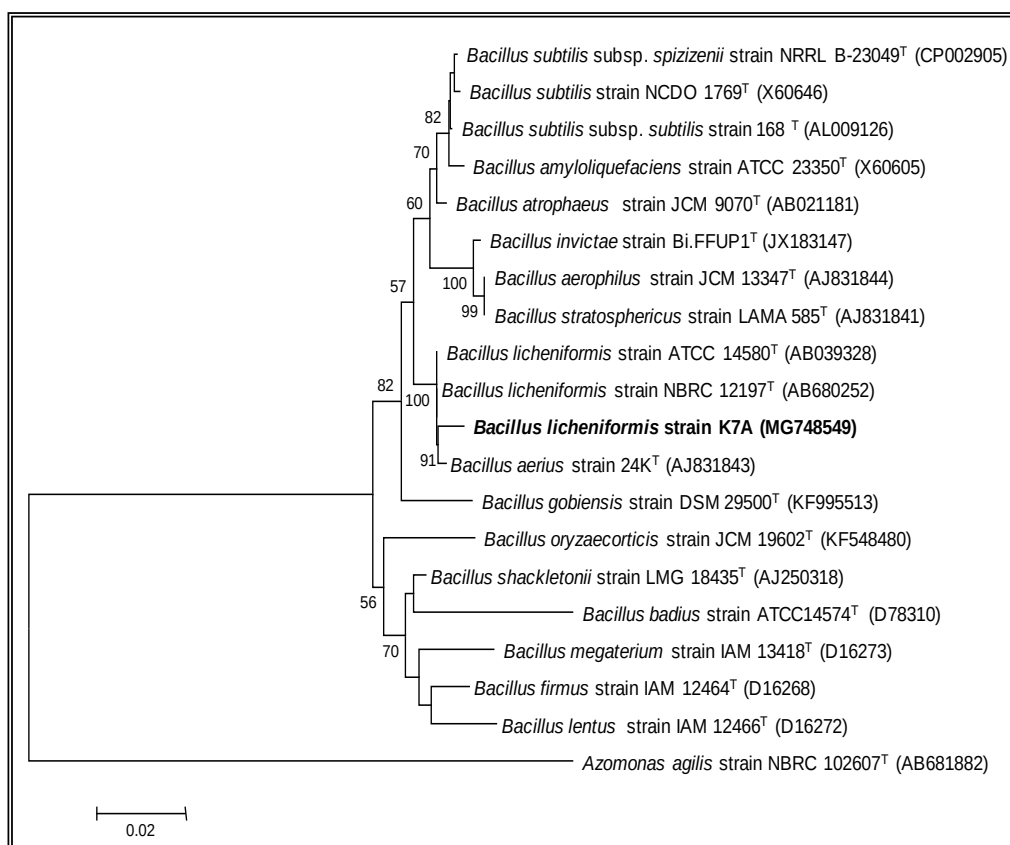


Figure IV.1.7 : Arbre phylogénétique obtenu après alignement du gène de l'ARNr 16S de la souche K7A (numéro d'accèsion : MG748549) avec la banque de données GenBank BLAST.

L'alignement de cette séquence est réalisé avec la banque de données GenBank BLAST. Cette dernière est considérée plus sûre étant donné qu'elle englobe les séquences des bactéries de référence qui sont bien expertisées et vérifiées par des spécialistes. L'analyse des résultats obtenus montre que la souche K7A présente une identité très importante (97 %) avec les gènes d'ARNr 16S des souches de *Bacillus* notamment celles de l'espèce *licheniformis* à savoir : *Bacillus aerophilus* JCM 13347^T (numéro d'accèsion : AJ831844), *Bacillus stratosphenicus* LAMA 585^T (numéro d'accèsion : AJ831841), *Bacillus licheniformis* ATCC 14580^T (numéro d'accèsion : AB039328), *Bacillus licheniformis* NBRC 12197^T (numéro d'accèsion : AB680252) et *Bacillus aerius* 24K^T (AJ831843).

Ces séquences ont été importées et alignées dans une version du logiciel MEGA 4.1. L'arbre phylogénétique a été ensuite construit (figure IV.1.7) et les

résultats en outre ont confirmé que la souche K7A (numéro d'accension : (MG748549) est étroitement liée aux autres souches de *Bacillus licheniformis*.

IV.1.7. Conclusion

Cette étude a visé le criblage, l'optimisation ainsi que l'identification d'une souche bactérienne protéolytique produisant une enzyme alcaline. En effet, à partir de 100 souches testées sur gélose nutritif au lait (test semi-qualitatif), 20 souches ont été retenues du fait qu'elles présentent un rapport du diamètre de l'halo sur le diamètre de la colonie (constitue un premier critère de sélection). Ces 20 souches ont été sujettes à une étude de production sur milieu liquide pour une étude quantitative. Cette dernière a conduit à la sélection de 2 souches intéressantes à savoir ; K7A et K2B vue qu'elles présentent un niveau de production supérieur à 1054 U/mL (constitue un deuxième critère de sélection).

L'identification de la souche K7A a été basée sur les méthodes cataboliques par la galerie API 50 CH d'une part, et sur les méthodes de biologie moléculaire par la détermination de la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARNr 16S, d'autre part. Les résultats obtenus ont permis d'identifier la souche K7A en tant qu'une sous espèce de *Bacillus licheniformis*.

Cette souche apte à être active dans des conditions extrêmes de pH et température qui seront bien étudiée dans la partie qui suit à savoir, la purification et la caractérisation des enzymes protéolytiques et leurs introductions dans des applications industrielles notamment la détergence et la synthèse peptidique.

Chapitre IV.2

Purification et caractérisation biochimique d'une nouvelle protéase produite par *B. licheniformis*

À la lumière des résultats de la caractérisation des différentes préparations enzymatiques des souches isolées, la souche K7A est identifiée comme étant *Bacillus licheniformis*, s'avère être la plus intéressante en tant que la meilleure candidate pour l'hydrolyse de protéines. Elle secrète une ou plusieurs protéases alcalines actives qui seraient intéressantes sur le plan de recherche fondamentale et sur le plan d'application industrielle. Ceci nous a incité à sa purification et à sa caractérisation physico-chimique.

IV.2.1. Procédure de purification de la protéase SAPHM produite par la souche K7A de *Bacillus licheniformis*

Afin de mieux caractériser l'activité protéase de l'enzyme SAPHM à l'état pure, le surnageant de culture présentant une activité totale de 12500 U/mL a fait l'objet de la purification qui comporte quatre étapes à savoir ; un traitement thermique (30 min à 70 °C), une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (40 à 70 %) suivie d'une chromatographie échangeuse d'anions UNO Q-12 utilisant le système FPLC et une chromatographie sur gel filtration utilisant le système HPLC.

IV.2.1.1. Traitement thermique

Le surnageant de culture de 500 mL après 24 h faite sur milieu liquide optimisé à pH 10 constitue les extraits bruts enzymatiques. Le surnageant ayant une activité enzymatique de 1923 U/mg a subi un traitement thermique à 70 °C pendant 30 min, puis centrifugé pendant 30 min à 14000 rpm. Le surnageant contenant l'activité est récupéré pour la suite de la purification. Cette opération a pour but de précipiter une part importante de protéines du surnageant par dénaturation thermique, ce qui permet l'augmentation de l'activité spécifique de 1923 à 5177 U/mg (tableau IV.2.1).

IV.2.1.2. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

Les protéines contenues dans le surnageant récupéré après traitement thermique sont précipitées avec le sulfate d'ammonium entre 40 et 70 %. Les protéines précipitées à 40 % ne contiennent pas d'activité protéolytique alors que le culot obtenu à 70 %, contient l'activité. Ce dernier, est récupéré dans le minimum du tampon Tris-HCl, additionné avec 5 mM CaCl_2 à pH 7,4 (tampon A) puis dialysé contre le même tampon une nuit à 4 °C afin d'éliminer toute trace de sel. La précipitation fractionnée a permis d'éliminer environ 88 % de la quantité initiale des protéines avec un rendement d'activité protéolytique 75 %. Le facteur de purification est de l'ordre de 11,97 (AS = 23026 U/mg).

IV.2.1.3. Chromatographie échangeuse de cations FPLC UNO Q-12

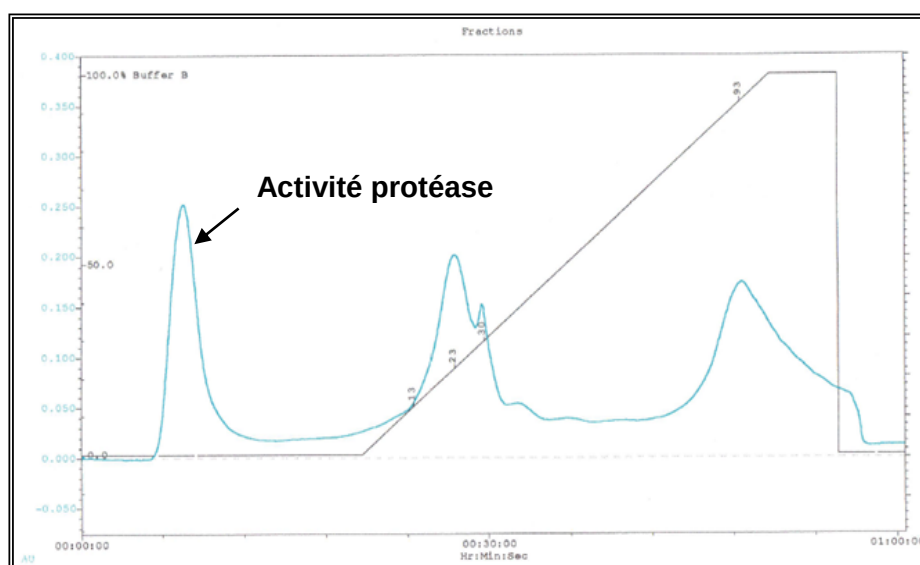


Figure IV.2.1 : Profil d'élution après sortie d'une chromatographie sur colonne échangeuse d'anion FPLC UNO Q-12. Pic n°1 contenant l'activité protéolytique.

La figure IV.2.1, montre qu'il y a trois pics dans le profil d'élution. Cette analyse a montré que l'activité enzymatique se trouvait uniquement dans le premier pic dans les fractions de 39 jusqu'à 49 selon un gradient de sels entre 170 et 250 mM. Les fractions de ce pic sont rassemblées et passées sur une unité d'ultrafiltration de 10 kDa ce qui a pour but la concentration et le dessalement de l'échantillon. Les fractions contenant l'activité protéolytique sont rassemblées pour l'étape suivante de la purification.

IV.2.1.4. Chromatographie d'exclusion diffusion sur HPLC ZORBAX PSM 300

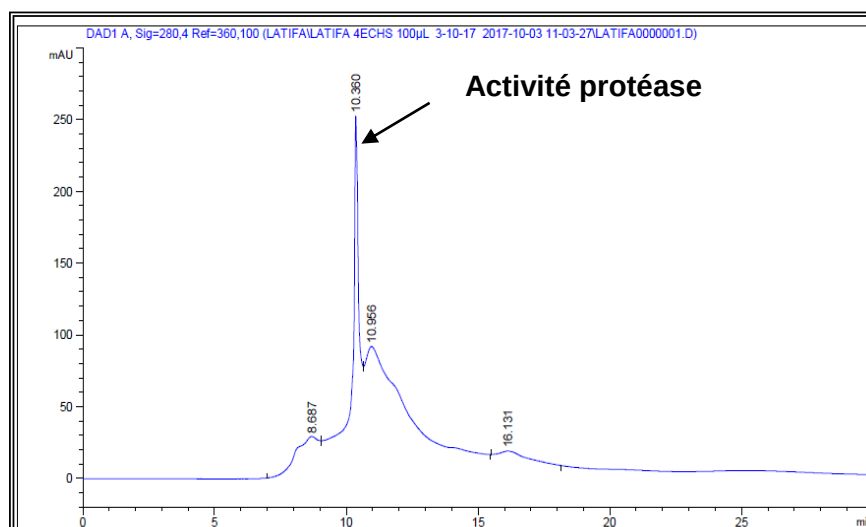


Figure IV.2.2 : Profil d'élution de la fraction active après sortie d'une chromatographie sur une colonne de filtration sur gel de l'activité protéase (temps de rétention = 10,1 min), en utilisant le système HPLC. La colonne ZORBAX PSM 300 est pré-équilibrée par le tampon B. Le débit d'élution est de 30 mL/h et la détection des protéines se fait à 280 nm.

L'élution des protéines est effectuée avec le même tampon avec un débit de 30 mL/h. Des fractions de 1,8 mL sont collectées et analysées par mesure de l'absorbance à 280 nm et de l'activité protéolytique sur la caséine azure.

Le profil d'élution (figure IV.2.2), montre que l'enzyme est éluée entre 1,8 et 2,1 V_0 . Le rendement de l'activité protéolytique est de 34 % avec un facteur de purification de 42,5 fois. L'activité spécifique de l'enzyme est estimée à 81730 U/mg.

IV.2.1. 5. Bilan de la purification**Tableau IV.2.1:** Bilan de la purification à homogénéité de la protéase SAPHM

Etape de purification	Activité totale (U) × 10 ³	Quantité de protéines (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification (fois)
Extrait cellulaire	6250 ± 34	3250 ± 45	1923	100	1
Traitement thermique (70 °C pendant 10 min)	5312 ± 25	1022 ± 30	5177	85	2,70
Précipitation fractionnée au (NH ₄) ₂ SO ₄ (40-70 %) avec dialyse	4375 ± 18	190 ± 7	23026	70	11,97
FPLC UNO Q-12	3187 ± 12	87 ± 5	36632	51	19,04
HPLC (ZORBAX PSM 300)	2125 ± 10	26 ± 1	81730	34	42,5

D'après ces résultats, la protéase SAPHM de la souche K7A de *Bacillus licheniformis*, a été purifiée à homogénéité à partir du surnageant de culture en quatre étapes, avec un degré de pureté d'environ 42,5 fois.

L'activité spécifique obtenue (81730 U/mg) est plus importante que les activités des protéases récemment décrites par Jaouadi et *al.* [222, 256-258], Zraï- Jaouadi et *al.* [222, 256-258], Ben Elhoul et *al.* [222, 256-258] et Mechri et *al.* [222, 256-258] qui présentaient des valeurs respectives de 21500 U/mg (SAPB), 45500 U/mg (SAPB-L31I/T33S/N99Y), 43750 U/mg (STAP) et 41250 U/mg (SPVP).

IV.2.1.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

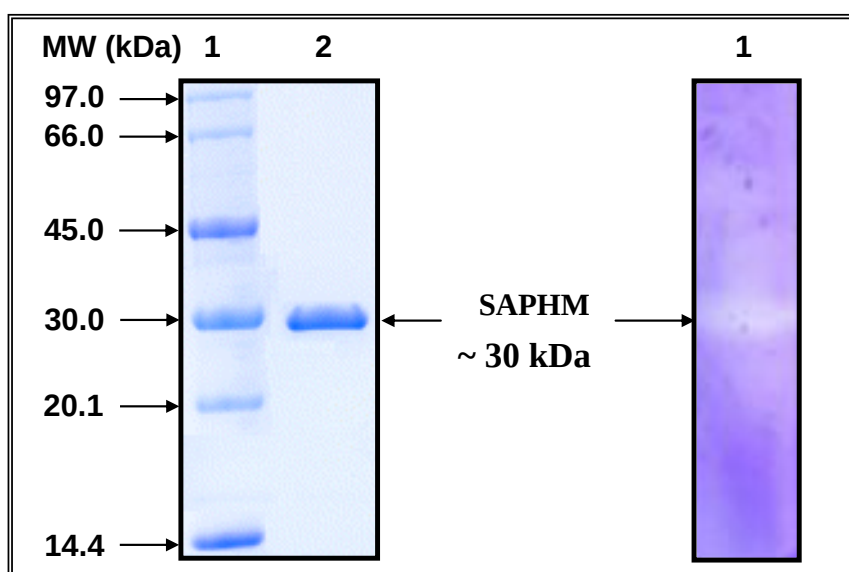


Figure IV.2.3 : Estimation de la taille de la protéase SAPHM sur SDS-PAGE à 15 %. Piste 1 à gauche: Marqueurs de taille. Piste 2: SAPHM (50 µg). Piste 1 à droite: le profil du zymogramme sur caséine de la fraction pure 30 kDa.

Le profil électrophorétique montre que la protéase SAPHM se présente sous forme d'une seule bande pure et homogène de masse moléculaire apparente de 30 kDa. Ceci confirme que notre protéase est de structure monomérique active sur la caséine comme celles trouvées chez d'autres protéases de *Bacillus* [241, 259-264].

IV.2.1.7. Détermination de la taille de SAPHM par MALDI-TOF/MS

L'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS) montre que la masse moléculaire exacte de la SAPHM est **30325,12 Da** (figure IV.2.3).

Ces résultats montrent que l'enzyme SAPHM se présente sous forme d'un seul monomère, comme toutes les protéases déjà décrites, tout particulièrement celles provenant du genre *Bacillus* [110, 260].

Kumar et *al.* avaient rapporté que les masses moléculaires des protéases alcalines sont généralement comprises entre 15 et 30 kDa [98]. Depuis, d'autres protéases sont décrites avec des masses moléculaires plus importantes [265-267].

IV.2.1.8. Séquençage de l'extrémité NH₂-terminale de la SAPHM**Tableau IV.2.2:** Alignement de la séquence NH₂-terminale de la protéase SAPHM avec celles d'autres protéases.

Enzyme	Origine	Séquence NH ₂ -terminale amino acide ^a	Identité (%) ^b
SAPHM	<i>Bacillus licheniformis</i> K7A	AQTVPQGIIPLIKAQGVQAGFDGARV	97
Subtilisin Carlsberg	<i>Bacillus licheniformis</i> NCIB-6816	AQTVPYGIPLIKADKVQAQGF	90
APRMP1	<i>Bacillus licheniformis</i> MP1	AQTVPYGIPLIKAD	86
SAPB	<i>Bacillus pumilus</i> CBS	AQTVPYGIPQIKAPAVHAQGY	71
BPP-A	<i>Bacillus pumilus</i> MS-1	AQTVPYGIPQIKAPAVHAQGY	71
DHAP	<i>Bacillus pumilus</i> UN-31-C-42	AQTVPYGIPQIKAPAVHAQGY	71
SPVP	<i>Aeribacillus pallidus</i> VP3	APSGP GPGQIKADKVHAQGFKGAN	70
SAPLF	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> C250R	VPSGPYGPIDIKADKV EDGFKMDEYF	64
SAPDZ	<i>Bacillus circulans</i> DZ100	AQTVPYGMAQIKDPAVHGQGYKGAN	54
Subtilisin E	<i>Bacillus subtilis</i> 168	AQSVPYGISQIKAPALHSQGY	52
Subtilisin Novo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23844	AQSVPYGVVSQIKAPALHSQGY	48

Le séquençage de l'extrémité NH₂-terminale de l'enzyme SAPHM fait apparaître 26 acides aminés dont la séquence est la suivante: AQTVPYGIPLIKADKVQAQGFRGANV. D'après l'alignement de cette séquence avec celles d'autres protéases microbiennes présentés dans le tableau IV.12.2, on

remarque que les parties **AQTVP** et **GIPLIKA** sont conservées dans toutes les séquences.

La protéase SAPHM se rapproche de la Subtilisin Carlsberg produite par *Bacillus licheniformis* NCIB-6816 et la APRMP1 de *Bacillus licheniformis* MP1 avec des pourcentages d'homologie de 90 % et 86 %, respectivement.

IV.2.2. Caractérisation biochimique des préparations enzymatiques

L'utilisation des protéases qui catalysent les réactions dans des conditions extrêmes (haute ou basse température, pH élevé... etc.) présente une grande importance dans plusieurs applications industrielles [117, 118]. Ainsi, nous avons déterminé la température et pH optimum d'action des différentes préparations enzymatiques. De plus, nous avons étudié la stabilité thermique et l'effet des ions métalliques et les inhibiteurs sur la stabilité de l'enzyme pure. Nous avons également étudié l'effet de polyols et l'effet de calcium sur la stabilité protéolytique de l'enzyme.

IV.2.2.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de l'enzyme

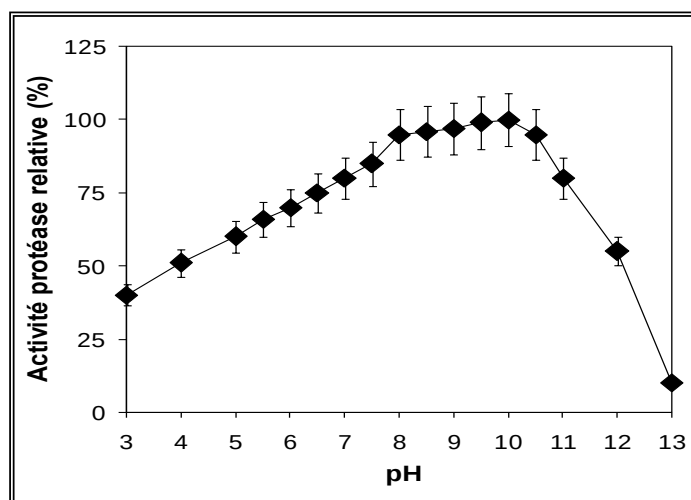


Figure IV.2.4: Effet du pH sur l'activité de l'enzyme SAPHM.

Le pH présente une grande influence sur l'activité enzymatique. Il fait fluctuer les charges dans le site actif et sur la surface de la molécule du protéase [268].

L'activité de l'enzyme purifiée a été testée à différentes valeurs de pH (3 à 13). Les résultats présentés ci-dessous montrent que la protéase SAPHM est active dans une large gamme de pH entre 7 et 12 et que l'optimum d'activité est obtenu à pH 10 (figure IV.2.4). Plusieurs travaux ont rapporté des résultats similaires [269-272].

En effet, les activités relatives à pH 6,5 et 11 sont respectivement de 75 et 80 %. Pour des pH supérieurs à 11,5 l'activité enzymatique décroît considérablement. Ainsi, la SAPHM présente l'avantage de pouvoir être utilisée dans une large gamme de pH comparativement aux autres protéases commerciales utilisées dans les détergents, tels que: l'Alcalase™ qui présente une activité maximale à pH 8-9 [269, 273] et la Savinase™ avec une activité maximale entre les pH 8 et 10 [15].

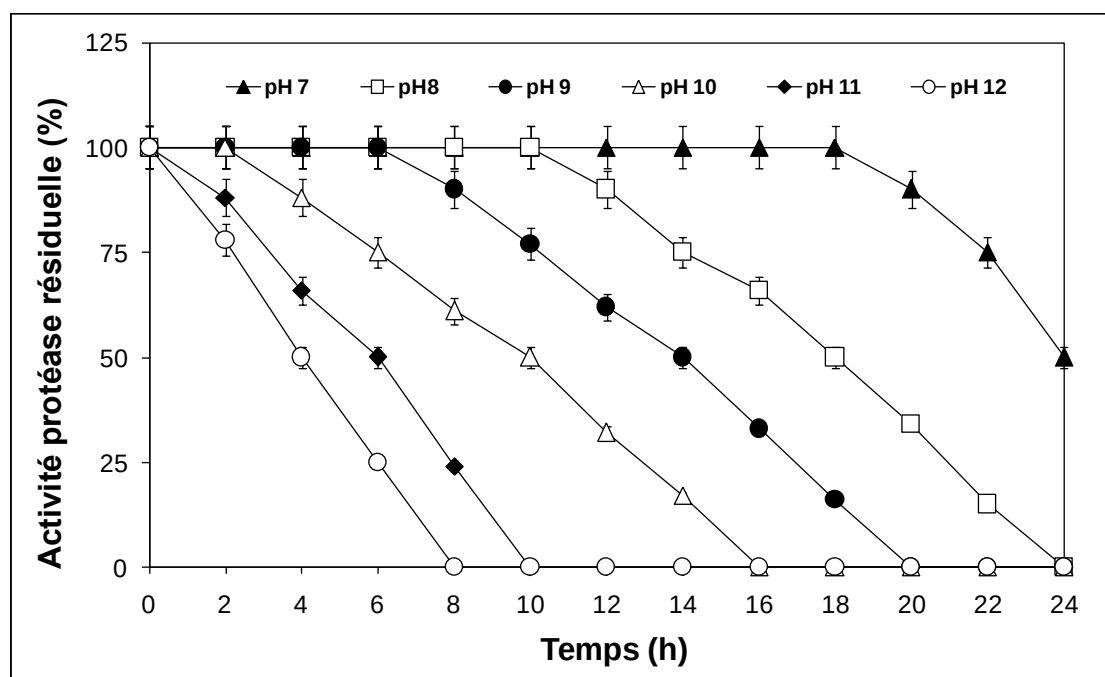


Figure IV.2.5 : Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme SAPHM.

L'ensemble des résultats de la stabilité du SAPHM est porté sur la figure IV.2 .5. On note que la protéase SAPHM semble être pratiquement stable à des pH de 7 à 11, puisqu'elle montre des activités résiduelles de l'ordre de 100 %. De part et d'autre des pH 9 et 12, la stabilité diminue pour atteindre 75 et 50 %, respectivement.

Parmi ces résultats, on conclue que la protéase SAPHM est une enzyme de nature alcaline. Ces résultats sont en faveur d'une protéase qui pourrait être appliquée dans la détergence.

IV.2.2.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme

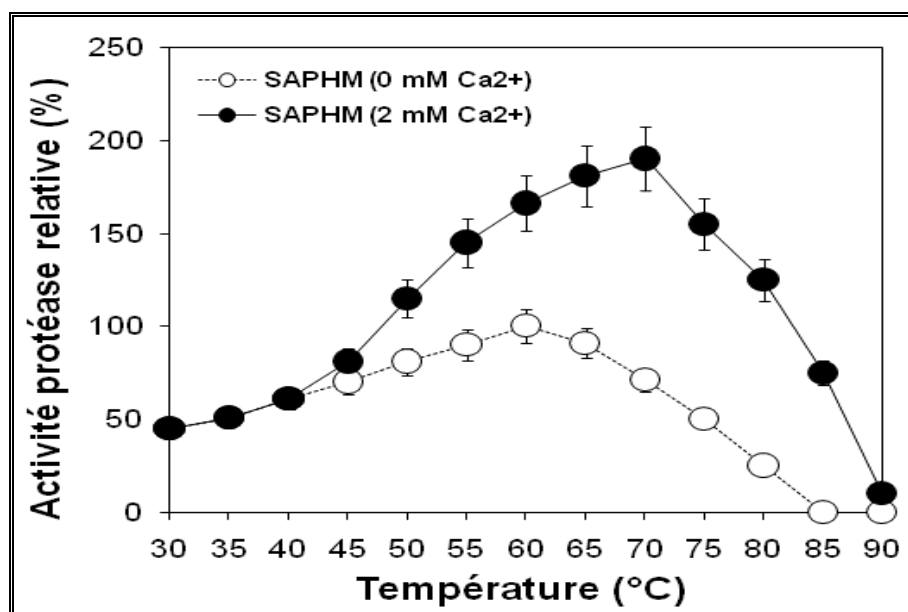


Figure IV.2.6: Effet de la température sur l'activité de la protéase SAPHM.

Plusieurs travaux ont montré que la thermostabilité des enzymes pourrait être améliorée par l'addition de certains ions tels que les ions Ca^{2+} , qui sont connus comme éléments stabilisateurs de plusieurs enzymes aux températures élevées [217, 246, 274-276].

On remarque que pour des températures inférieures à 55 °C, les activités relatives sont comparables en absence ou en présence de CaCl_2 . Cependant, pour des températures supérieures à 45 °C, le calcium à une concentration optimale de 2 mM améliore l'activité protéolytique. En absence de calcium, l'optimum est observé pour une température de 60 °C, alors qu'en présence de calcium, l'activité optimale est déplacée à 70 °C. À cette température, l'activité relative est de 190 % quand le calcium est ajouté, et elle n'est que de 71 % en son absence. Ceci peut être expliqué par la tendance des protéases à subir une autoprotéolyse à des températures élevées [277] et suggère fortement que le calcium à 2 mM est nécessaire pour la thermoactivité de l'enzyme.

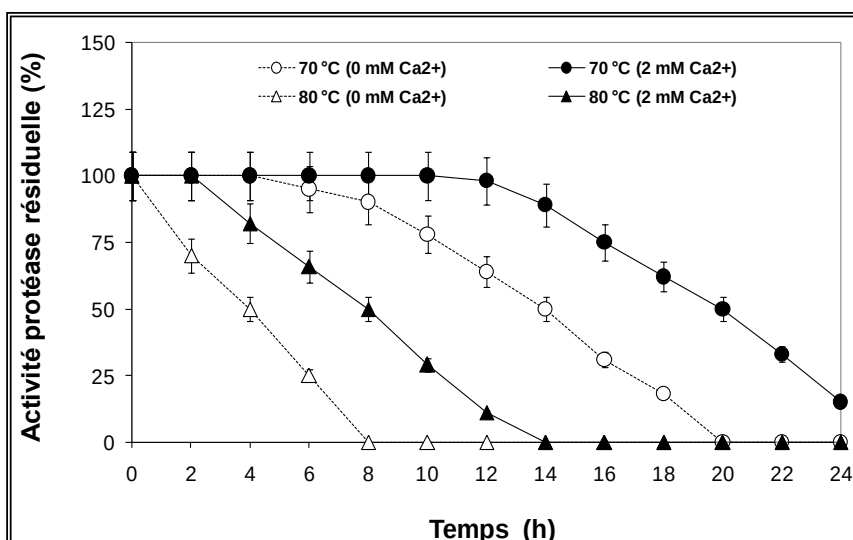


Figure IV.2.7 : Etude de la thermostabilité de l'enzyme SAPHM.

L'étude de la thermostabilité en absence des ions Ca^{2+} a montré que la SAPHM possède des temps de demi-vie qui diminuent avec l'augmentation de la température. Ces valeurs augmentent avec l'ajout de 2 mM Ca^{2+} ; ceci prouve l'implication de ces ions divalents dans l'amélioration de la thermostabilité de la SAPHM. En effet, les temps de demi-vie de la SAPHM à 70 et 80 °C sont respectivement de 14 et 4 h en absence de Ca^{2+} . Alors qu'en présence de 2 mM de Ca^{2+} , ces temps de demi-vie sont respectivement de l'ordre de 20 et 8 h.

L'amélioration de la thermostabilité en présence de Ca^{+2} pourrait être expliquée par le fait que la fixation de ces ions offre à l'enzyme une structure plus rigide qui résiste à la dénaturation thermique ou à l'autoprotéolyse [278, 279]. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude de la subtilisine de *Bacillus licheniformis*, en présence de concentrations croissantes de calcium. Les résultats ont montré que lorsque le CaCl_2 passe de 0,1 à 100 mM, le temps de demi-vie à 65 °C est multipliée par 100, il est passé de 2 à 200 min [72]. De plus, Haddar et al. [280] ont rapporté que la présence de CaCl_2 à une concentration de 2 mM augmente le temps de demi-vie de la protéase alcaline de *B. mojavensis* A21 de 5 à 20 min à 60 °C.

La protéase SAPHM est plus thermostable que celle produite par *Bacillus subtilis* SH1 qui présente un temps de demi-vie de 30 minutes à 50 °C [281] et celle de la souche de *Brevibacillus brevis* US575 qui a été affectée par des températures élevées (supérieures à 70 °C). Ainsi, l'activité résiduelle n'est que de 45 % après une incubation de 30 min à 80 °C [218], alors qu'elle est moins thermostable que la

protéase produite par *Bacillus* HUTBS71 (le temps de demi-vie est de 300 minutes à 80 °C) [282].

Par ailleurs, la thermostabilité est un phénomène qui dépend de la structure conformationnelle de l'enzyme et du microclimat où elle se trouve. En effet, le mécanisme d'inactivation des protéases produites par les différentes souches étudiées pourrait être expliqué par la destruction des liaisons non covalentes, responsables du maintien de la conformation active [283]. Ce dépliement est généralement irréversible, suivi d'une agrégation et une précipitation de l'enzyme lorsqu'elle est soumise à des températures élevées [284].

IV.2.2.3. Effet des inhibiteurs et des agents réducteurs spécifiques de protéases sur l'activité de SAPHM

Tableau IV.2.3: Effet de différents inhibiteurs et des agents réducteurs sur la stabilité de la SAPHM.

Inhibiteur/agent réducteur	Spécificité	Concentration	Activité protéase résiduelle (%)
Témoin		–	100 ± 2,5
PMSF	Inhibiteurs spécifiques des protéases à sérine	5 mM	0 ± 0,0
DFP		2 mM	0 ± 0,0
SBTI	Inhibiteur spécifique de la trypsine	2 mg/mL	104 ± 2,6
TLCK	Inhibiteurs de protéase trypsine-like	1 mM	105 ± 2,5
TPCK	Inhibiteur spécifique de la chymotrypsine	1 mM	102 ± 2,5
Benzamidine	Inhibiteur compétitive des protéases à sérine	10 mM	99 ± 2,5
<i>LD</i> DTT	Agent réducteurs des ponts S-S (disulfures) et Inhibiteurs de protéases à cystéine ou à groupement thiol	10 mM	95 ± 2,4
2-ME		5 mM	99 ± 2,5
DTNB		10 mM	97 ± 2,5
NEM		2 mM	102 ± 2,5
Iodoacétamide		5 mM	98 ± 2,5
Leupeptine	Inhibiteurs des acides aspartiques	50 µg/mL	101 ± 2,5
Pepstatine A		2 µg/mL	95 ± 2,4
EDTA	Inhibiteurs des métalloprotéases	10 mM	85 ± 2,0
EGTA	Inhibiteurs des métalloprotéases	2 mM	89 ± 2,2

Nous nous sommes intéressés à déterminer le résidu clé impliqué dans l'activité catalytique de la protéase SAPHM. Pour cela on a testé l'effet de plusieurs réactifs chimiques spécifiques sur l'activité de cette protéase. Les résultats présentés dans le tableau IV.2.3 permettent de tirer les conclusions suivantes:

- Le PMSF et le DFP inhibent complètement l'activité protéolytique. Ceci confirme que la protéase SAPHM appartient à la famille des subtilisines ; d'où la nomination de l'enzyme « **SAPHM** : **Serine Alkaline Protease from Hassi Messaoud**».
- Les inhibiteurs à thiol (2-ME, DTNB, NEM, EPNP et Iodoacetamide), les inhibiteurs à acide aspartique (Leupeptin et Pepstatin A), les inhibiteurs de la chymotrypsine (TPCK, TLCK), les inhibiteurs de la trypsine (SBTI), les Inhibiteurs compétitifs de la trypsine (Benzamidine) et les inhibiteurs à cystéine n'ont aucun effet sur l'activité protéolytique de cette enzyme.
- Par contre, on remarque une légère diminution de l'activité en présence des inhibiteurs de métallo-protéases (EDTA et EGTA). Ceci suggère qu'un facteur métallique n'est pas impliqué dans l'activité protéolytique de cette enzyme. De nombreux autres travaux ont mis en évidence l'effet de l'EDTA sur l'activité des protéases de la famille des subtilisines [280, 285-287].

À la lumière de ces résultats, nous pouvons déduire que l'enzyme SAPHM est un membre de la famille des protéases à sérine.

IV.2.2.4. Effet des ions métalliques sur l'activité de SAPHM

Tableau IV.2.4 : Effet des ions métalliques sur la stabilité de la SAPHM.

Ion métallique (2 mM)	Activité protéase résiduelle (%)
Témoin	100 ± 2,5
Ca²⁺ (CaCl₂)	477 ± 7,7
Mg²⁺ (MgCl₂)	210 ± 3,5
Mn²⁺ (MnCl₂)	120 ± 2,8
Zn²⁺ (ZnCl₂)	101 ± 2,5
Co²⁺ (CoCl₂)	98 ± 2,5
Cu²⁺ (CuSO₄)	80 ± 1,8
Ba²⁺ (BaCl₂)	50 ± 1,1
Fe²⁺ (FeSO₄)	35 ± 0,8
Ni²⁺ (NiCl₂)	0 ± 0,0
Cd²⁺ (CdCl₂)	0 ± 0,0
Hg²⁺ (HgCl₂)	0 ± 0,0

Plusieurs travaux ont montré que l'activité enzymatique de certaines protéases de microorganismes exige la présence de certains ions, tels que le calcium ou le magnésium [218, 288].

D'après les résultats de tableau, on note que le Mn²⁺, Mg²⁺ et Ca²⁺, activent l'enzyme avec une augmentation considérable de 120, 210 et 477 % de l'activité enzymatique, respectivement. Ces observations laissent supposer que ces ions divalents interviennent dans la stabilisation de l'enzyme. Ces ions métalliques exercent un effet protecteur sur l'enzyme contre la dénaturation thermique, jouant ainsi un rôle essentiel dans le maintien de sa conformation active à une température plus élevée [98]. Le rôle du Ca²⁺ est probablement lié à la stabilisation de la forme

active du SAPHM et à la préservation de sa structure contre l'autolyse. Odenwald et *al.* [289] ont montré que les ions Ca^{2+} jouent un rôle important dans la stabilité des protéases à sérine. Ces enzymes possèdent au moins un site de fixation pour le calcium.

En plus à l'exception des ions bivalents (Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} et Fe^{2+}) les ions monovalents, l'activité protéolytique n'est pas affectée. Par contre, elle est inhibée respectivement par : Ni^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+} à des concentrations de 2 mM. Des résultats similaires ont été observés avec des alcalines protéases produites par des souches microbiennes [218, 256, 257, 259, 276, 290-292].

IV.2.2.5. Effet des polyols sur la thermostabilité de SAPHM

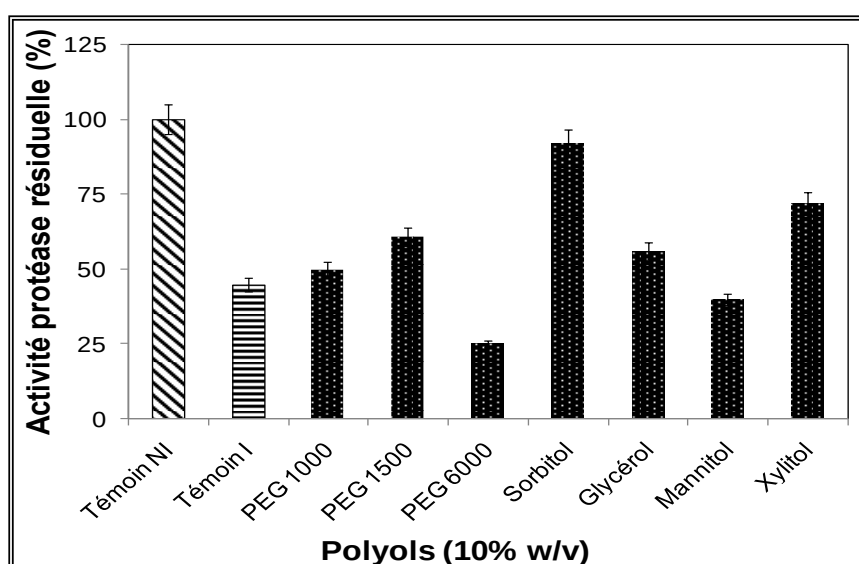


Figure IV.2.8 : Effet des polyols sur la thermostabilité de l'enzyme SAPHM.

La thermostabilité des enzymes peut être améliorée par modification de leur micro-environnement par addition de sucres ou de polyols [291, 293]. L'effet protecteur des polyols est lié à leurs groupements hydroxyles. L'ajout de certains polyols évite la dénaturation des molécules enzymatiques en renforçant les interactions hydrophobes à l'intérieur des molécules protéiques.

Ainsi, nous avons étudié l'influence de polyols sur la stabilité de la protéase SAPHM. Les activités résiduelles sont de 92, 72, 61, 56, 50, 40, et 25 % pour sorbitol, xylitol, PEG 1500, glycérol, PEG 1000, mannitol, et PEG 6000,

respectivement (figure IV.2.8). Ces activités ont été déterminées à pH 10 et à 70 °C, par rapport à deux témoins réalisés en absence de polyols (I) et non incubé (NI).

Jaouadi et *al.* [256] ont montré que le glycérol, le mannitol et le polyéthylène glycol améliorent la stabilité thermique de la protéase SAPB. L'addition du sorbitol à 3 M à 60 °C augmente approximativement, de 2 fois la thermostabilité de la protéase produite par *Bacillus cereus* BG1 [246].

En effet, l'amélioration de la stabilité thermique par l'ajout des polyols est due probablement au renforcement des interactions hydrophobes à l'intérieur des molécules enzymatiques qui deviennent plus résistantes à l'inactivation thermique [294].

IV.2.2.6. Effet combiné du calcium et de sorbitol sur la thermostabilité de l'enzyme SAPHM

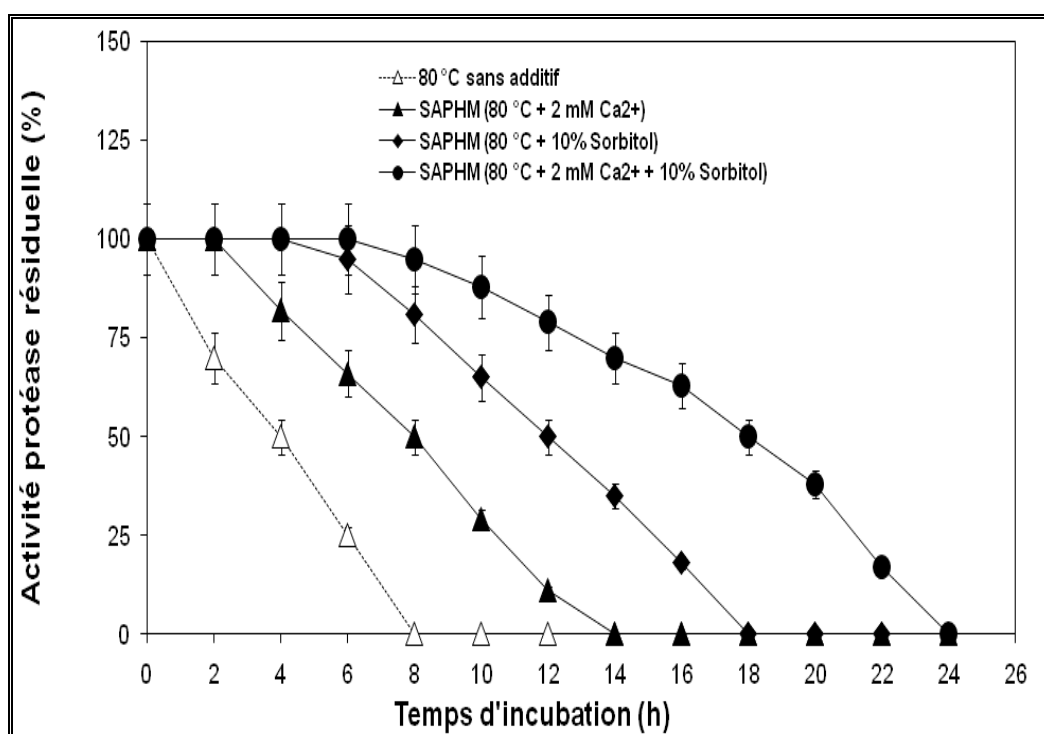


Figure IV.2.9: Effet combiné du calcium et de sorbitol sur la thermostabilité de l'enzyme SAPHM.

Le temps de demi-vie (en min) à 80 °C de l'enzyme non incubée, déterminée en absence du sorbitol (10 %) et de CaCl₂ est considérée comme contrôle (figure IV.2.9).

IV.2.2.7. Etude de la spécificité et des propriétés cinétiques de la SAPHM

a) Détermination de la spécificité de SAPHM vis-à-vis des substrats

Tableau IV.2.3: Spécificité de la protéase SAPHM vis-à-vis des substrats.

Substrat	Concentration	Absorbance (nm)	Activité protéase relative (%)
Protéine naturelle			
Caséine	30 g/L	280	100 ± 2,5
Albumine	30 g/L	280	88 ± 2,1
Gélatine	30 g/L	280	32 ± 1,2
Ovalbumine	30 g/L	280	19 ± 0,7
Kératine	30 g/L	280	2 ± 0,1
Protéine modifié			
Azo-caséine	25 g/L	440	100 ± 2,5
Albumine azure	25 g/L	440	55 ± 1,5
Kératine azure	25 g/L	440	3 ± 0,1
Collagène de type I	10 mg/mL	490	0 ± 0,0
Collagène de type II	10 mg/mL	490	0 ± 0,0
Ester			
BTEE	10 mM	253	100 ± 2,5
ATEE	10 mM	253	92 ± 2,3
BAEE	10 mM	253	0 ± 0,0
BCEE	10 mM	253	0 ± 0,0
TAME	10 mM	253	0 ± 0,0
Peptide synthétique			
FAAF	5 mM	410	100 ± 2,5
AAPF	5 mM	410	98 ± 2,5
AAVA	5 mM	410	90 ± 2,3
AAPM	5 mM	410	81 ± 2,1
AAPL	5 mM	410	70 ± 1,8
AAF	5 mM	410	51 ± 1,6
AAA	5 mM	410	42 ± 1,4
AAL	5 mM	410	33 ± 1,2
AAV	5 mM	410	25 ± 1,1
AAI	5 mM	410	17 ± 1,0
YLV	5 mM	410	10 ± 0,5

La spécificité de clivage de la protéase SAPHM vis-à-vis de divers substrats protéiques a été aussi étudiée. Cette étude montre que la caséine et la caséine azure sont les plus efficacement hydrolysées par la protéase SAPHM parmi les substrats protéiniques naturelles et modifiés testés (tableau IV.2.3).

En considérant l'activité d'hydrolyse de la caséine et la caséine azure à 100 %, les activités relatives étaient respectivement de 88 et 32 % sur l'albumine et la gélatine. Toutefois, nous avons remarqué une activité relative faible dans le cas de l'ovalbumine et de kératine. Aucune activité collagénase n'a été détectée sur le collagène de type I ou II.

La spécificité de clivage la protéase SAPHM vis-à-vis de divers esters et substrats synthétiques a été également étudiée. En effet, si un résidu de Tyr se trouve à la position P1 (le premier résidu d'acide aminé à l'extrémité N-terminale de la liaison peptidique) tel qu'il est le cas pour les esters BTEE et ATEE, la protéase SAPHM hydrolyse les substrats ester avec 100 % de BTEE suivi par 92 % de ATEE.

Cependant, si au niveau de la position P1 de l'ester se trouve un résidu d'Arg, ce qui est le cas pour le BAEE, BCEE et le TAME, la SAPHM ne montre aucune activité sur ces trois substrats.

La protéase SAPHM hydrolyse quelques substrats peptidiques avec une efficacité de 100 % sur Suc-Phe-(Ala)₂-Phe-pNA suivie par Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA (98 %), Suc-(Ala)₂-Val-Ala-pNA (90 %), Suc-(Ala)₂-Pro-Met-pNA (81 %), Suc-(Ala)₂-Pro-Leu-pNA (70 %), Suc-(Ala)₂-Phe-pNA (51 %) et Suc-(Ala)₂-Val-pNA (25 %).

b) Détermination des paramètres cinétiques

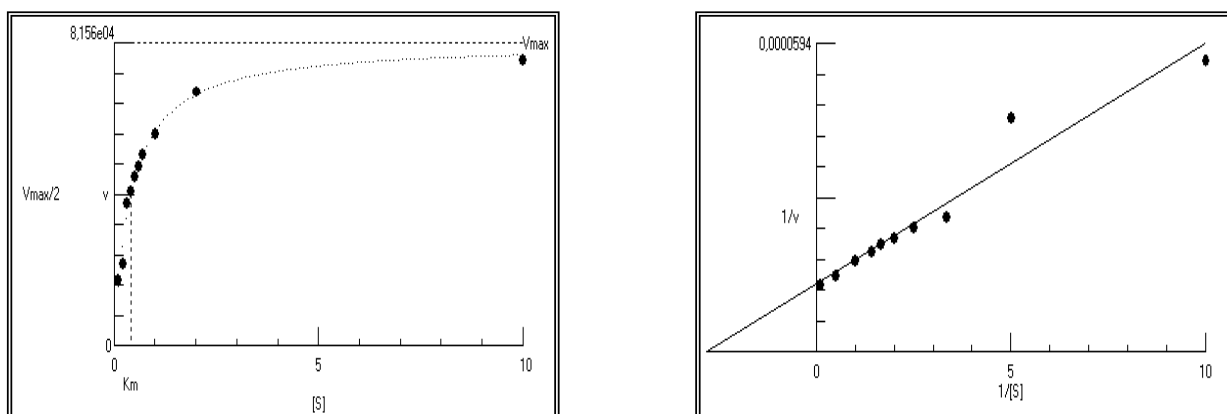


Figure IV.2.10: Représentations graphiques de Michaelis-Menten (à gauche) et Lineweaver–Burck (à droite) de l'enzyme SAPHM.

Dans le but de mener cette étude cinétique comparative, nous avons utilisé les trois enzymes : la SAPHM, l'Alcalase Ultra 2,5 L et la Thermolysine.

Par ailleurs, en remettant la vitesse initiale de chaque réaction enzymatique en fonction de concentrations croissantes en caséine, nous avons remarqué que les trois protéases la SAPHM (figure à gauche), l'Alcalase Ultra 2,5 L et la Thermolysine (Données non présentées) adoptent une cinétique classique Michaelienne.

Par la suite nous avons tracé les représentations graphiques linéaires de Lineweaver–Burk (doubles inverses : $1/V$ en fonction de $1/[S]$) des trois protéases la SAPHM (figure à droite), l'Alcalase Ultra 2,5 L et la Thermolysine (Données non présentées).

Tableau IV.2.4: Détermination des paramètres cinétiques de la protéase SAPHM.

Substrat	Enzyme	K_m (mM)	V_{max} ($\times 10^3$ U/mg)	k_{cat} ($\times 10^3$ min $^{-1}$)	k_{cat}/K_m ($\times 10^3$ min $^{-1}$ mM $^{-1}$)
Caséine	SAPHM	0,453 $\pm$ 0,01	81,560 $\pm$ 583	54,373	120,029
	Alcalase Ultra 2,5 L	0,641 $\pm$ 0,02	24,915 $\pm$ 365	16,610	25,913
	Thermolysine	0,738 $\pm$ 0,05	17,126 $\pm$ 114	11,417	15,470

Ceci nous a amené à déduire les valeurs des paramètres cinétiques : constante de dissociation ou de Michaelis-Menten (K_m) et vitesse maximale (V_{max}), constante catalytique (k_{cat}) et l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) correspondante à chaque enzyme moyennant le programme Hyper32 (tableau IV.2.4).

Les résultats de la cinétique, montre que les valeurs des paramètres cinétiques de l'enzyme SAPHM sont de $K_m = 0,453$ et $V_{max} = 81560$ sur caséine. Par ailleurs, k_{cat} est de 54373 et k_{cat}/K_m est de $120029 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ sur caséine. Nous avons également déterminé les valeurs des paramètres cinétiques des deux enzymes commerciales Alcalase Ultra 2,5 L et la Thermolysine. Ainsi, l'efficacité catalytique, sur caséine, de la protéase SAPHM est de 2,33 et de 3,90 fois par rapport à l'Alcalase Ultra 2,5 L et la Thermolysine, respectivement.

IV.2.4. Conclusion

Cette investigation a visé la purification de l'enzyme SAPHM et la caractérisation biochimique de son activité protéasique. Les techniques de purification utilisées dans ce travail, ont permis d'aboutir à une solution enzymatique homogène comme il a été prouvé par FPLC, HPLC, native PAGE, SDS-PAGE et MALDI-TOF/MS. Par rapport au surnageant de culture, la SAPHM a été purifiée environ 42,5 fois avec un rendement d'environ 34 %. L'étude de l'enzyme purifiée, a montré que l'activité spécifique est de 81730 U/mg, sur la caséine azure, que la température optimale d'activité est de 70 °C et que le pH optimum est de 10. Nous avons montré aussi que la SAPHM peut être classée comme étant un membre de la famille des subtilisines.

Chapitre IV.3

Caractérisation moléculaire de la protéase SAPHM

IV.3.1. Introduction

L'étude détaillée d'une enzyme donnée nécessite sa caractérisation moléculaire. Ceci passe généralement par une étape incontournable de clonage afin de déterminer la séquence du gène correspondant pour en déduire la séquence en acide aminé de l'enzyme, suivi de son expression et de construire éventuellement des souches sur exprimant cette enzyme. De plus, cette caractérisation moléculaire offre indirectement l'avantage d'améliorer éventuellement ses performances suite à une étude des relations structure fonction.

Afin d'exprimer une enzyme bactérienne, on utilise généralement comme hôte d'expression soit *E. coli*, soit *Bacillus subtilis* ou dans certains cas la levure, plus particulièrement *Pichia pastoris*. Le système d'expression *E. coli* est un système de première intention. Ceci est justifié par la simplicité de sa manipulation, la parfaite connaissance de son patrimoine génétique, la large disponibilité des outils moléculaires, la simplicité de ses milieux de culture et sa croissance rapide. Cependant, l'expression dans *E. coli* est sujette dans plusieurs cas de l'agrégation des protéines recombinantes sous forme de corps d'inclusion insolubles et inactifs.

Au fait, il n'y a pas de système d'expression universel susceptible d'être utilisé pour toutes les applications biotechnologiques. Chaque système possède un certain nombre d'avantages et d'inconvénients et pour chaque protéine recombinante il faut tracer les différentes stratégies conduisant au clonage et à une production optimale.

Au cours de ce chapitre, nous rapportons l'expression hétérologue, du gène *sapHM* codant pour la protéase SAPHM de la souche K7A de *B. licheniformis* dans le système *E. coli* afin de produire cette protéase à grande échelle et de s'investir d'avantage dans l'amélioration des performances de cette enzyme pour des éventuelles perspectives industrielles.

IV.3 .2. Clonage et séquençage du gène *sapHM* codant la SAPHM

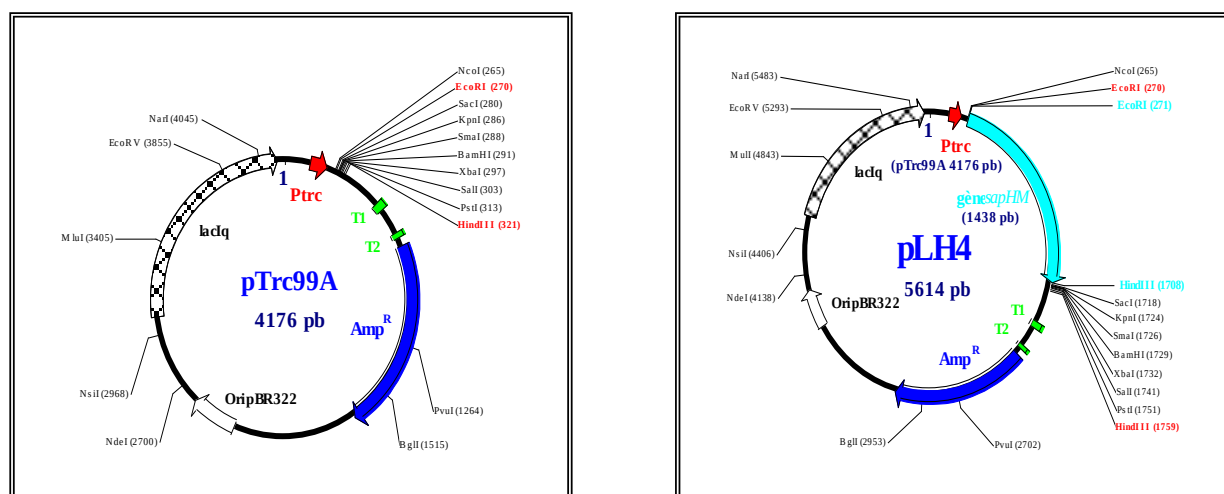


Figure IV.3.1: Carte de restriction du vecteur d'expression chez *E. coli* ptrc99A (4176 pb) et du plasmide pLH4 (5614 pb). Le vecteur ptrc99A possède un site de clonage multiple contenant les sites *EcoRI* et *HindIII*.

Dans le but de déterminer la séquence complète de l'enzyme mature, nous avons amplifié par PCR, la partie du gène qui code pour la protéase mature à partir de l'ADN génomique de la souche K7A de *Bacillus licheniformis* en tant que matrice. Les oligonucléotides utilisés (Oligo F-LH et Oligo R-LH) ont été déterminés en se basant sur les séquences nucléotidiques des gènes *sapB* codant pour la protéase alcaline SAPB de *Bacillus pumilus* CBS [260], *aprP* codant pour la protéase alcaline DHAP de *Bacillus pumilus* TYO-67 [295] et du gène *AP* codant pour la protéase alcaline DHAP de *Bacillus pumilus* UN-31-C-42 [296]. Le fragment amplifié, présente une taille approximativement de 1,4 Kb comme attendue. Ce fragment a été par la suite cloné dans DH5α d'*E. coli* en utilisant le vecteur de clonage pCR-Blunt donnant naissance au plasmide pLH4 (figure IV.3.1).

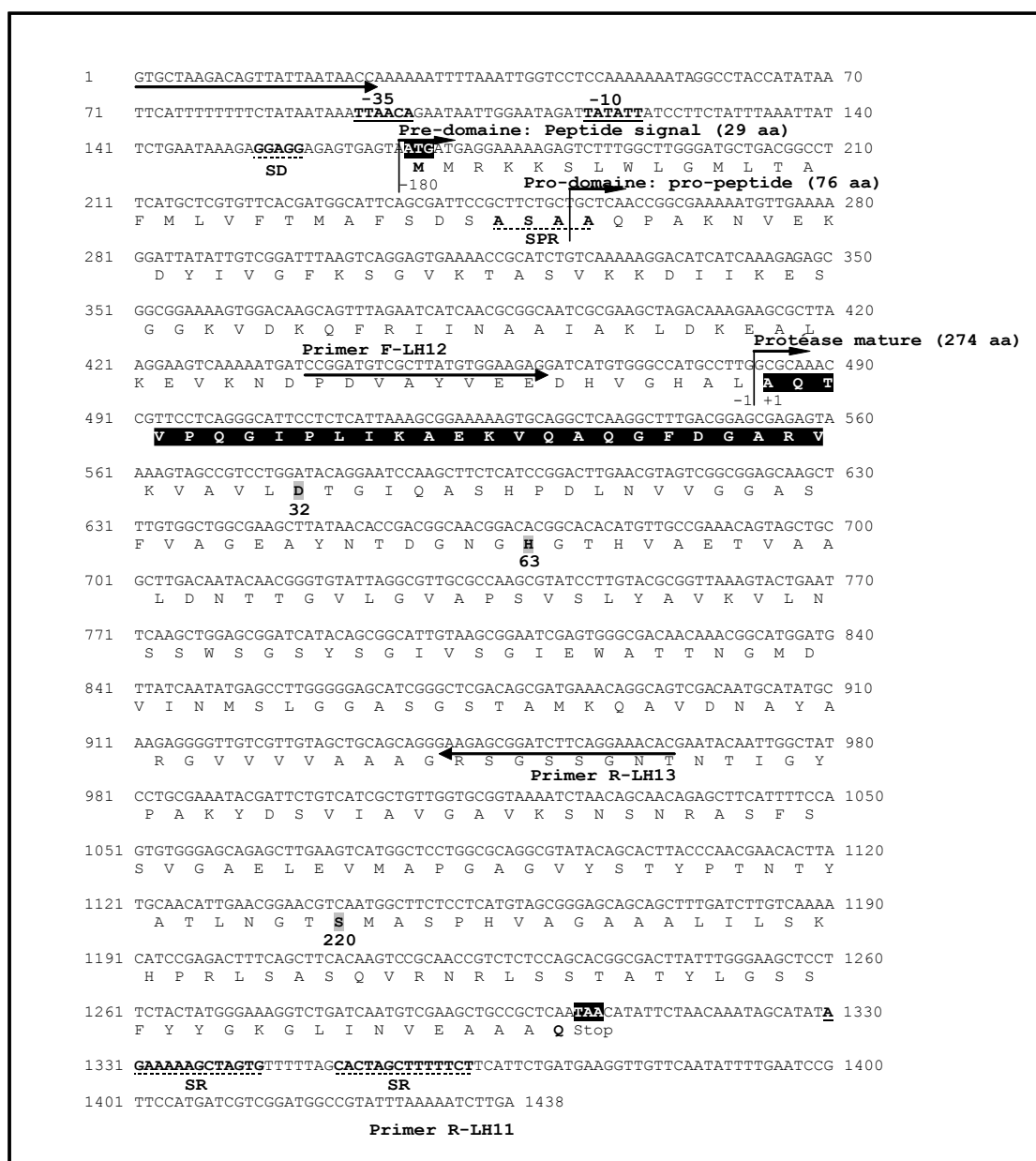


Figure IV.3.2: Séquence du gène *sapHM*.

Le séquençage de la totalité du gène (nommé *sapHM*) codant pour la SAPHM mature a été effectué sur le plasmide recombinant (pLH4) moyennant les techniques de séquençage décrites dans la partie Matériel et Méthodes. Cette séquence a été réalisé en utilisant d'une part les oligos JB2 et 3 comme amorces externes et oligos LH3 et LH4 comme amorces internes. Ces dernières ont été testées par le programme BLAST du site NCBI pour écarter tout risque d'hybridation non spécifique. La séquence nucléotidique complète (1438 pb) a été déposée dans la base de données GENBank/DDBJ/EMBL sous le numéro d'accension : **MG753560**.

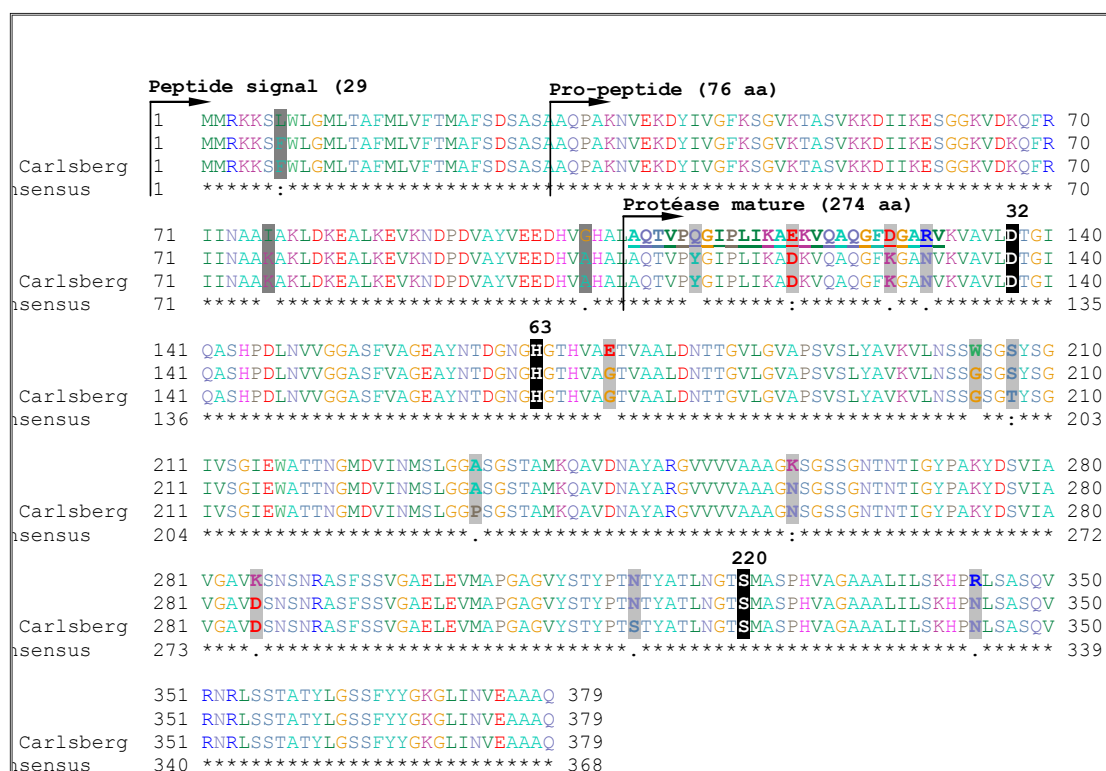


Figure IV.3.3: Alignement de séquence de la SAPHM.

L'analyse de la séquence nucléotidique ainsi obtenue nous a permis d'identifier une phase de lecture ouverte de 1137 pb qui code pour une pré-pro-protéase, correspondant à 379 aminoacides, organisée en trois régions. Moyennant le programme SignalP, version 3.0 de prédiction de séquence signal putative [297, 298], nous avons révélé la présence d'un peptide signal de 29 Aa du résidu de Met1 jusqu'au résidu d'Ala29. Ce peptide impliqué dans la sécrétion de l'enzyme est composé d'une courte séquence N-terminale chargée positivement (3 Lys) suivie d'un large domaine central hydrophobe d'environ 20 Aa et d'un domaine C-terminal contenant un site de clivage (Ala29-Asn30-Ala31) reconnu par le peptide signal peptidase.

Nous avons aussi identifié une séquence de 76 Aa du résidu d'Asn30 jusqu'au résidu de Tyr108, ce qui correspond à la séquence du pro-peptide. Par homologie à d'autres subtilisines, nous méditons que ce pro-domaine jouerait un rôle d'inhibiteur compétitif pour l'enzyme en plus de son rôle primordial dans le repliement correct de l'enzyme. Ce rôle de chaperonne intramoléculaire se fait *via* son domaine-IMC et qui par la suite sera auto-protéolysé pour générer la protéase mature active de 274 Aa, allant du résidu d'Ala109 jusqu'au résidu d'Asn383 et ayant une masse moléculaire

prédite, moyennant le serveur Expasy, de 30325.12 Da. De plus, nous avons repéré la triade catalytique ; D32, His64 et Ser221 chez la SAPHM mature correspondant aux résidus conservés (Signature des subtilases) : 28-39, 64-75 et 216-226, caractéristique des protéases à sérine [299].

IV.3.3. Surexpression et localisation cellulaire de la SAPHM

Tableau IV.3.1: Comparaison de la surexpression du gène *sapHM* sous le contrôle de différents promoteurs.

Souche	Construction	Activité Spécifique (U/mg)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS /pLH4	PT7- <i>sapHM</i>	750

Dans le plasmide pLH4, le gène *sapHM* a été cloné sous la dépendance du promoteur PT7. Afin d'assurer l'expression maximale de ce gène à partir de ce promoteur, le plasmide pLH4 a été transféré dans la souche BL21(DE3) pLysS contenant le gène codant à l'ARN polymérase T7. D'autre part le gène *sapHM* a été aussi placé sous le contrôle d'autres promoteurs à savoir : *Plac* et *Ptac*, dans les vecteurs pUT57 et pTrc99A, pour obtenir respectivement les nouvelles constructions pLH4 (annexe 6). La comparaison des niveaux d'expression de cette protéine a été évaluée via la détermination des activités spécifiques issues de chaque construction. A la lumière des résultats obtenus (tableau IV.3.1), le promoteur *Ptac* (plasmide pLH4) semble être le plus adéquat pour une meilleure expression de la SAPHM (figure IV.3.4).

L'étude de l'activité recombinante (rSAPHM), a montré qu'elle s'exprime efficacement au niveau de l'espace extracellulaire d'*Escherichia coli*.

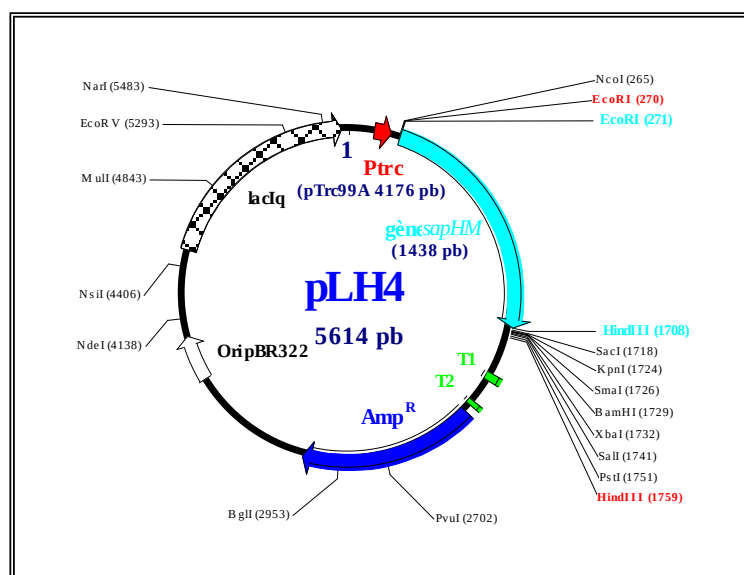


Figure IV.3.4: Carte de restriction du plasmide pLH4 (5614 pb).

La construction *P_{tac}-sap_{HM}* (pLH4) a servi à la production de l'enzyme recombinante afin de la purifier à homogénéité.

IV.3.4. Conclusion

Ce chapitre a porté sur le clonage, le séquençage et l'expression hétérologue du gène *sap_{HM}* codant pour la protéase SAPHM produite par la souche K7A de *Bacillus licheniformis* dans le vecteur d'expression pTrc99A chez la souche de BL21(DE3) pLysS d'*Escherichia coli*. Le plasmide pLH4 est le plus adéquat pour une meilleure expression de la SAPHM.

Les caractéristiques intéressantes de la SAPHM nous permettent de conclure que cette enzyme est convenable pour des éventuelles applications industrielles en synthèse peptidique et détergence. Un tel aboutissement devrait nous inciter à pousser nos études ultérieures vers la compréhension des relations structure-fonctions de la SAPHM, ce qui constituera un apport notable pour les tentatives d'amélioration des propriétés enzymatiques.

Chapitre IV.4

Potentialités d'applications industrielles de la protéase SAPHM : excellente compatibilité de la synthèse peptidique et aux détergents de lavage

Aujourd'hui, l'utilisation de détergents à base de protéase alcaline est préférée à celle conventionnelles synthétiques. C'est en partie à cause de leurs meilleures propriétés de nettoyage, de l'efficacité des performances excellentes à des températures de lavage moindre et les conditions de retrait des saletés plus sûres à la santé. Typiquement, une protéase détergente doit être active, stable et compatible avec l'environnement alcalin rencontré dans les conditions agressives de lavage (pH 9-11, température de 20 à 60 °C, et des concentrations élevées du sel, d'eau de javel et des surfactants).

Au cours de ces dernières années, les enzymes sont de plus en plus utilisées en présence des solvants organiques. L'addition de ces derniers, permet de mieux comprendre le mécanisme réactionnel de certaines enzymes, de transformer des réactions d'hydrolyse en réactions de synthèse et de réaliser, dans certains cas, plus efficacement des réactions enzymatiques. Les protéases sont des enzymes susceptibles d'hydrolyser les liaisons peptidiques, elles sont également capables de catalyser la synthèse de liaisons peptidiques [300]. Elles ont été appliquées avec succès dans de nombreuses réactions de synthèse de dipeptides et d'oligopeptides [258]. En fait, ces réactions d'inversion d'hydrolyse se déroulent en présence de solvants organiques qui diminuent l'activité de l'eau, favorisant ainsi la synthèse par rapport à l'hydrolyse.

IV.4.1. Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité des protéases SAPHM et Thermolysine

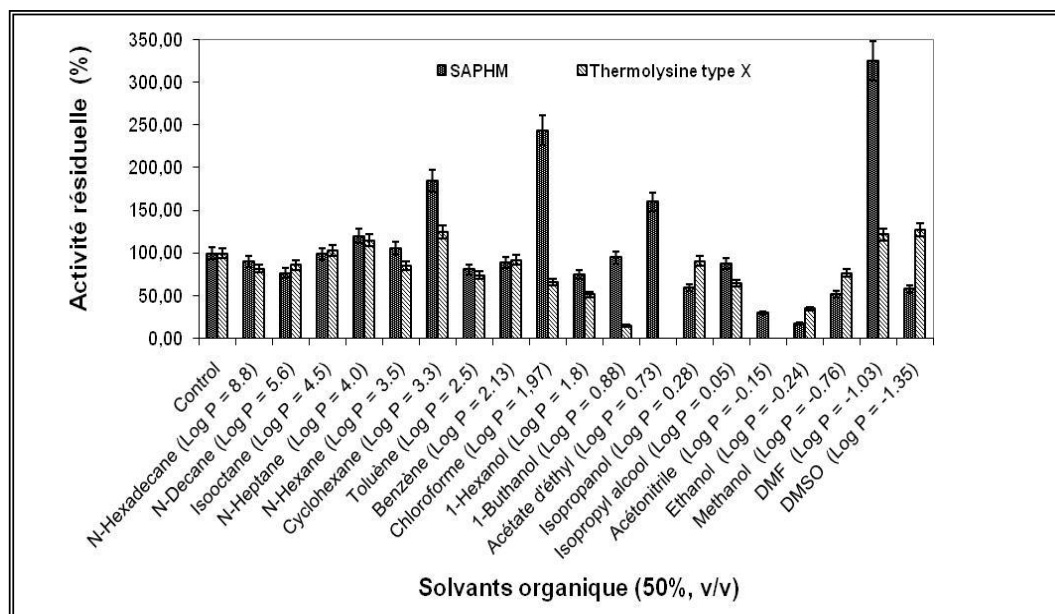


Figure IV.4.1: Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité enzymatique des deux protéases SAPHM et Thermolysine. L'activité résiduelle a été déterminée après incubation de 72 h à 40 °C sous agitation à 200 rpm.

Les résultats présentés sur la figure IV.4.1 montrent que l'activité enzymatique est considérablement réduite lorsque l'enzyme est incubée en présence de DMF. Par ailleurs, la protéase SAPHM présente également une stabilité remarquable, par rapport à l'enzyme commerciale la Thermolysine du *Bacillus thermoproteolyticus*, en présence de divers solvants organiques à 50 % (v/v).

En effet, les activités relatives et résiduelles de la protéase SAPHM sont améliorées par rapport au témoin, en présence de DMF, de Chloroforme, de Cyclohexane, d'Acétate d'éthyle, de n-heptane et de n-hexane qui atteint respectivement 325, 244, 185, 160, 120 et 106 % (activité résiduelles). Cette augmentation de l'activité est probablement due à un changement de conformation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme active. Ainsi, le DMSO, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et le 1-butanol pourraient être utilisés dans des réactions de synthèse de peptides.

À la lumière de ces résultats, il serait très intéressant de tester la préparation enzymatique de la protéase SAPHM dans des réactions de synthèse puisqu'elle est

stable ou même activée en présence de certains solvants organiques comme d'autres protéases bactériennes [301-303].

IV.4.2. Etude de l'effet des additifs de détergent sur la stabilité de la protéase SAPHM

Tableau IV.4.1: Effet des additifs synthétiques testés sur la stabilité de la SAPHM.

Additif	Concentration	Activité protéase résiduelle (%)
Témoin	-	100
Tween 20	5% (v/v)	101
Tween 80	5% (v/v)	105
Triton X-100	5% (v/v)	112
SDS	2% (v/v)	86
Urée	10% (v/v)	89
H ₂ O ₂	10% (v/v)	141
Perborate de sodium	1% (w/v)	70
STPP	5% (w/v)	77
TAED	5% (w/v)	75
CTAB	20 mM	109

Une excellente protéase détergente doit être également active et stable en présence de certains composants des détergents [99, 304].

D'après les résultats de tableau, on constate que la SAPHM montre une stabilité variable vis-à-vis des additifs utilisés. En effet, l'enzyme SAPHM est totalement stable en présence des Tween 20 et 80 et du Triton X-100 et de H₂O₂ et du CTAB. L'activité protéolytique est considérablement affectée par le SDS. Ceci est expliqué par l'effet dénaturant du SDS suite à son pôle hydrophobe et ses propriétés ioniques.

Par exemple, l'enzyme retient 75 et 105 % de son activité respectivement en présence de TAED 5 % et Tween 80 % après 1 h d'incubation. En présence d'agents oxydants, la protéase SAPHM présente une stabilité considérable, l'activité résiduelle est de 141 et 77 % en présence du H₂O₂ et du perborate de sodium, respectivement.

D'autres travaux de recherche ont montré que certaines enzymes protéolytiques présentent une stabilité importante vis-à-vis des additifs de détergents telles que la protéase à sérine alcaline de *B. pumilus* nommés SAPB qui était remarquablement stable en présence de 1 % de Tween 20, 10 % d'urée, 0,5 % de TAED, 0,5 % de perborate de sodium et 1 % de H₂O₂ [260].

IV.4.3. Stabilité de la protéase SAPHM vis-à-vis des détergents commerciaux liquides et solides testés

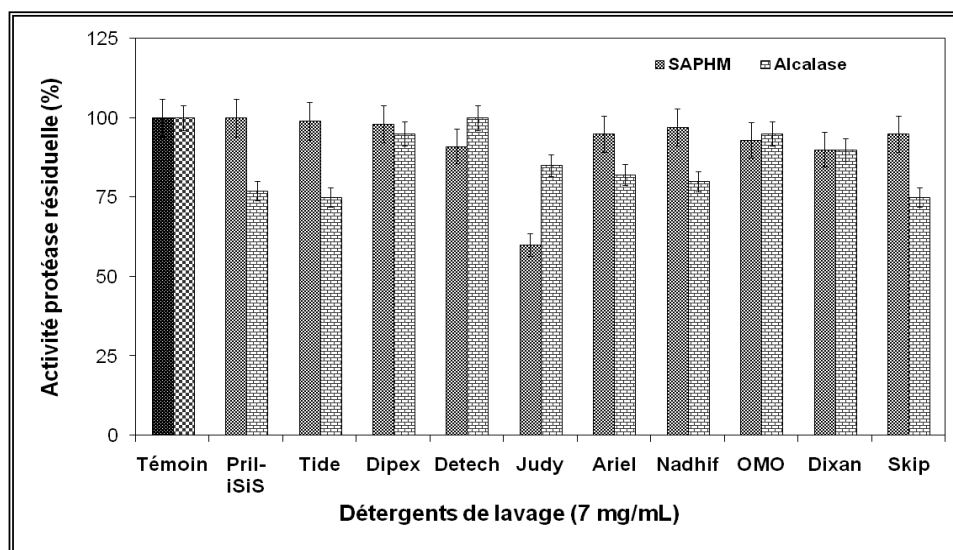


Figure IV.4.2: Etude de la stabilité de la protéase SAPHM en présence des détergents.

Les protéases sont les enzymes les plus largement utilisées dans les détergents liquides ou solides. Grâce à leur activité, elles permettent de supprimer les taches protéiques, elles dégradent les protéines en peptides et en acides aminés solubles [305]. L'intérêt de développer des protéases pour les incorporer dans les détergents est lié à la tendance actuelle d'utiliser moins de surfactants chimiques afin de préserver l'environnement. Toutefois, la protéase détergente recherchée doit être très active et stable en solution alcaline et vis-à-vis des détergents [306]. Pour cela, nous avons étudié la stabilité de la SAPHM vis-à-vis des détergents liquides et solides (figure IV.4.2).

L'analyse des résultats montre que la protéase SAPHM est stable et compatible avec les détergents liquides et solides. En effet, en présence de Pril-iSiS, l'activité résiduelle est enregistrée de 100 %. En présence de détergent Tide, Dipex, Nadhif, Ariel et Skip, OMO, Detech, et Dixan, les activités résiduelles sont enregistrées 99, 98, 97, 95, 93, 91 et 90 %, respectivement. Cependant, l'activité de

la protéase SAPHM est considérablement affectée en présence de détergent Judy pour diminuer jusqu'à 60 % respectivement après une pré-incubation d'une heure à 70 °C.

En conclusion, la protéase SAPHM semble répondre à la majorité des exigences d'une bonne protéase détergente.

IV.4. 4. Tests de performance de lavage de la SAPHM

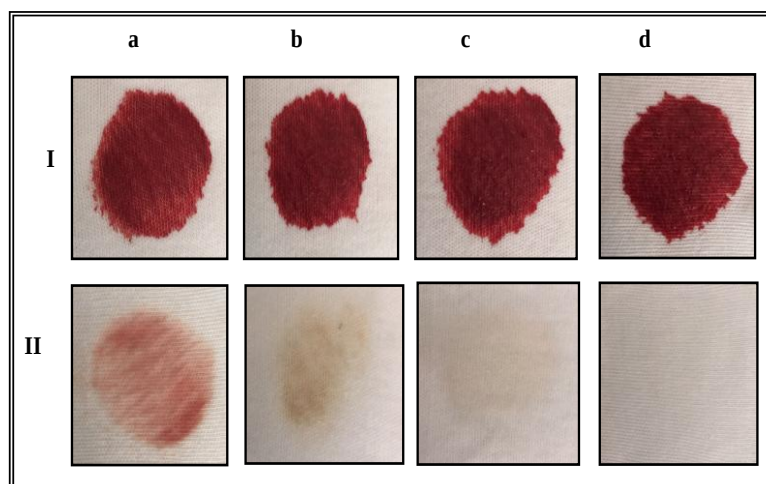


Figure IV.4.3: Performances des protéases SAPHM et Alcalase Ultra 2,5 L dans le détergent liquide commerciale Pril-iSiS à 7 mg/mL ; (a) traitement par l'eau de robinet ; (b) traitement par Pril-iSiS (7 mg/mL) ; (c) Traitement par Alcalase Ultra 2,5 L (500 U/mL) + Pril-iSiS (7 mg/mL) ; (d) Traitement par SAPHM (500 U/mL) + Pril-iSiS (7 mg/mL). I: tissus non traitées (contrôle) et II : tissus traités.

D'après la figure IV.4.3 (d), on remarque que l'ajout de la protéase SAPHM à la solution détergente améliore les performances du détergent Pril-iSiS (7 mg/mL) dans le sens d'une meilleure décoloration des taches du sang. Des travaux similaires ont montré la capacité des protéases alcalines dans l'élimination des taches du sang, en tenant l'exemple de la protéase alcaline thermostable produite par la souche *Bacillus alveayuensis* CAS 5 qui a éliminé totalement le sang suite à sa combinaison avec un détergent à concentration de 5 mg/mL pendant 20 min [307].

Pour qu'une enzyme soit utilisée dans une formule de détergent, il faudrait qu'elle possède deux principales qualités: elle doit être active à des pH alcalins et doit être compatible avec les différents composants des détergents. L'utilisation

principale des protéases compatibles dans les détergents concerne les formulations de lessives pour linge [100, 213, 294, 308].

IV.4.5. Conclusion

En conclusion de ce chapitre, nous montrons que la SAPHM est une protéase à serine produite par notre souche K7A de *Bacillus licheniformis* semblent être utilisée avec succès dans plusieurs applications biotechnologiques notamment la synthèse peptidique et la détergence. Les différentes investigations ont montré que cette protéase assez originale est alcaline et présentant une bonne thermostabilité située à 70 °C ce qui lui donne une éventuelle application industrielle en détergence.

Une étude comparative de la compatibilité de l'enzyme SAPHM avec les détergents commerciaux liquides et solides en utilisant une enzyme commerciale parmi les plus utilisées dans le monde, L'Alcalase Ultra 2,5 L. Cette étude a montré que la SAPHM est plus compatible avec la plupart des détergents commerciaux que l'enzyme Alcalase Ultra 2,5 L, ce qui la rend très attractive pour une éventuelle application en détergence notamment en présence de Pril-iSiS.

Ainsi, des tests visuels d'évaluation des performances de détergent commercial Pril-iSiS additionnés avec la protéase SAPHM ont montré que la combinaison de notre enzyme avec le détergent Pril-iSiS a entraîné l'élimination complète des taches protéiques du sang. [259].

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Actuellement, les protéases microbiennes, en particulier celles produites par des bactéries à Gram positif notamment du genre *Bacillus* dominant le marché mondial des enzymes avec une majeure application dans la formulation des détergents et la synthèse peptidique. Le présent travail s'inscrit dans le cadre de l'obtention de nouvelles activités protéasiques plus efficaces et meilleures que les enzymes commerciales. L'obtention de nouvelles protéases pourrait soit conduire à de nouvelles applications biotechnologiques, soit à une amélioration des performances des enzymes existantes. L'application éventuelle de ces protéases intéressantes au niveau industriel, passe par la mise au point d'un procédé de production économique et reproductible. Ceci sera possible par la construction de souches hyperproductrices de ces enzymes et par l'optimisation des conditions de production à l'échelle du laboratoire puis à grande échelle.

Ainsi, le premier volet de ce travail a porté, en premier lieu sur le criblage, l'optimisation ainsi que l'identification de nouvelle souche bactérienne protéolytique produisant d'enzyme active et stable à des pH alcalins. En effet, à partir de 100 souches testées sur gélose nutritif au lait (test semi-qualitatif), 20 souches présentent un rapport du diamètre de l'halo sur le diamètre de la colonie (constitue un premier critère de sélection) supérieure à 4. Ces 20 souches ont été sujettes à une étude de production sur milieu liquide pour une étude quantitative. Cette dernière a conduit à la sélection de 2 souches intéressantes à savoir ; K7A et K2B vue qu'elles présentent un niveau de production supérieur à 1054 U/mL (constitue un deuxième critère de sélection). Le niveau de production sur le milieu optimisé à base de caséine (10 g/L) comme source de carbone et de nitrate d'ammonium (5 g/L) comme source d'azote est de 12500 U/mL après 24 h de culture à 200 rpm et 45 °C. L'identification de cette souche a été basée sur les méthodes cataboliques par galerie API 50 CH d'une part, et sur les méthodes de biologie moléculaire par détermination de la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARNr 16S, d'autre part. Les résultats obtenus ont permis d'identifier la souche K7A en tant qu'une espèce du de genre *Bacillus licheniformis*.

Dans le deuxième volet de ce travail, dans un premier temps, sur la purification de la protéase nommée SAPHM produite par la souche K7A de *Bacillus licheniformis*. Les techniques de purification utilisées, ont permis d'aboutir à une solution enzymatique homogène prouvée par FPLC et HPLC. En plus, le séquençage de l'extrémité NH₂-terminale (26 Aa) montre une forte homologie avec une identité de 97 %. La purification a conduit à l'obtention d'une seule bande sur SDS-PAGE qui correspond à une masse moléculaire de l'ordre de 30 kDa, ce qui confirme bien les résultats d'estimation obtenus avec le gel de filtration. Il s'agit donc d'une enzyme monomérique, et confirmée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS). Par rapport au surnageant de culture, la SAPHM a été purifiée environ 42,5 fois avec un rendement d'environ 34 %. L'étude de l'enzyme purifiée a montré que l'activité spécifique est de 81730 U/mg, sur la caséine.

L'étude des différentes propriétés biochimiques de cette enzyme produite par la souche K7A de *Bacillus licheniformis* montre qu'il s'agit d'une enzyme qui présente une activité maximale à pH 10 et à une température de 70 °C. Son activité enzymatique est complètement inhibée par le PMSF et la DFP et partiellement inhibée par le DTT et 2-ME, DTNP, NEM et L'iodoacétamide; il s'agit donc d'une protéase à sérine. Le calcium à 2 mM améliore considérablement sa thermoactivité et sa thermostabilité. Cependant, le cadmium, le nickel et le mercure l'inhibent totalement. L'étude de la spécificité de la protéase SAPHM vis-à-vis des substrats a montré que la caséine et la caséine azure sont les plus efficacement hydrolysées par SAPHM, aucune activité collagénase n'a été détectée sur le collagène de type I et II.

Dans le troisième volet, nous avons étudié les propriétés moléculaires de cette enzyme SAPHM, le gène *sapHM* codant pour l'activité protéase en question a été cloné, totalement séquencé et surexprimé au niveau de l'espace périplasmique chez *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS. Le gène *sapHM* correspondant à la protéase SAPHM de 1,5 kb a été amplifié par PCR. L'analyse de la séquence nucléotidique montre une phase de lecture ouverte (ORF) de 1137 pb (379 Aa) qui code pour un peptide signal de (29 Aa), un pro-peptide de (76 Aa) et la protéase mature de (274 Aa), biologiquement active. La protéine recombinante purifiée possède les caractéristiques physico-chimiques et cinétiques identiques à celles trouvées pour la protéine native.

Par ailleurs, dans le quatrième volet, nous avons également montré au cours de ce travail que la protéase SAPHM montre une bonne activité, stabilité et tolérance en présence de certains solvants organiques à 50 % (v/v) en particulier en présence d'isopropanol, de DMF, de chloroforme et du *n*-heptane. Cette enzyme présente également une stabilité remarquable en présence des surfactants (SDS), des tensioactifs (Tween 20 et 80 et Triton x-100), des agents de blanchiments (perborate de sodium, H₂O₂) et certains détergents commerciaux liquides et solides (Pril-iSiS, Nadif et OMO). Les caractéristiques intéressantes de la SAPHM nous permettent de conclure que cette enzyme est convenable pour une éventuelle application industrielle en détergence et la synthèse peptidique.

En guise de perspective, nous envisagerons de :

- Poursuivre l'étude de la relation structure-fonctions de l'enzyme SAPHM.
- Produire des quantités importantes de cette enzyme à l'échelle fermenteur.
- Appliquer à l'échelle industrielle la protéase rSAPHM comme bio-additif avec le détergent commercial Alcalase Ultra 2,5 L.
- L'évaluation des performances de l'enzyme dans autres applications biotechnologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Mukherjee, S., M. Karmakar, and R.R. Ray, *Production of extra cellular exoglucanase by Rhizopus oryzae from submerged fermentation of agro wastes*. Recent Research in Science and Technology, 2011. **3**(3).
2. Rai, S.K. and A.K. Mukherjee, *Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from Bacillus subtilis DM-04*. Biochemical engineering journal, 2010. **48**(2): p. 173-180.
3. Cheng, K., et al., *Purification and biochemical characterization of a serine alkaline protease TC4 from a new isolated Bacillus alcalophilus TCCC11004 in detergent formulations*. African Journal of Biotechnology, 2010. **9**(31): p. 4942-4953.
4. Fujinami, S. and M. Fujisawa, *Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes--past, present and future*. Environ Technol, 2010. **31**(8-9): p. 845-56.
5. Gupta, R., et al., *An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. **60**(4): p. 381-95.
6. Ogawa, J. and S. Shimizu, *Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan*. Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(4): p. 367-75.
7. Maurer, K.-H., *Detergent proteases*. Current Opinion Biotechnol, 2004. **15**(4): p. 330-334.
8. Gupta, R., Q.K. Beg, and P. Lorenz, *Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002. **59**(1): p. 15-32.
9. Vijayaraghavan, P. and S.G.P. Vincent, *Cow dung as a novel, inexpensive substrate for the production of a halo-tolerant alkaline protease by Halomonas sp. PV1 for eco-friendly applications*. Biochemical engineering journal, 2012. **69**: p. 57-60.
10. Lalmanach, G., *Proteolytic enzymes: from structures to transport pathways*. Biochimie, 2008. **90**(2): p. 191-3.
11. Rao, M.B., et al., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1998. **62**(3): p. 597-635.
12. Gomes, L.C., G. Di Benedetto, and L. Scorrano, *During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability*. Nature cell biology, 2011. **13**(5): p. 589.
13. Volpicella, M., et al., *Cystatins, serpins and other families of protease inhibitors in plants*. Current Protein and Peptide Science, 2011. **12**(5): p. 386-398.
14. Beg, Q. and R. Gupta, *Purification and characterization of an oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from Bacillus mojavensis*. Enzyme Microb. Technol., 2003. **32**: p. 294-304.
15. Maurer, K.-H., *Detergent proteases*. Current opinion in Biotechnology, 2004. **15**(4): p. 330-334.
16. Rao, M.B., et al., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. Microbiology and molecular biology reviews, 1998. **62**(3): p. 597-635.
17. Godfrey, T. and S. West, *Textiles*. Industrial enzymology, 1996: p. 360-371.
18. Davies, D., et al., *Isolation and characterization of the ALP1 protease from Aspergillus fumigatus and its protein inhibitor from Physarium polycephalum*. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2005. **31**(3): p. 229-237.
19. Dal Degan, F., B. Ribadeau-Dumas, and K. Breddam, *Purification and characterization of two serine carboxypeptidases from Aspergillus niger and their use in C-terminal sequencing of proteins and peptide synthesis*. Applied and environmental microbiology, 1992. **58**(7): p. 2144-2152.

20. van den Hombergh, J.P., et al., *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. Trends in biotechnology, 1997. **15**(7): p. 256-263.
21. Bastien, N., et al., Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains. Virus research, 2003. **93**(1): p. 51-62.
22. Bidochka, M.J. and G.G. Khachatourians, Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Experimental mycology, 1988. **12**(2): p. 161-168.
23. Rao, Y.K., et al., Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. Biochemical Engineering Journal, 2006. **28**(1): p. 57-66.
24. Dayanandan, A., et al., Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. Journal of Cleaner Production, 2003. **11**(5): p. 533-536.
25. Hajji, M., et al., Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. Process Biochemistry, 2007. **42**(5): p. 791-797.
26. Ni, X., et al., Cloning, characterization, and expression of the gene encoding alkaline protease in the marine yeast *Aureobasidium pullulans* 10. Marine biotechnology, 2008. **10**(3): p. 319-327.
27. Ni, X., et al., Alkaline protease gene cloning from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* HN2-3 and the protease surface display on *Yarrowia lipolytica* for bioactive peptide production. Marine biotechnology, 2009. **11**(1): p. 81-89.
28. Naglik, J.R., S.J. Challacombe, and B. Hube, *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiology and molecular biology reviews, 2003. **67**(3): p. 400-428.
29. Rawlings, N.D. and F.R. Morton, The MEROPS batch BLAST: a tool to detect peptidases and their non-peptidase homologues in a genome. Biochimie, 2008. **90**(2): p. 243-259.
30. Ward, O., M. Rao, and A. Kulkarni, Proteases, production. 2009.
31. Sajid, M. and J.H. McKerrow, Cysteine proteases of parasitic organisms. Molecular and biochemical parasitology, 2002. **120**(1): p. 1-21.
32. Oda, K., New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. The Journal of Biochemistry, 2011. **151**(1): p. 13-25.
33. Fujinaga, M., et al., The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(10): p. 3364-3369.
34. Lowe, J., et al., Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. Science, 1995. **268**(5210): p. 533-539.
35. Seemuller, E., et al., Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. Science, 1995. **268**(5210): p. 579-582.
36. Hsieh, J.J.-D., E.H.-Y. Cheng, and S.J. Korsmeyer, Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. Cell, 2003. **115**(3): p. 293-303.
37. Fitzgerald, P., et al., Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0-Å resolution. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(24): p. 14209-14219.
38. Chitpinityol, S. and M.J.C. Crabbe, Chymosin and aspartic proteinases. Food Chemistry, 1998. **61**(4): p. 395-418.
39. Janowski, R., et al., Two polymorphs of a covalent complex between papain and a diazomethylketone inhibitor. Chemical Biology & Drug Design, 2004. **64**(4): p. 141-150.
40. Nakahama, K., et al., Cloning and sequencing of *Serratia* protease gene. Nucleic acids research, 1986. **14**(14): p. 5843-5855.
41. Miyoshi, S.-i. and S. Shinoda, Microbial metalloproteases and pathogenesis. Microbes and infection, 2000. **2**(1): p. 91-98.

42. Miyoshi, S. and S. Shinoda, *Microbial metalloproteases and pathogenesis*. Microbes Infect, 2000. **2**(1): p. 91-8.
43. Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, [2] *Families of serine peptidases*, in *Methods in enzymology*. 1994, Elsevier. p. 19-61.
44. Barrett, A.J. and N.D. Rawlings, *Families and clans of serine peptidases*. Archives of biochemistry and biophysics, 1995. **318**(2): p. 247-250.
45. Rawlings, N., L. Polgar, and A. Barrett, *A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase*. Biochemical Journal, 1991. **279**(Pt 3): p. 907.
46. Ward, O., *Proteolytic enzymes*. 1985.
47. Kalisz, H.M., *Microbial proteinases*, in *Enzyme studies*. 1988, Springer. p. 1-65.
48. Siezen, R.J. and J.A. Leunissen, *Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases*. Protein science, 1997. **6**(3): p. 501-523.
49. Rawlings, N.D., et al., *MEROPS: the peptidase database*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D320-5.
50. Smith, E.L., et al., *Subtilisin Carlsberg V. The complete sequence; comparison with subtilisin BPN'; evolutionary relationships*. Journal of Biological Chemistry, 1968. **243**(9): p. 2184-2191.
51. Huang, S., et al., *Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/Ced-3 family proteases and MAP kinase kinase 6b*. Immunity, 1997. **6**(6): p. 739-749.
52. Lerner, C.G., T. Kobayashi, and M. Inouye, *Isolation of subtilisin pro-sequence mutations that affect formation of active protease by localized random polymerase chain reaction mutagenesis*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(33): p. 20085-20086.
53. Li, Y., et al., *Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(42): p. 25127-25132.
54. Barr, P.J., *Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases*. Cell, 1991. **66**(1): p. 1-3.
55. Zhu, X., et al., *Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process*. Nature, 1989. **339**(6224): p. 483.
56. Ikemura, H., H. Takagi, and M. Inouye, *Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(16): p. 7859-7864.
57. Silen, J.L. and D.A. Agard, *The alytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain in vivo*. Nature, 1989. **341**(6241): p. 462.
58. Winther, J.R. and P. Sørensen, *Propeptide of carboxypeptidase Y provides a chaperone-like function as well as inhibition of the enzymatic activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(20): p. 9330-9334.
59. Shinde, U. and M. Inouye, *Intramolecular chaperones and protein folding*. Trends in biochemical sciences, 1993. **18**(11): p. 442-446.
60. Inouye, M., *Intramolecular chaperone: the role of the pro-peptide in protein folding*. Enzyme, 1991. **45**: p. 314-321.
61. Kobayashi, T. and M. Inouye, *Functional analysis of the intramolecular chaperone: Mutational hot spots in the subtilisin pro-peptide and a secondsite suppressor mutation within the subtilisin molecule*. Journal of molecular biology, 1992. **226**(4): p. 931-933.
62. Ohta, Y., et al., *Pro-peptide as an intermolecular chaperone: renaturation of denatured subtilisin E with a synthetic pro-peptide*. Molecular microbiology, 1991. **5**(6): p. 1507-1510.
63. Ohta, Y. and M. Inouye, *Pro-subtilisin E: purification and characterization of its autoprocessing to active subtilisin E in vitro*. Molecular microbiology, 1990. **4**(2): p. 295-304.
64. Bryan, P., et al., *Energetics of folding subtilisin BPN'*. Biochemistry, 1992. **31**(21): p. 4937-4945.

65. Eder, J., M. Rheinhecker, and A.R. Fersht, *Folding of subtilisin BPN': role of the pro-sequence*. Journal of molecular biology, 1993. **233**(2): p. 293-304.
66. Inouye, M., X. Fu, and U. Shinde, *Substrate-induced activation of a trapped IMC-mediated protein folding intermediate*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(4): p. 321-5.
67. Fu, X., M. Inouye, and U. Shinde, *Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. The inhibitory and chaperone functions of the subtilisin propeptide are not obligatorily linked*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16871-8.
68. Bryan, P., et al., *Catalysis of a protein folding reaction: Mechanistic implications of the 2.0 Å structure of the subtilisin-prodomain complex*. Biochemistry, 1995. **34**(32): p. 10310-10318.
69. Greenfield, N.J. and G.D. Fasman, *Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation*. Biochemistry, 1969. **8**(10): p. 4108-4116.
70. Eder, J. and A.R. Fersht, *Pro-sequence-assisted protein folding*. Molecular microbiology, 1995. **16**(4): p. 609-614.
71. Takagi, J., H.P. Erickson, and T.A. Springer, *C-terminal opening mimics' inside-out' activation of integrin $\alpha 5 \beta 1$* . Nature Structural and Molecular Biology, 2001. **8**(5): p. 412.
72. Siezen, R.J., et al., *Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases*. Protein Engineering, Design and Selection, 1991. **4**(7): p. 719-737.
73. Teplyakov, A., P. Gros, and W.G. Hol, *Crystallographic study of eglin-C binding to thermolysin*. Adv Exp Med Biol, 1996. **379**: p. 5-9.
74. Siezen, R.J., B. Renckens, and J. Boekhorst, *Evolution of prokaryotic subtilases: genome-wide analysis reveals novel subfamilies with different catalytic residues*. Proteins, 2007. **67**(3): p. 681-94.
75. Jain, S.C., et al., *The crystal structure of an autoprocessed Ser221Cys-subtilisin E-propeptide complex at 2.0 Å resolution*. Journal of molecular biology, 1998. **284**(1): p. 137-144.
76. Dressler, D. and H. Potter, *Discovering Enzymes (Hardcover)* W H Freeman & Co (February 1991) 1991: p. 263 pages
77. Yabuta, Y., et al., *Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: dissecting conformational changes coincident with autoprocessing and the role of Ca^{2+} in subtilisin maturation*. The Journal of Biochemistry, 2002. **131**(1): p. 31-37.
78. Demuth, H.-U., et al., *N-peptidyl, O-acyl hydroxamates: comparison of the selective inhibition of serine and cysteine proteinases*. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1996. **1295**(2): p. 179-186.
79. Schüle, R., et al., *Preprosubtilisin Carlsberg processing and secretion is blocked after deletion of amino acids 97-101 in the mature part of the enzyme*. Molecular and General Genetics MGG, 1991. **227**(1): p. 137-143.
80. Cash, P., et al., *Synthesis of the pro-peptide of subtilisin BPN'*. Peptide research, 1989. **2**(4): p. 292-296.
81. BODE, W., E. PAPAMOKOS, and D. MUSIL, *The high-resolution X-ray crystal structure of the complex formed between subtilisin Carlsberg and eglin c, an elastase inhibitor from the leech Hirudo medicinalis*. The FEBS Journal, 1987. **166**(3): p. 673-692.
82. McPhalen, C.A. and M.N. James, *Structural comparison of two serine proteinase-protein inhibitor complexes: eglin-c-subtilisin Carlsberg and CI-2-subtilisin Novo*. Biochemistry, 1988. **27**(17): p. 6582-6598.
83. Neidhart, D.J. and G.A. Petsko, *The refined crystal structure of subtilisin Carlsberg at 2.5 Å resolution*. Protein Engineering, Design and Selection, 1988. **2**(4): p. 271-276.
84. Kidd, R.D., et al., *A Weak Calcium Binding Site in Subtilisin BPN' Has a Dramatic Effect on Protein Stability*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(7): p. 1645-1650.

85. Lee, S. and D.-J. Jang, *Progressive rearrangement of subtilisin Carlsberg into orderly and inflexible conformation with Ca²⁺ binding*. Biophysical journal, 2001. **81**(5): p. 2972-2978.
86. Bryan, P.N., *Protein engineering of subtilisin*. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000. **1543**(2): p. 203-222.
87. Lee, S. and D.-J. Jang, *Cation-binding sites of subtilisin Carlsberg probed with Eu (III) luminescence*. Biophysical journal, 2000. **79**(4): p. 2171-2177.
88. Pantoliano, M.W., et al., *The engineering of binding affinity at metal ion binding sites for the stabilization of proteins: subtilisin as a test case*. Biochemistry, 1988. **27**(22): p. 8311-8317.
89. Gallagher, T., P. Bryan, and G.L. Gilliland, *Calcium-independent subtilisin by design*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1993. **16**(2): p. 205-213.
90. Almog, O., et al., *Structural basis of thermostability analysis of stabilizing mutations in subtilisin BPN'*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(30): p. 27553-27558.
91. Takagi, H., et al., *Enhancement of the thermostability of subtilisin E by introduction of a disulfide bond engineered on the basis of structural comparison with a thermophilic serine protease*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(12): p. 6874-6878.
92. Wells, J.A. and D. Powers, *In vivo formation and stability of engineered disulfide bonds in subtilisin*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(14): p. 6564-6570.
93. Zhao, H. and F.H. Arnold, *Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase*. Protein Engineering, 1999. **12**(1): p. 47-53.
94. Wells, J.A., et al., *Cloning, sequencing, and secretion of Bacillus amyloliquefaciens subtilisin in Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Research, 1983. **11**(22): p. 7911-7925.
95. Jacobs, M., et al., *Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from Bacillus licheniformis*. Nucleic Acids Research, 1985. **13**(24): p. 8913-8926.
96. Yamagata, Y., K. Isshiki, and E. Ichishima, *Subtilisin Sendai from alkalophilic Bacillus sp.: molecular and enzymatic properties of the enzyme and molecular cloning and characterization of the gene, aprS*. Enzyme and microbial technology, 1995. **17**(7): p. 653-663.
97. Anwar, A. and M. Saleemuddin, *Alkaline proteases: a review*. Bioresource technology, 1998. **64**(3): p. 175-183.
98. Kumar, C.G. and H. Takagi, *Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint*. Biotechnology advances, 1999. **17**(7): p. 561-594.
99. Gupta, R., Q. Beg, and P. Lorenz, *Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications*. Applied microbiology and biotechnology, 2002. **59**(1): p. 15-32.
100. Kirk, O., T.V. Borchert, and C.C. Fuglsang, *Industrial enzyme applications*. Current opinion in biotechnology, 2002. **13**(4): p. 345-351.
101. Lageiro, M.M., et al., *Microbial proteases application in leather industry*. Journal of Biotechnology, 2007. **131**(2): p. S239-S240.
102. Nardello-Rataj, V., L.H.T. Tai, and J.-M. Aubry, *Les lessives en poudre. l'actualité chimique*, 2003: p. 3.
103. Gupta, R., et al., *Bleach-stable, alkaline protease from Bacillus sp.* Biotechnology Letters, 1999. **21**(2): p. 135-138.
104. Bech, L.M., et al., *Oxidation stable detergent enzymes*. 1993, Google Patents.
105. Kumar, S. and S.B. Hedges, *A molecular timescale for vertebrate evolution*. Nature, 1998. **392**(6679): p. 917-920.
106. Nardello-Rataj, V., L. Ho Tan Tai, and J.-M. Aubry, *Les lessives en poudre : Un siècle d'innovations pour éliminer les taches*. Actualité chimique 2003: p. 3-10.
107. Ece, S., et al., *Improving thermal and detergent stability of Bacillus stearothermophilus neopullulanase by rational enzyme design*. Protein Engineering, Design and Selection, 2015. **28**(6): p. 147-151.
108. Johnson, J.L., S. Kalyoncu, and R.L. Lieberman, *Lessons from an alpha-Helical Membrane Enzyme: Expression, Purification, and Detergent Optimization for*

- Biophysical and Structural Characterization*. Methods Mol Biol, 2016. **1432**: p. 281-301.
109. Ece, S., et al., *Improving thermal and detergent stability of Bacillus stearothermophilus neopullulanase by rational enzyme design*. Protein Eng Des Sel, 2015. **28**(6): p. 147-51.
 110. Kumar, C., *Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic Bacillus pumilus*. Letters in applied microbiology, 2002. **34**(1): p. 13-17.
 111. Kravetz, L. and K. Guin, *Effect of surfactant structure on stability of enzymes formulated into laundry liquids*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1985. **62**(5): p. 943-949.
 112. Lalonde, J.J., et al., *Cross-linked crystals of Candida rugosa lipase: highly efficient catalysts for the resolution of chiral esters*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(26): p. 6845-6852.
 113. Crutzen, A. and M. Douglass, *Detergent Enzymes: A challenge!* Surfactant science series, 1999. **82**: p. 639-690.
 114. Patkar, S., et al., *Purification of two lipases from Candida antarctica and their inhibition by various inhibitors*. Indian journal of chemistry. Sect. B: Organic chemistry, including medical chemistry, 1993. **32**(1): p. 76-80.
 115. Delaney, B., et al., *Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology*. Food and Chemical Toxicology, 2008. **46**: p. S71-S97.
 116. Aehle, W., et al., *Rational protein engineering and industrial application: Structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved 'washing performance'—the alkaline protease from Bacillus alcalophilus*. Journal of biotechnology, 1993. **28**(1): p. 31-40.
 117. Beg, Q.K., R. Saxena, and R. Gupta, *Kinetic constants determination for an alkaline protease from Bacillus mojavensis using response surface methodology*. Biotechnology and bioengineering, 2002. **78**(3): p. 289-295.
 118. Oberoi, R., et al., *Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a Bacillus sp.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001. **17**(5): p. 493-497.
 119. Showell, M., *Enzymes, detergent*. Encyclopedia of Bioprocess Technology, 1999.
 120. Morihara, K., *Using proteases in peptide synthesis*. Trends in Biotechnology, 1987. **5**(6): p. 164-170.
 121. Kise, H., A. Hayakawa, and H. Noritomi, *Protease-catalyzed synthetic reactions and immobilization-activation of the enzymes in hydrophilic organic solvents*. Journal of Biotechnology, 1990. **14**(3-4): p. 239-254.
 122. Clapés, P. and M. Rosa Infante, *Amino acid-based surfactants: enzymatic synthesis, properties and potential applications*. Biocatalysis and Biotransformation, 2002. **20**(4): p. 215-233.
 123. Isono, Y. and M. Nakajima, *Application of membrane phase separation for enzymatic synthesis of aspartame precursor in biphasic reaction system*. Biochemical engineering journal, 2000. **4**(2): p. 143-147.
 124. Ben Elhoul, M., et al., *A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from Streptomyces koyangensis TN650*. Int J Biol Macromol, 2015. **79**: p. 871-82.
 125. Toplak, A., et al., *Peptide synthesis in neat organic solvents with novel thermostable proteases*. Enzyme and Microbial Technology, 2015. **73–74**: p. 20-28.
 126. du Vigneaud, V., et al., *The synthesis and biological properties of [l-deaminopenicillamine]-oxytocin deuterated in the l-position*. Bioorganic Chemistry, 1971. **1**(1–2): p. 123-128.
 127. SCHNölzer, M., et al., *In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis*. International journal of peptide and protein research, 1992. **40**(3-4): p. 180-193.
 128. Merrifield, R.B., *Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide*. Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(14): p. 2149-2154.

129. Morihara, K., R. Muneyuki, and T. Oka, *Use of immobilized Achromobacter protease I for semisynthesis of human insulin*. Methods Enzymol, 1987. **136**: p. 162-70.
130. Barros, R.J., E. Wehtje, and P. Adlercreutz, *Enhancement of immobilized protease catalyzed dipeptide synthesis by the presence of insoluble protonated nucleophile*. Enzyme and microbial technology, 1999. **24**(8-9): p. 480-488.
131. So, J.-E., J.-S. Shin, and B.-G. Kim, *Protease-catalyzed tripeptide (RGD) synthesis*. Enzyme and microbial technology, 2000. **26**(2-4): p. 108-114.
132. Riva, S., et al., *Protease-catalyzed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide*. Journal of the American Chemical Society, 1988. **110**(2): p. 584-589.
133. CHEN, S.T., S.H. WU, and K.T. WANG, *Diastereoselective hydrolysis of peptide esters by alkaline protease Preparation of racemization-free peptides*. Chemical Biology & Drug Design, 1991. **37**(4): p. 347-350.
134. Manion, C.V., et al., *Dietary aspartyl-phenylalanine-1-methyl ester delays osteoarthritis and prevents associated bone loss in STR/ORT mice*. Rheumatology (Oxford), 2011. **50**(7): p. 1244-9.
135. Granstrom, T.B., et al., *Growth characteristics and metabolic flux analysis of Candida milleri*. Biotechnol Bioeng, 2000. **70**(2): p. 197-207.
136. Monnier, L. and C. Colette, *Glycaemic variability and ambient hyperglycaemia: how and when are they linked?* Diabetes Metab, 2014. **40**(4): p. 237-40.
137. Kawashiro, K., et al., *Effect of organic solvents on enantioselectivity of protease catalysis*. Biotechnology and bioengineering, 1997. **53**(1): p. 26-31.
138. Castro, G.R., *Enzymatic activities of proteases dissolved in organic solvents*. Enzyme and microbial technology, 1999. **25**(8-9): p. 689-694.
139. Gololobov, M.Y., et al., *Nucleophile specificity in α -chymotrypsin- and subtilisin- (Bacillus subtilis strain 72) catalyzed reactions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1992. **1160**(2): p. 188-192.
140. Nagashima, T., A. Watanabe, and H. Kise, *Peptide synthesis by proteases in organic solvents: medium effect on substrate specificity*. Enzyme Microb Technol, 1992. **14**(10): p. 842-7.
141. Nagashima, T., A. Watanabe, and H. Kise, *Peptide synthesis by proteases in organic solvents: medium effect on substrate specificity*. Enzyme and microbial technology, 1992. **14**(10): p. 842-847.
142. Gololobov, M.Y., et al., *Side reactions in enzymatic peptide synthesis in organic media: Effects of enzyme, solvent, and substrate concentrations*. Enzyme and microbial technology, 1994. **16**(6): p. 522-528.
143. Rao, N., et al., *Library of glyco-peptides useful for identification of cell adhesion inhibitors*. 1998, Google Patents.
144. Ruiz, D.M. and R.E. De Castro, *Effect of organic solvents on the activity and stability of an extracellular protease secreted by the haloalkaliphilic archaeon Natrionalba magadii*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2007. **34**(2): p. 111-5.
145. Karbalaee-Heidari, H.R., M. Shahbazi, and G. Absalan, *Characterization of a novel organic solvent tolerant protease from a moderately halophilic bacterium and its behavior in ionic liquids*. Appl Biochem Biotechnol, 2013. **170**(3): p. 573-86.
146. Neklyudov, A., A. Ivankin, and A. Berdutina, *Properties and uses of protein hydrolysates*. Applied Biochemistry and Microbiology, 2000. **36**(5): p. 452-459.
147. Ward, L., *Effect of ethanol and dietary protein on plasma amino acids in the rat*. Nutrition reports international, 1985. **31**(2): p. 273-279.
148. Craven, R.C., R.P. Bennett, and J.W. Wills, *Role of the avian retroviral protease in the activation of reverse transcriptase during virion assembly*. Journal of virology, 1991. **65**(11): p. 6205-6217.
149. Souissi, N., et al., *Preparation and use of media for protease-producing bacterial strains based on by-products from Cuttlefish (Sepia officinalis) and wastewaters from marine-products processing factories*. Microbiological research, 2008. **163**(4): p. 473-480.

150. Fujimaki, M., et al., *Application of microbial proteases to soybean and other materials to improve acceptability, especially through the formation of plastein*. Journal of applied microbiology, 1971. **34**(1): p. 119-131.
151. OHMIYA, K., et al., *APPLICATION OF IMMOBILIZED ALKALINE PROTEASE TO CHEESE-MAKING*. Journal of Food Science, 1979. **44**(6): p. 1584-1588.
152. Wang, Y.-C., A.L. Stevens, and J. Han, *Million-fold preconcentration of proteins and peptides by nanofluidic filter*. Analytical chemistry, 2005. **77**(14): p. 4293-4299.
153. Wang, Y., et al., *Isolation of four pepsin-like protease genes from Aspergillus niger and analysis of the effect of disruptions on heterologous laccase expression*. Fungal Genetics and Biology, 2008. **45**(1): p. 17-27.
154. Xu, W.-f., et al., *Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(12): p. 6642-6646.
155. Gupta, R., et al., *An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases*. Applied microbiology and biotechnology, 2002. **60**(4): p. 381-395.
156. Varela, H., et al., *Skin unhairing proteases of Bacillus subtilis: production and partial characterization*. Biotechnology letters, 1997. **19**(8): p. 755-758.
157. George, S., et al., *Production of protease by Bacillus amyloliquefaciens in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins*. Process Biochemistry, 1995. **30**(5): p. 457-462.
158. Joshi, S. and T. Satyanarayana, *Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium Bacillus lehensis*. Bioresource Technol, 2013. **131**: p. 76-85.
159. Fujiwara, N. and K. Yamamoto, *Production of alkaline protease in a low-cost medium by alkalophilic Bacillus sp. and properties of the enzyme*. Journal of fermentation technology, 1987. **65**(3): p. 345-348.
160. Fujiwara, N., K. Yamamoto, and A. Masui, *Utilization of a thermostable alkaline protease from an alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray film*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991. **72**(4): p. 306-308.
161. Gajju, H., T. Bhalla, and H. Agarwal. *Utilization of thermostable alkaline protease from Bacillus coagulans PB-77 for silver recovery from used X-ray films*. in *Proceedings of 37th Annual Conference of Association of Microbiologists of India*. 1996.
162. Ishikawa, T. and F. Ali-Osman, *Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(27): p. 20116-20125.
163. Fujiwara, S., et al., *Test selection based on finite state models*. IEEE Transactions on software engineering, 1991. **17**(6): p. 591-603.
164. Anbu, P., A. Hilda, and S.C. Gopinath, *Keratinophilic fungi of poultry farm and feather dumping soil in Tamil Nadu, India*. Mycopathologia, 2004. **158**(3): p. 303-9.
165. Dalev, P.G., *Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate*. Bioresource Technology, 1994. **48**(3): p. 265-267.
166. Jacobson, R.E., *Method and instruments for performing a percutaneous lumbar discectomy*. 1985, Google Patents.
167. Kanehisa, K., *Woven or knit fabrics manufactured using yarn dyed raw silk*. 2000, Google Patents.
168. Smith, E.L., et al., *The complete amino acid sequence of two types of subtilisin, BPN' and Carlsberg*. J Biol Chem, 1966. **241**(24): p. 5974-6.
169. Mandal, B.B. and S.C. Kundu, *Biospinning by silkworms: silk fiber matrices for tissue engineering applications*. Acta Biomater, 2010. **6**(2): p. 360-71.
170. Kudrya, V. and I. Simonenko, *Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of Bacillus subtilis*. Applied microbiology and biotechnology, 1994. **41**(5): p. 505-509.

171. Kim, Y.D. and C.V. Morr, *Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. **44**(5): p. 1314-1320.
172. Atsumi, T. and T. Ueha, *[Protease, collagenase, fibrinolytic activities and vascular permeability of a cytoplasmic extract of Veillonella alcalescens, a Gram-Negative bacterium]*. Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi, 1983. **25**(3): p. 526-34.
173. Suzuki, T., et al., *Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(3): p. 231-47.
174. Bezawada, J., *Production améliorée, récupération et application d'une protéase alcaline produite en utilisant les boues d'épuration comme substrat*. 2010, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique.
175. Kim, W., et al., *Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from Bacillus sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. **62**(7): p. 2482-2488.
176. Wang, N., Z.C. Chen, and X.F. Lin, *Controllable selective synthesis of a polymerizable prodrug of cytarabine by enzymatic and chemical methods*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2005. **15**(18): p. 4064-4067.
177. Wang, N., et al., *Regioselective synthesis of cyclodextrin mono-substituted conjugates of non-steroidal anti-inflammatory drugs at C-2 secondary hydroxyl by protease in non-aqueous media*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2005. **13**(11): p. 3667-3671.
178. Claus, D. and R. Berkeley, *Genus pseudomonas*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1986. **1**: p. 140-219.
179. Rey, M.W., et al., *Complete genome sequence of the industrial bacterium Bacillus licheniformis and comparisons with closely related Bacillus species*. Genome biology, 2004. **5**(10): p. r77.
180. Veith, B., et al., *The complete genome sequence of Bacillus licheniformis DSM13, an organism with great industrial potential*. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 2004. **7**(4): p. 204-211.
181. Gherna, R., P. Pienta, and R. Cote, *American type culture collection*. Catalogue of Bacteria and Phages, 17th ed. American Type Culture Collection, Rockville, MD, 1989.
182. Archana, A. and T. Satyanarayana, *Purification and characterization of a cellulase-free xylanase of a moderate thermophile Bacillus licheniformis A99*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003. **19**(1): p. 53-57.
183. Meunier, N., *Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales*. 1999, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique.
184. Perego, P., A. Converti, and M. Del Borghi, *Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by Bacillus licheniformis*. Bioresource Technology, 2003. **89**(2): p. 125-131.
185. Çalik, P., G. Çalik, and T.H. Özdamar, *Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by Bacillus licheniformis: use of citric acid as the carbon source*. Enzyme and Microbial Technology, 1998. **23**(7): p. 451-461.
186. Calik, P., et al., *Metabolic flux analysis for serine alkaline protease fermentation by Bacillus licheniformis in a defined medium: effects of the oxygen transfer rate*. Biotechnology and bioengineering, 1999. **64**(2): p. 151-167.
187. Çalik, P., G. Çalik, and T.H. Özdamar, *Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by Bacillus licheniformis*. Biotechnology and bioengineering, 2000. **69**(3): p. 301-311.
188. Deutscher, J. and S. Gogia, *System and process for creating an interactive presentation employing multi-media components*. 2002, Google Patents.

189. Fisher, S.H. and M. Débarbouillé, *Nitrogen source utilization and its regulation*, in *Bacillus subtilis and its Closest Relatives*. 2002, American Society of Microbiology. p. 181-191.
190. Atlas, M. and R. Bartha, *Microbial evolution and biodiversity*. ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial ecology. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, 1998. **1008**: p. 27-57.
191. Frankena, J., H.W. van Verseveld, and A.H. Stouthamer, *A continuous culture study of the bioenergetic aspects of growth and production of exocellular protease in Bacillus licheniformis*. Applied microbiology and biotechnology, 1985. **22**(3): p. 169-176.
192. Giesecke, U.E., et al., *Production of alkaline protease with Bacillus licheniformis in a controlled fed-batch process*. Applied microbiology and biotechnology, 1991. **35**(6): p. 720-724.
193. Prescott, M.B. and S.A. Conger, *Information technology innovations: a classification by IT locus of impact and research approach*. ACM SIGMIS Database, 1995. **26**(2-3): p. 20-41.
194. Sharma, K., et al., *Production, partial purification and characterization of alkaline protease from Bacillus aryabhattai K3*. Intl J Adv in Pharm Biol Chem, 2014. **3**(2): p. 290-298.
195. Kumar, S., et al., *Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes*. Brazilian Journal of Microbiology, 2012. **43**(4): p. 1595-1603.
196. Eveleigh, D.E., *The microbiological production of industrial chemicals*. Scientific American, 1981. **245**(3): p. 154-179.
197. de Boer, A.S., F. Priest, and B. Diderichsen, *On the industrial use of Bacillus licheniformis: a review*. Applied microbiology and biotechnology, 1994. **40**(5): p. 595-598.
198. Vitković, L. and a.L. Sadoff, *Purification of the extracellular protease of Bacillus licheniformis and its inhibition by bacitracin*. Journal of bacteriology, 1977. **131**(3): p. 891-896.
199. Hübner, U., U. Bock, and K. Schügerl, *Production of alkaline serine protease subtilisin Carlsberg by Bacillus licheniformis on complex medium in a stirred tank reactor*. Applied microbiology and biotechnology, 1993. **40**(2): p. 182-188.
200. Ferrero, M., et al., *Thermostable alkaline proteases of Bacillus licheniformis MIR 29: isolation, production and characterization*. Applied microbiology and biotechnology, 1996. **45**(3): p. 327-332.
201. Manachini, P. and M. Fortina, *Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of Bacillus licheniformis*. Biotechnology Letters, 1998. **20**(6): p. 565-568.
202. Mabrouk, S., et al., *Optimization of alkaline protease productivity by Bacillus licheniformis ATCC 21415*. Bioresource Technology, 1999. **69**(2): p. 155-159.
203. Kumar, S. and R. Nussinov, *Salt bridge stability in monomeric proteins*. Journal of molecular biology, 1999. **293**(5): p. 1241-1255.
204. Puri, S., Q.K. Beg, and R. Gupta, *Optimization of alkaline protease production from Bacillus sp. by response surface methodology*. Current microbiology, 2002. **44**(4): p. 286-290.
205. Sinha, U., S.A. Wolz, and P.J. Lad, *Two new extracellular serine proteases from Streptomyces fradiae*. International journal of biochemistry, 1991. **23**(10): p. 979-984.
206. Doi, R.H., *Role of Proteases in Sporulation*, in *Current Topics in Cellular Regulation*, B.L. Horecker and E.R. Stadtman, Editors. 1972, Academic Press. p. 1-20.
207. Kembhavi, A.A., A. Kulkarni, and A. Pant, *Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from Bacillus subtilis NCIM No. 64*. Applied biochemistry and biotechnology, 1993. **38**(1): p. 83-92.
208. Çalik, P., et al., *Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by Bacillus licheniformis*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **31**(5): p. 685-697.

209. Hameed, A., T. Keshavarz, and C.S. Evans, *Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of Bacillus subtilis K2, for use in leather processing*. Journal of chemical technology and biotechnology, 1999. **74**(1): p. 5-8.
210. Chaloupka, J., *Temperature as a factor regulating the synthesis of microbial enzymes*. Microbiological sciences, 1985. **2**(3): p. 86-90.
211. Frankena, J., et al., *Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by Bacillus licheniformis*. Applied microbiology and biotechnology, 1986. **24**(2): p. 106-112.
212. Yezza, A., et al., *Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2004. **31**(12): p. 545-552.
213. Jaouadi, B., et al., *Excellent laundry detergent compatibility and high dehairing ability of the Bacillus pumilus CBS alkaline proteinase (SAPB)*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2009. **14**(4): p. 503-512.
214. Nishihara, T., et al., *Mouse interleukin-1 receptor antagonist induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide blocks the effects of interleukin-1 on bone resorption and osteoclast-like cell formation*. Infection and immunity, 1994. **62**(2): p. 390-397.
215. Amann, E., B. Ochs, and K.-J. Abel, *Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in Escherichia coli*. Gene, 1988. **69**(2): p. 301-315.
216. Thomas, D., et al., *The problem of multiple inference in studies designed to generate hypotheses*. American Journal of Epidemiology, 1985. **122**(6): p. 1080-1095.
217. Jaouadi, N.Z., et al., *A novel keratinase from Bacillus tequilensis strain Q7 with promising potential for the leather bating process*. International journal of biological macromolecules, 2015. **79**: p. 952-964.
218. Jaouadi, N.Z., et al., *Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from Brevibacillus brevis US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities*. PloS one, 2013. **8**(10): p. e76722.
219. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989: Cold spring harbor laboratory press.
220. Ruan, J., et al., *Stimulated emission in nanocrystalline silicon superlattices*. Applied Physics Letters, 2003. **83**(26): p. 5479-5481.
221. Yabuuchi, E., et al., *Proposal of Sphingomonas wittichii sp. nov. for strain RW1T, known as a dibenzo-p-dioxin metabolizer*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2001. **51**(2): p. 281-292.
222. Jaouadi, N.Z., et al., *The overexpression of the SAPB of Bacillus pumilus CBS and mutated sapB-L31I/T33S/N99Y alkaline proteases in Bacillus subtilis DB430: new attractive properties for the mutant enzyme*. Bioresource Technology, 2012. **105**: p. 142-151.
223. DelMar, E., et al., *A sensitive new substrate for chymotrypsin*. Analytical biochemistry, 1979. **99**(2): p. 316-320.
224. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd edn*. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
225. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Preparation of plasmid DNA by lysis with SDS*. Cold Spring Harbor Protocols, 2006. **2006**(1): p. pdb. prot3906.
226. Cock, P.J., et al., *NCBI BLAST+ integrated into Galaxy*. Gigascience, 2015. **4**.
227. Zaslavsky, L. and T. Tatusova, *Mining the NCBI influenza sequence database: adaptive grouping of BLAST results using precalculated neighbor indexing*. PLoS currents, 2009. **1**.
228. Johnson, M.W., C.M. Christensen, and H. Kagermann, *Reinventing your business model*. Harvard business review, 2008. **86**(12): p. 57-68.

229. Karsch-Mizrachi, I. and B. Ouellette, *The GenBank Sequence*. Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Volume 43, Second Edition, 2001: p. 45-63.
230. D'Addabbo, P., et al., *GeneRecords: a relational database for GenBank flat file parsing and data manipulation in personal computers*. Bioinformatics, 2004. **20**(16): p. 2883-2885.
231. Ouellette, B., *The GenBank sequence database*. Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Volume 39, 1998: p. 16-45.
232. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
233. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
234. Hewick, R.M., et al., *A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator*. Journal of Biological Chemistry, 1981. **256**(15): p. 7990-7997.
235. Hunkapiller, M.W. and L.E. Hood, *Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a nonprotein carrier (polybrene), and high pressure liquid chromatography*. Biochemistry, 1978. **17**(11): p. 2124-2133.
236. Fabrice, L., et al., *Screening and directed evolution of novel biocatalysts for industrial purposes*. L' Actualité chimique 2002. **8**: p. 27-30.
237. Souissi, N., et al., *Preparation and use of media for protease-producing bacterial strains based on by-products from Cuttlefish (*Sepia officinalis*) and wastewaters from marine-products processing factories*. Microbiol Res, 2008. **163**(4): p. 473-80.
238. Zarái Jaouadi, N., et al., *The overexpression of the SAPB of *Bacillus pumilus* CBS and mutated *sapB-L31/T33S/N99Y* alkaline proteases in *Bacillus subtilis* DB430: New attractive properties for the mutant enzyme*. Bioresource Technology, 2012. **105**(0): p. 142-151.
239. Ku, T.W., R.L. Tsai, and T.M. Pan, *A simple and cost-saving approach to optimize the production of subtilisin NAT by submerged cultivation of *Bacillus subtilis* natto*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(1): p. 292-6.
240. Akolkar, A., et al., *Statistical optimization of medium components for extracellular protease production by an extreme haloarchaeon, *Halobacterium* sp. SP1(1)*. Lett Appl Microbiol, 2009. **48**(1): p. 77-83.
241. Zarái Jaouadi, N., et al., *Biochemical and Molecular Characterization of a Serine Keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with Promising Keratin-Biodegradation and Hide-Dehairing Activities*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76722.
242. Bahn, M. and R. Schmid, *Enzymes for detergents*. BIOTEC. 1987., 1987.
243. Chu, I.-M., C. Lee, and T.-S. Li, *Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416*. Enzyme and Microbial Technology, 1992. **14**(9): p. 755-761.
244. Moon, S.H. and S.J. Parulekar, *A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus**. Biotechnology and bioengineering, 1991. **37**(5): p. 467-483.
245. Sen, S. and T. Satyanarayana, *Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40*. Indian Journal of Microbiology, 1993. **33**: p. 43-43.
246. Ghorbel-Frikha, B., et al., *Production and purification of a calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005. **32**(5): p. 186-194.
247. Heineken, F. and R. O'connor, *Continuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and α -amylase by *Bacillus subtilis* NRRL-B3411*. Microbiology, 1972. **73**(1): p. 35-44.
248. Kole, M., I. Draper, and D.F. Gerson, *Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations*. Journal of chemical technology and biotechnology, 1988. **41**(3): p. 197-206.

249. Bierbaum, G., et al., *Construction of an expression system for engineering of the lantibiotic Pep5*. Applied and environmental microbiology, 1994. **60**(12): p. 4332-4338.
250. Wandersman, C., et al., *Characterization of Erwinia chrysanthemi extracellular proteases: cloning and expression of the protease genes in Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 1987. **169**(11): p. 5046-5053.
251. Schechter, I. and A. Berger, *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1967. **27**(2): p. 157-162.
252. Kristinsson, H.G. and B.A. Rasco, *Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (Salmo salar) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture*. Process Biochemistry, 2000. **36**(1): p. 131-139.
253. Zwickl, P., F. Lottspeich, and W. Baumeister, *Expression of functional Thermoplasma acidophilum proteasomes in Escherichia coli*. FEBS letters, 1992. **312**(2-3): p. 157-160.
254. Claus, D. and R.C.W. Berkeley, *Genus Bacillus* 1986: In : P.H.A. Sneath et al. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. Vol. 2. Cohn 1986, pp. 1105-1139.
255. Gurtler, V. and V. Stanisich, *New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region*. Microbiology, 1996. **142**: p. 3-16.
256. Jaouadi, B., et al., *Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from Bacillus pumilus CBS with high catalytic efficiency*. Biochimie, 2008. **90**(9): p. 1291-1305.
257. Elhoul, M.B., et al., *A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from Streptomyces koyangensis TN650*. International journal of biological macromolecules, 2015. **79**: p. 871-882.
258. Mechri, S., et al., *Characterization of a novel protease from Aeribacillus pallidus strain VP3 with potential biotechnological interest*. International journal of biological macromolecules, 2017. **94**(Part A): p. 221-232.
259. Benkiar, A., et al., *Biochemical and molecular characterization of a thermo-and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from Bacillus circulans strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013. **83**: p. 129-138.
260. Jaouadi, B., et al., *Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from Bacillus pumilus CBS with high catalytic efficiency*. Biochimie, 2008. **90**(9): p. 1291-305.
261. Benkiar, A., et al., *Biochemical and molecular characterization of a thermo- and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from Bacillus circulans strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013. **83**(0): p. 129-138.
262. Mhamdi, S., et al., *Evaluation of the biotechnological potential of a novel purified protease BS1 from Bacillus safensis S406 on the chitin extraction and detergent formulation*. Int J Biol Macromol, 2017. **104**(Pt A): p. 739-747.
263. Mechri, S., et al., *Optimized production and characterization of a detergent-stable protease from Lysinibacillus fusiformis C250R*. Int J Biol Macromol, 2017. **101**: p. 383-397.
264. Mechri, S., et al., *Characterization of a novel protease from Aeribacillus pallidus strain VP3 with potential biotechnological interest*. Int J Biol Macromol, 2017. **94**(Pt A): p. 221-232.
265. Nilegaonkar, S., et al., *Production and partial characterization of dehairing protease from Bacillus cereus MCM B-326*. Bioresource Technology, 2007. **98**(6): p. 1238-1245.
266. Reddy, V.B., et al., *Cathepsin S elicits itch and signals via protease-activated receptors*. The Journal of investigative dermatology, 2010. **130**(5): p. 1468.

267. Waghmare, G.V., M.D. Vetel, and V.K. Rathod, *Ultrasound assisted enzyme catalyzed synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate*. Ultrasonics sonochemistry, 2015. **22**: p. 311-316.
268. Illanes, A., *Enzyme biocatalysis: principles and applications*. 2008: Springer Science & Business Media.
269. Beg, Q.K., V. Sahai, and R. Gupta, *Statistical media optimization and alkaline protease production from Bacillus mojavensis in a bioreactor*. Process Biochemistry, 2003. **39**(2): p. 203-209.
270. Tari, C., H. Genckal, and F. Tokatli, *Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated Bacillus sp. L21*. Process Biochemistry, 2006. **41**(3): p. 659-665.
271. Patel, R., et al., *Production of extracellular halo-alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic Bacillus sp. isolated from seawater in Western India*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006. **22**(4): p. 375-382.
272. Wilson, P. and Z. Remigio, *Production and characterisation of protease enzyme produced by a novel moderate thermophilic bacterium (EP1001) isolated from an alkaline hot spring, Zimbabwe*. African Journal of Microbiology Research, 2012. **6**(27): p. 5542-5551.
273. Van Kampen, V. and R. Merget, *Occupational airway sensitization due to subtilisin*. Pneumologie (Stuttgart, Germany), 2002. **56**(3): p. 182-186.
274. Habbeche, A., et al., *Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete Actinomadura keratinilytica strain Cpt29 isolated from poultry compost*. Journal of bioscience and bioengineering, 2014. **117**(4): p. 413-421.
275. Benmrar, M.O., et al., *A novel organic solvent-and detergent-stable serine alkaline protease from Trametes cingulata strain CTM10101*. International journal of biological macromolecules, 2016. **91**: p. 961-972.
276. Touiou, S.B., et al., *Purification and biochemical characterization of two detergent-stable serine alkaline proteases from Streptomyces sp. strain AH4*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015. **31**(7): p. 1079-1092.
277. Jeong, Y.K., et al., *Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from Bacillus subtilis BK-17*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001. **17**(1): p. 89-92.
278. Frömmel, C. and W.E. Höhne, *Influence of calcium binding on the thermal stability of 'thermitase', a serine protease from Thermoactinomyces vulgaris*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1981. **670**(1): p. 25-31.
279. Park, I.-C., et al., *Protein kinase C activation by PMA rapidly induces apoptosis through caspase-3/CPP32 and serine protease (s) in a gastric cancer cell line*. International journal of oncology, 2001. **18**(5): p. 1077-1083.
280. Haddar, A., et al., *Two detergent stable alkaline serine-proteases from Bacillus mojavensis A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive*. Bioresource Technology, 2009. **100**(13): p. 3366-3373.
281. Ningthoujam, D.S. and P. Kshetri, *A thermostable alkaline protease from a moderately halo-alkalithermotolerant Bacillus Subtilis strain SH1*. Aus J Basic and Appl Sci, 2010. **4**: p. 5126-5134.
282. Akel, H., F. Al-Quadani, and T.K. Yousef, *Characterization of a purified thermostable protease from hyperthermophilic Bacillus strain HUTBS71*. Eur J Sci Res, 2009. **31**(2): p. 280-8.
283. Vieille, C. and G.J. Zeikus, *Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability*. Microbiology and molecular biology reviews, 2001. **65**(1): p. 1-43.
284. Shirley, B.W. and H.M. Goodman, *An Arabidopsis gene homologous to mammalian and insect genes encoding the largest proteasome subunit*. Molecular and General Genetics MGG, 1993. **241**(5): p. 586-594.

285. Kim, J., J.W. Grate, and P. Wang, *Nanostructures for enzyme stabilization*. Chemical Engineering Science, 2006. **61**(3): p. 1017-1026.
286. El Hadj-Ali, N., et al., *Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated Bacillus licheniformis NH1*. Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**(4): p. 515-523.
287. Jellouli, K., et al., *Molecular and biochemical characterization of an extracellular serine-protease from Vibrio metschnikovii J1*. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2009. **36**(7): p. 939-948.
288. Marquart, M.E., et al., *Calcium and magnesium enhance the production of Pseudomonas aeruginosa protease IV, a corneal virulence factor*. Medical microbiology and immunology, 2005. **194**(1-2): p. 39-45.
289. Odenwald, W.F. and S.J. Morris, *Identification of a second synexin-like adrenal medullary and liver protein that enhances calcium-induced membrane aggregation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1983. **112**(1): p. 147-154.
290. Elhouli, M.B., et al., *Biochemical and molecular characterization of new keratinolytic protease from Actinomyces viridilutea DZ50*. International journal of biological macromolecules, 2016. **92**: p. 299-315.
291. Bouacem, K., et al., *Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from Caldicoprobacter guelmensis*. International journal of biological macromolecules, 2015. **81**: p. 299-307.
292. Bouacem, K., et al., *Novel serine keratinase from Caldicoprobacter algeriensis exhibiting outstanding hair dehairing abilities*. International journal of biological macromolecules, 2016. **86**: p. 321-328.
293. Steuer, C., et al., *Optimization of Assay Conditions for Dengue Virus Protease: Effect of Various Polyols and Nonionic Detergents*. Journal of biomolecular screening, 2009. **14**(9): p. 1102-1108.
294. Joo, H.S. and C.S. Chang, *Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halo-tolerant Bacillus clausii I-52: enhanced production and simple purification*. Journal of applied microbiology, 2005. **98**(2): p. 491-497.
295. Aoyama, M., et al., *Sequence of the gene encoding an alkaline serine proteinase of Bacillus pumilus TYO-67*. Microbiol Immunol, 2000. **44**(5): p. 389-93.
296. Pan, J., Q. Huang, and Y. Zhang, *Gene cloning and expression of an alkaline serine protease with dehairing function from Bacillus pumilus*. Curr Microbiol, 2004. **49**(3): p. 165-9.
297. Nielsen, H., et al., *Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites*. Protein Eng, 1997. **10**(1): p. 1-6.
298. Dyrlov Bendtsen, J., et al., *Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0*. Journal of Molecular Biology, 2004. **340**(4): p. 783-795.
299. Siezen, R.J. and J.A. Leunissen, *Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases*. Protein Sci, 1997. **6**(3): p. 501-23.
300. Ben Elhouli, M., et al., *A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from Streptomyces koyangensis TN650*. International Journal of Biological Macromolecules, 2015. **79**(Supplement C): p. 871-882.
301. Thumar, J.T. and S.P. Singh, *Organic solvent tolerance of an alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic Streptomyces clavuligerus strain Mit-1*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009. **36**(2): p. 211-8.
302. Simkhada, J.R., et al., *An oxidant- and organic solvent-resistant alkaline metalloprotease from Streptomyces olivochromogenes*. Appl Biochem Biotechnol, 2010. **162**(5): p. 1457-70.
303. Jaouadi, B., et al., *Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from Streptomyces sp. strain AB1 with high stability in organic solvents*. Bioresour Technol, 2010. **101**(21): p. 8361-9.
304. Singh, J., N. Batra, and R. Sobti, *Serine alkaline protease from a newly isolated Bacillus sp. SSR1*. Process Biochemistry, 2001. **36**(8): p. 781-785.

305. Vojcic, L., et al., *Advances in protease engineering for laundry detergents*. New biotechnology, 2015. **32**(6): p. 629-634.
306. Paul, T., et al., *Bacterial keratinolytic protease, imminent starter for NextGen leather and detergent industries*. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2016. **3**: p. 8-22.
307. Annamalai, N., M.V. Rajeswari, and T. Balasubramanian, *Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from Bacillus alveayuensis CAS 5 using marine wastes*. Food and Bioproducts Processing, 2014. **92**(4): p. 335-342.
308. Gençkal, H. and C. Tari, *Alkaline protease production from alkalophilic Bacillus sp. isolated from natural habitats*. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **39**(4): p. 703-710.
309. Kimura, H., et al., *Molecular characterization and in situ localization of endosymbiotic 16S ribosomal RNA and RuBisCO genes in the pogonophoran tissue*. Marine Biotechnology, 2003. **5**(3): p. 261-269.
310. Huang, Q., et al., *Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from Bacillus pumilus*. Curr Microbiol, 2003. **46**(3): p. 169-73.

APPENDICES

Appendice 1 : Principe d'utilisation de l'ARN 16S.

En 2003, Kimura a émis le concept d'horloge "évolutionnaire" : la vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement de conséquences phénotypiques, mais elles sont étroitement corrélées avec le temps. Dans ces conditions, il est possible de construire un arbre généalogique (phylogénique) en utilisant des méthodes mathématiques et en respectant quelques règles [309].

Le principe de base consiste à comparer des gènes homologues c'est à dire descendant d'un ancêtre commun et ayant conservé une fonction identique au cours du temps. Le choix des séquences à comparer a posé un problème car il était difficile de trouver une molécule qui soit présente et homologue chez tous les organismes et qui présente des niveaux successifs d'information. En effet, pour comparer des organismes très éloignés il faut utiliser des séquences qui restent sensiblement conservées durant des centaines de millions d'années, tandis que la comparaison d'organismes proches requiert l'étude de séquences où des mutations se seront accumulées en quelques millions d'années.

Le séquençage des ARN 16S peut être automatisé et les données concernant ces molécules s'accumulent en permanence. L'utilité du séquençage des ARN 16S est reconnue par tous les taxonomistes mais, comme cette technique n'analyse qu'une faible partie du génome, elle ne permet pas de différencier les espèces proches les unes des autres. En revanche le séquençage des ARN 16S est très utile pour classer les bactéries dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce.

Lorsqu'il existe moins de 97% d'homologie entre les séquences des ARN 16S de deux souches, ces souches appartiennent à des espèces différentes. Par contre, si le pourcentage d'homologie est égal ou supérieur à 97%, le placement de deux souches dans une unique espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats des hybridations ADN-ADN.

Appendice 2 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine (dosage de protéases).

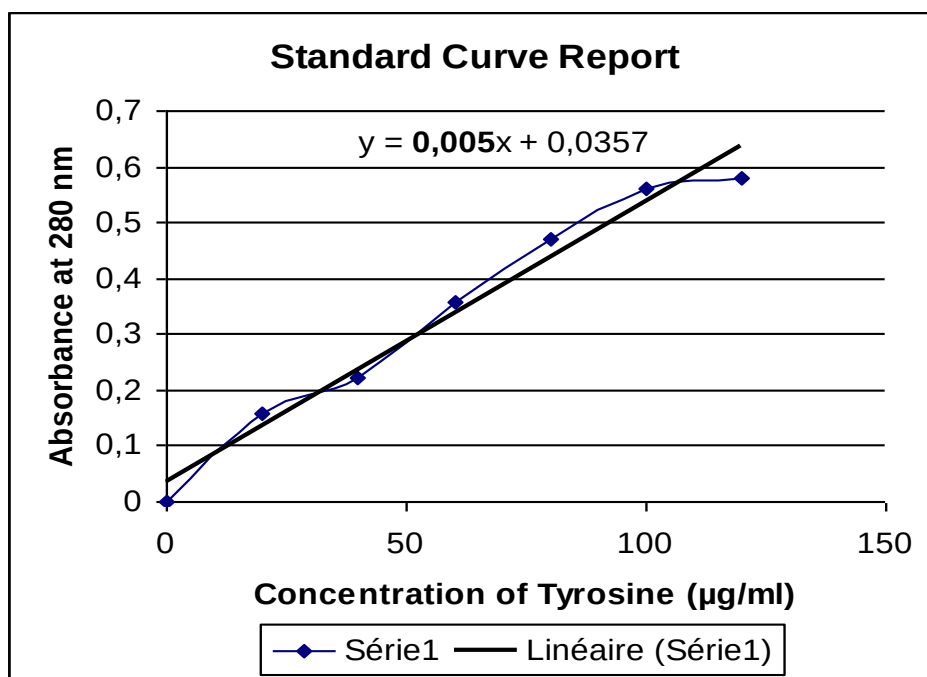
Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/ml/min dans les conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage (0-120 µg/ml) tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions. Nous en avons déduit que : 1 µg/ml de tyrosine correspond à une DO₂₈₀ de 0,0055.

$$\text{Activité (UI)} = \frac{\text{DO} \times d \times D}{T \times 0,0055}$$

Avec :

D : dilution de l'enzyme ;

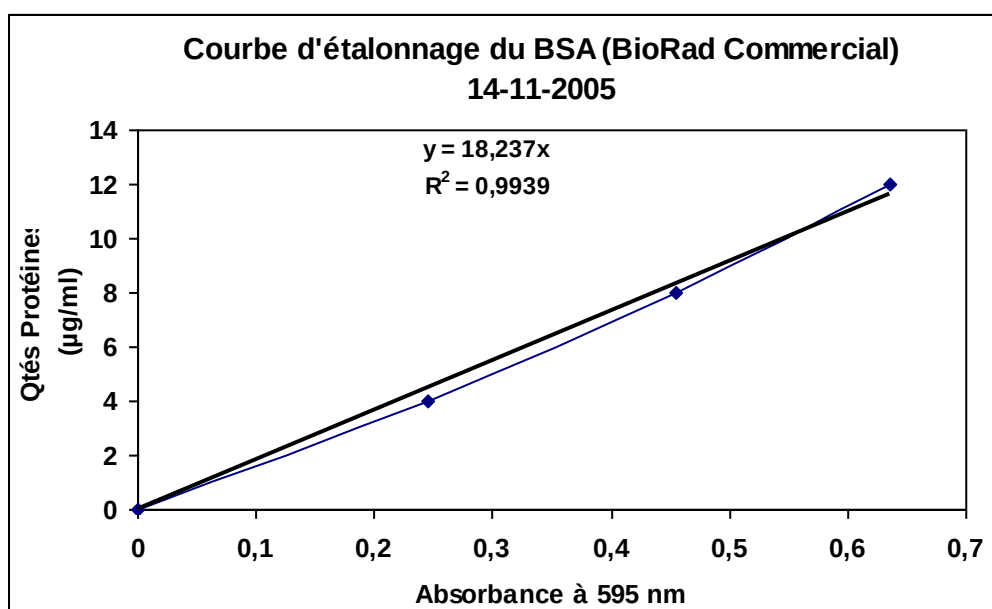
d : dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel ;



Appendice 3 : Courbe d'étalonnage du BSA (quantité de protéines).

La quantité de protéine est définie à partir de la DO_{595} . Une courbe d'étalonnage (0-14 $\mu\text{g/ml}$) BSA est réalisée dans les mêmes conditions. Nous en avons déduit que : 1 $\mu\text{g/ml}$ de BSA correspond à une DO_{595} de 18,237.

$$Qte (\mu\text{l/ml}) = \frac{DO_{595}}{Prise d'essai} * 18.237$$



Appendice 4 : Détermination des extrémités NH₂-terminales par la méthode d'Edman automatisée (dégradation d'Edman).

La séquence N-terminale de l'enzyme purifiée SAPHM est déterminée par la méthode d'Edman automatisée sur microséquenceur de protéines [234, 235]. Elle comporte les trois étapes classiques de séquençage, à savoir : le couplage, le clivage et la conversion.

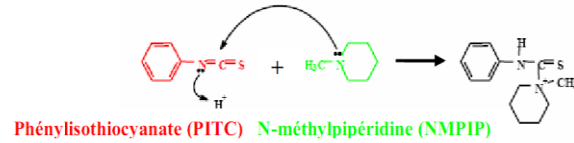
- **Couplage** : sous des conditions basiques, l'extrémité N-terminale de la protéine à séquencer est couplée avec le PhénylIsoThioCyanate (PITC) pour donner le PhénylThioCaramyl (PTC)-polypeptide.

- **Clivage** : la liaison peptidique entre le résidu protéique et le PTC subit un clivage acide, ce qui mène à la libération de l'AnilinoThiazolinone (ATZ-Aa), dérivé instable du résidu en question.

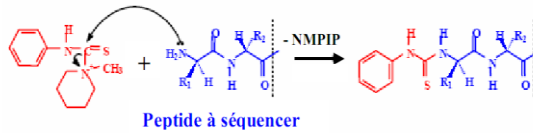
- **Conversion** : L'ATZ-Aa est converti en un dérivé d'acide aminé stable, le PhénylThiohydantoin d'acide aminé (PTH-Aa).

A la fin de chaque cycle, le PTH-acide aminé est identifié par HPLC sur C18.

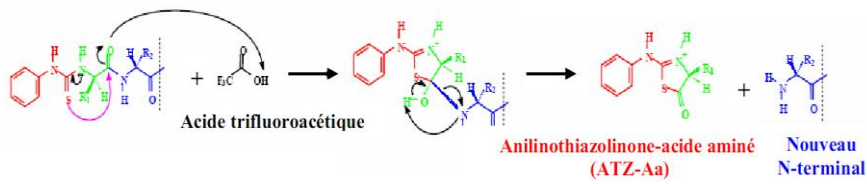
Etape 1 : Couplage du phénylisothiocyanate (PITC) au N-méthylpiperidine (NMPIP : base)



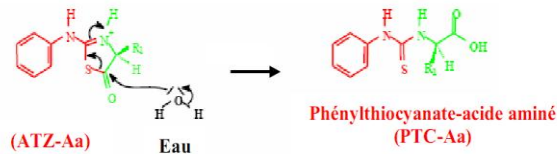
Etape 2 : Couplage du PITC-base au peptide



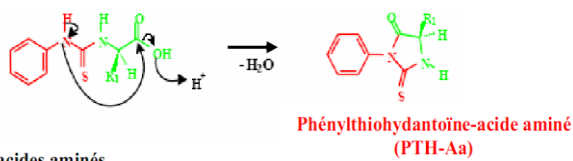
Etape 3 : Clivage de l'acide aminé N-terminal modifié par l'acide trifluoroacétique



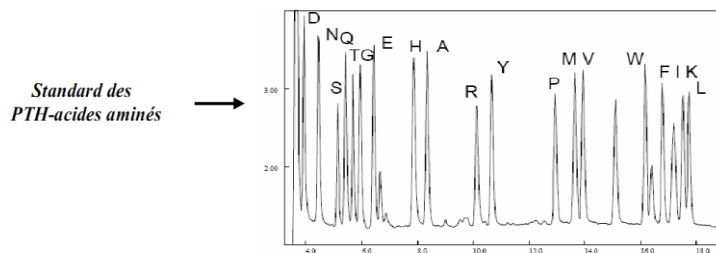
Etape 4 : Conversion de l'ATZ-acide aminé en PTC-acide aminé



Etape 5 : Conversion du PTC-acide aminé en PTH-acide aminé



Etape 6 : Analyse des PTH-acides aminés



Dégradation chimique d'EDMAN automatisée sur microséquenceur de protéines [234, 235].

Appendice 5 : Détermination de poids moléculaire par spectroscopie de masse (MALDI-TOF)

La spectrométrie de masse permet non seulement de déterminer la masse des produits étudiés, en mélange ou purifiés, mais également de contrôler les modifications posttraductionnelles des molécules et de donner leur élément de structure extrêmement sensible. Dans le cas particulier des peptides, cette méthodologie permet dans certaines conditions d'obtenir des éléments de la séquence en acide aminés. Il existe deux méthodologies complémentaires en spectrométrie de masse pour l'étude des molécules biologiques : l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) couplée à un analyseur de masse de type temps de vol (TOF), très efficace pour l'étude directe d'un mélange de produits, et l'ionisation par électroébulisaison (ESI) couplée à des analyseurs de masse de type quadripolaire et temps de vol (Qq-TOF). Cette technique permet l'interfaçage entre la séparation chromatographique en phase liquide et le spectromètre de masse.

La faible taille de la protéine considérée dans cette étude nous permet de fournir nos échantillons sous 2 formes :

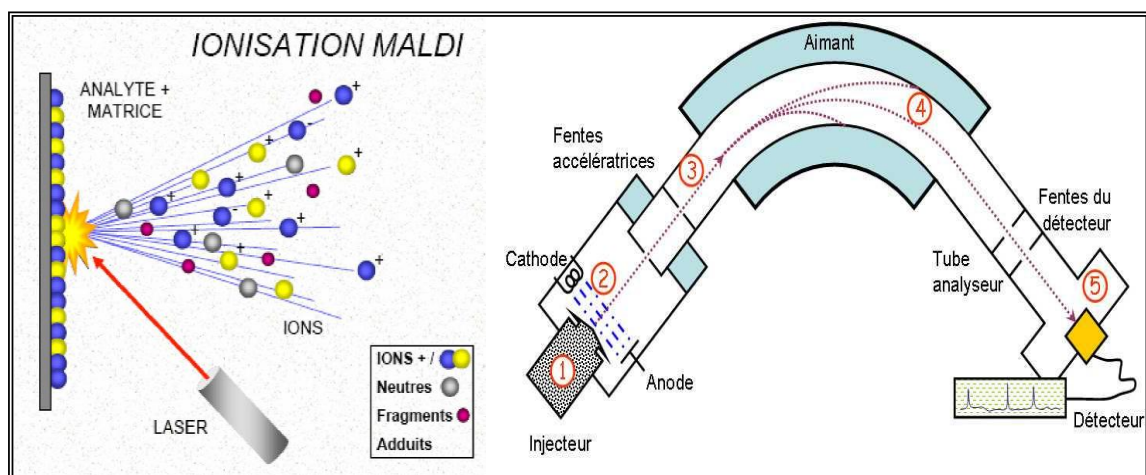
1. en solution, ce qui permet de mesurer la masse totale de nos protéines.
2. sur gel d'acrylamide, après migration, ce qui permet de fournir une protéine pure avec moins de molécules parasitant le signal de spectrométrie (Tris notamment). Cette forme nécessite une digestion préalable à la trypsine, permettant de traiter des fragments de plus petite taille.

Cette technique nécessite d'avoir un tampon pauvre en ion Cl et des concentrations de l'ordre de 5 pmol/μl. En solution ou emprisonnée dans un gel d'électrophorèse, la protéine sera diluée dans un tampon acétate d'ammonium et clivée enzymatiquement (par la trypsine) puis l'hydrolysate final est déposé sur la plaque du MALDI-TOF et mélangé à une solution d'acide alpha cyano-4-hydroxycinnamique. Les différentes étapes peuvent être énumérer comme suit :

1. Après coloration au bleu de commassie G-250, les bandes protéiques d'intérêt sont découpées du gel.
2. Laver les bandes avec un mélange d'acétonitrile/50 mM hydrogencarbonate d'ammonium (v/v).

3. Digérer avec la trypsine pendant 16 h à 37 °C.
4. Arrêter la digestion par addition de 2 µl d'acide trifluoro-acétique (TFA).
5. Le produit de la digestion est par la suite analysé grâce à une matrice d'acide cyano-4 hydroxycinnamique (5 mg/ml) préparée dans 50 % d'acétonitrile contenant 0,1 % TFA.

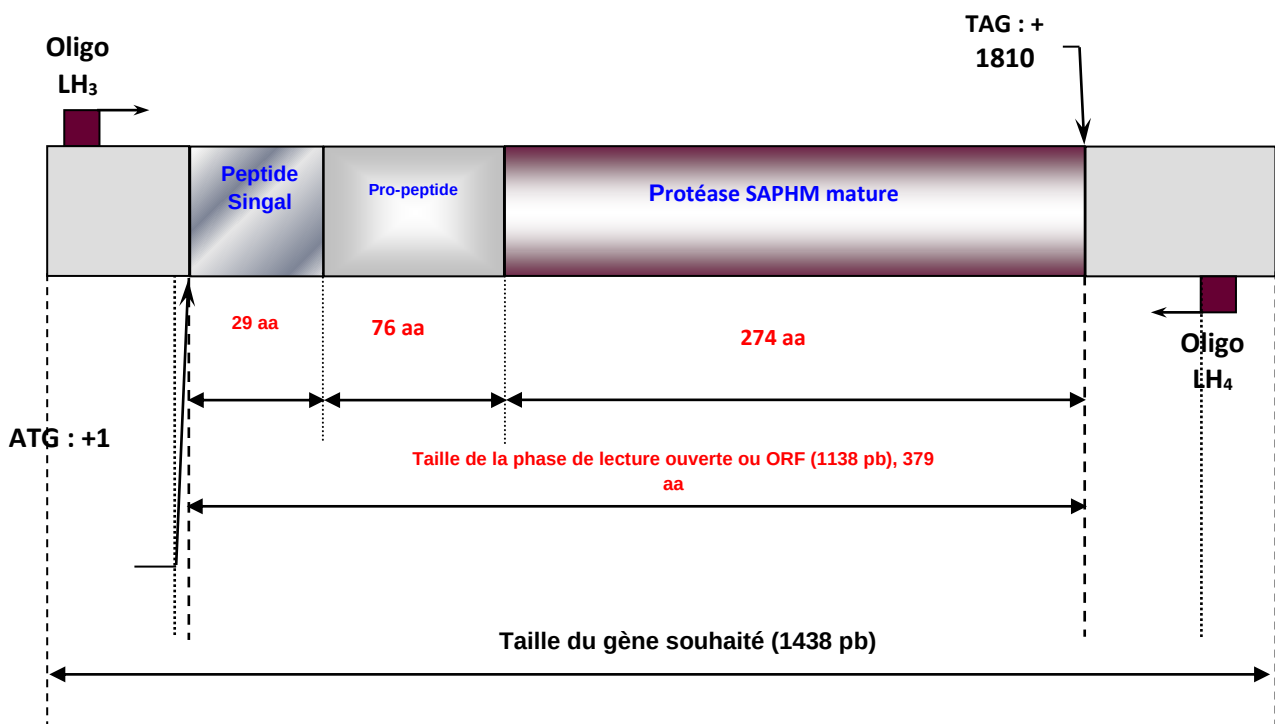
La taille des fragments protéiques sera ainsi déterminée par rapport à un étalon interne en utilisant le spectromètre de masse. Les valeurs expérimentales seront par la suite comparées avec celles contenues dans les banques de données pour identifier la protéine.



Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse. Sous l'impact du tir laser, l'échantillon **(1)** est introduit dans un faisceau d'électrons **(2)** et est désorbé sous vide (environ $5 \cdot 10^{-7}$ bar) et les molécules sont ionisées. Les ions obtenus **(3)** sont déviés par un aimant **(4)** et se séparent donc selon leur rapport masse/charge. À charge identique, les ions trop légers ou trop lourds sont déviés et ne seront pas détectés. Les ions de masse attendue sont comptés par un détecteur **(5)** [99].

Appendice 6 : Localisation des amorces F-LH10, R-LH11, F-LH12 et R-LH13 dans le gène de la protéase alcaline (nommé sapHM) de *Bacillus licheniformis* K7A.

Ces amorces (F-LH10, R-LH11, F-LH12 et R-LH13) ont été choisies grâce au logiciel DNACLUB en se basant sur la séquence du gène codant pour la protéase SAPB de *Bacillus pumilus* CBS [260] et de la protéase DHAP de *Bacillus pumilus* UN-31-C-42 [296]. Les amorces (TBAi1 et TBAi2) ont été choisies comme étant des amorces internes afin de séquencer la totalité de l'ORF du gène *sapDZ*. Elles ont été testées par le programme BLAST du site NCBI pour écarter tout risque d'hybridations non spécifiques. Les conditions de la réaction PCR sont celles décrites par Huang et al. [310]. Une optimisation des conditions expérimentales et des concentrations des différents réactifs s'est avérée indispensable pour obtenir une amplification spécifique.



Appendice 7 : Composition des milieux.

Les milieux de notre travail sont :

➔ Milieu LB liquide (g/L) :

10 g peptone

5 g extrait de levure

5 g NaCl

➔ Milieu LB solide (g/L) :

C'est la même composition de milieu LB liquide juste on ajoute 15 g d'aggar.

➔ Gélose nutritive au lait -GNL- :

5 g peptone

3 g extrait de levur e

15 g aggar

250 mL du lait écrémé

750 mL

➔ Milieu initial liquide –non optimisé- (g/L) :

10 g caséine ; 2 g extrait de levure ; 2 g CaCl_2 ; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,5 g KH_2PO_4 ; 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 2% (v/v) d'oligoéléments/ pH 7,4.

➔ Milieu optimisé (g/L) :

10 g caséine ; 5 g nitrate d'ammonium ; 2 g CaCl_2 ; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,5 g KH_2PO_4 ; 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 2% (v/v) d'oligoéléments/ pH 10.

Productions scientifiques

- ➡ Publication
- ➡ Brevet d'invention
- ➡ Liste des communications

Liste des travaux et manifestations scientifiques de recherche doctorale



I- LISTE DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES DANS LE CADRE DE LA THESE

I-1- Publications dans des revues Internationales avec comité de lecture et IF

1. **Raziga Hadjidi**, Abdelmalek Badis, Sondes Mechri, Kamel Eddouaouda, Lamia Khelouia, Rachid Annane, Mohamed El Hattab & Bassem Jaouadi. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* K7A. ***International Journal of Biological Macromolecules***. Accepted Manuscript 30 Mars 2018 (IF 2017 = 4,784).

I-2- Brevets d'invention INNORPI à l'échelle Internationale

1. **Raziga Hadjidi**, Sondes Mechri, Kamel Eddouaouda, Abdelmalek Badis, Mohamed El Hattab, Mouna Ben Elhoul, Maroua Omrane Benmrad, Nadia Zaraï Jaouadi, Hatem Rekik, Samir Bejar & Bassem Jaouadi. Production, purification et caractérisation biochimique et moléculaire d'une nouvelle protéase nommée SAPHM de la souche K7A de *Bacillus licheniformis*, candidate pour la formulation des détergents et la synthèse peptidique. Brevet d'Invention INNORPI Tunisie N° de dépôt **TN2018/0018** du 10 Janvier 2018.

Propriétaire : Centre de Biotechnologie de Sfax « CBS » Tunisie.



Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A

Raziqa Hadjidj^{a,b,c}, Abdelmalek Badis^{a,c,*}, Sondes Mechri^b, Kamel Eddouaouda^a, Lamia Khelouia^a, Rachid Annane^c, Mohamed El Hattab^a, Bassem Jaouadi^{b,**}

^a Laboratory of Natural Products Chemistry and Biomolecules (LNPC-BioM), Faculty of Sciences, University of Blida 1, Road of Soumaâ, PO, Box 270, 09000 Blida, Algeria

^b Laboratory of Microbial Biotechnology and Engineering Enzymes (LMBEE), Centre of Biotechnology of Sfax (CBS), University of Sfax, Road of Sidi Mansour Km 6, PO, Box 1177, Sfax 3018, Tunisia

^c National Centre for Research and Development of Fisheries and Aquaculture (CNRDPA) 11, Bd Amirouche PO Box 67, Bou Ismail, 42415, Tipaza, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2018

Received in revised form 26 March 2018

Accepted 27 March 2018

Available online 30 March 2018

Keywords:

Bacillus licheniformis

Alkaline protease

Detergent formulation

Peptide biocatalysis

Expression

Recombinant enzyme

ABSTRACT

A novel extracellular alkaline protease, called SAPHM, from *Bacillus licheniformis* strain K7A was purified by four steps procedure involving heat treatment (30 min at 70 °C) followed by ammonium sulfate precipitation (40–70%)-dialysis, UNO Q-12 FPLC, and ZORBAX PSM 300 HPLC, and submitted to biochemical characterization assays. The purified enzyme is a monomer of molecular mass of 30,325.12 Da. It was completely inhibited by phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and diiodopropyl fluorophosphates (DFP), which strongly suggested its belonging to the serine protease family. Its sequence of the 26 NH₂-terminal residues showed high homology with those of *Bacillus* proteases. The purified enzyme was optimally active at pH 10 and temperature 70 °C. Its catalytic efficiency was higher than those of Alcalase and Thermolysin. SAPHM exhibited excellent stability to detergents and wash performance analysis revealed that it could remove blood-stains effectively. Data suggest also that SAPHM may be considered as potential candidate for future applications in non-aqueous peptide biocatalysis because it possesses an elevated organic solvent resistance. The *sapHM* gene encoding SAPHM was cloned, sequenced, and expressed in *Escherichia coli* strain BL21(DE3)pLysS. The biochemical properties of the extracellular purified recombinant enzyme (rSAPHM) were similar to those of native one. The deduced amino acid sequence showed strong homology with other *Bacillus* proteases. The highest sequence identity value (97%) was obtained with APRMP1 protease from *Bacillus licheniformis* strain MP1, with only 9 aa of difference.

© 2018 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Microorganisms are found in practically every habitat present on the planet. They have evolved to survive in extraordinarily diverse environments, including extreme, hostile, or otherwise intolerant ecological systems. In addition to occupying a unique niche within an ecosystem, microbes adapt to the microenvironments that can be distinguished from the immediate surroundings by such as high temperatures in desert biotope. Many investigations focused on their potential as sources of highly active enzymes “extremozymes” such as proteases [1,2], chitinases [3], and amylases [4]. Among those biocatalysts, proteases break down the bonds by a process known as hydrolysis and convert

proteins into smaller chains called peptides or even smaller units called amino acids. They are divided roughly into two categories, exopeptidase and endopeptidase, in terms of its distinct modes of catalysis. As a ubiquitous enzyme, proteases are produced by many species, including animals, plants and microorganisms. Of these, proteases from microorganisms are preferred because of their plasticity for genetic manipulation and potential for economical bulk production [5].

Microbial proteases have particularly been reported to constitute a resourceful class of enzymes with a diverse array of applications in industries and scientific research. They constitute one of the commercially important groups of enzymes, accounting for nearly 65% of the whole enzyme market and are frequently used in detergent [6], peptide synthesis [7], as well as leather [8], photographic, textile, silk, bakery, dairy, and bioremediation [9]. Proteases represent one of the major groups of industrial enzymes and a number of detergent stable proteases have been isolated and characterized because of its widespread use in detergent formulations [10].

The industrial demand of highly active preparations of proteolytic enzymes with appropriate specificity and stability to pH, temperature, metallic ions, surfactants, and organic solvents continues to stimulate

* Corresponding author at: Laboratory of Natural Products Chemistry and Biomolecules (LNPC-BioM), Faculty of Sciences, University of Blida 1, Road of Soumaâ, PO Box 270, 09000 Blida, Algeria.

** Corresponding author at: Laboratory of Microbial Biotechnology and Engineering Enzymes (LMBEE), Centre of Biotechnology of Sfax (CBS), University of Sfax, Road of Sidi Mansour Km 6, PO Box 1177, Sfax 3018, Tunisia.

E-mail addresses: badisabdelmalek@yahoo.fr, (A. Badis), bassem.jaouadi.cbs.mrt.tn@gmail.com, bassem.jaouadi@cbs.mrt.tn (B. Jaouadi).

the search for new enzyme sources. Proteases with high activity and stability in high alkaline range and high temperatures are interesting for bioengineering and biotechnological applications. Nowadays, the use of alkaline protease-based detergents is preferred over the conventional synthetic ones [11,12]. This is partly because of their better cleaning properties, higher performance efficiency at lower washing temperature, and safer/healthier dirt removal conditions [13]. Typically, a detergent protease needs to be active, stable, and compatible with the alkaline environment encountered under harsh washing conditions (pH 9–11, temperature of 20–60 °C, and high concentrations of salt, bleach, and surfactant). The alkaline proteases that are particularly preferred in contemporary detergent formulations include Savinase™ (Subtilisin 309), Subtilisin Novo (BPN'), Alcalase™ (Subtilisin Carlsberg), Maxacal™ (Novozymes A/S, Denmark), BLAP S^b (Henkel, Germany), and Properase™ (Genecor Int. USA). They are often reported to be stable at conditions of elevated temperatures and pH. Most of them, however, are criticized for their limited efficiency in the presence of liquid or solid laundry detergents wherein their stability decreases [14,15]. Therefore, the search for and screening of alternative microorganisms that produce detergent-stable enzymes and preserve their high activity and stability at extreme conditions would be of paramount importance.

This is why several efforts worth while to screen microbes from new habitats for proteases with high activity and stability at extreme conditions to meet the needs of rapidly growing detergent industry and peptide synthesis. High-alkaline serine proteases have been successfully applied to facilitate the release of proteinaceous materials in stains such as those of chocolate and blood [16]. They are also subject to extensive protein engineering efforts to improve their stability and performance [17]. Most enzymes, including proteases from thermophiles can also be used for peptide synthesis under harsh operational conditions in the presence of organic solvents [18]. Increasing attention has therefore been given to the search for solvent-stable proteases [1,19].

In this study an attempt was made for, the purification, biochemical, and molecular characterization of an extracellular alkaline protease named SAPHM secreted from the culture supernatant of the thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* strain K7A, isolated from the Hassi Messaoud region, of the Algerian desert to find its suitability as non-aqueous peptide biocatalysis and detergent bioadditive. The nucleotide and amino acid sequences, cloning, and expression of the encoding gene (*sapHM*) were also determined.

2. Materials and methods

2.1. Substrates, chemicals, and used comparative proteases

All substrates and chemicals used in this investigation were reagent grade unless specified otherwise. General reagents were obtained from commercial suppliers. The Alcalase Ultra 2.5 L, a commercial bacterial protease/peptidase complex was supplied by Novozymes Biopharma DK A/S (Bagsvaerd, Denmark). It is produced by submerged fermentation of a selected strain of *Bacillus licheniformis*. The Thermolysin type X, a commercial thermostable extracellular metallo-endopeptidase from *Geobacillus stearothermophilus*, was purchased from Sigma-Aldrich Inc. Fluka, Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Source of sampling, isolation, and cultivation of microorganisms

Soil samples were collected from the crude-oil-contaminated soil in desert of Hassi Messaoud region, Southeast of Ouargla in Algeria (GPS coordinates: 6° 04' 21" East, 31° 40' 57" North) in order to isolate protease-producing microorganisms. The samples were then dispersed in sterile distilled water and heated 80 °C for 30 min to kill vegetative cells. The heat-treated samples were then plated onto skimmed milk agar plates containing (g/L): peptone 5, yeast extract 3, skimmed milk 250 mL, and bacteriological agar, 15 at pH 10. The plates were incubated

at 45 °C for 12 h in order to obtain colonial growth. The colonies with a clear zone formed by the hydrolysis of milk casein were evaluated as protease producers. Based on its highest protease activity, a bacterium called K7A was selected and retained for further experimental work.

2.3. Enzyme production

The alkaline protease from strain K7A was produced at pH 10 using the optimized medium composed of: casein 10 g, NH₄NO₃ 5 g, CaCl₂ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, 2% (v/v) trace elements [composed of (g/L): ZnCl₂, 0.4; FeSO₄·7H₂O, 2; H₃BO₃, 0.065; and MoNa₂O₄·2H₂O, 0.135], and 1,000 mL distilled water. The flasks were incubated at 45 °C for 72 h with shaking at 200 rpm. Before each assay, the cell debris was removed by centrifugation at 14,000g for 30 min. Next, the obtained clear supernatant was used as a crude enzyme preparation.

2.4. Strain identification and molecular phylogenetic analysis

Analytical profiling index (API) strip tests and 16S rRNA gene sequence analyses were carried out to identify the genus to which the K7A strain belonged. The nature of Gram staining, motility in hanging drop preparations, and physiological and biochemical characteristics of the strain were investigated using API 50 CH strip in accordance with the manufacturer's instructions (bioMérieux, SA, Marcy-l'Etoile, France). The 16S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using two universal primers: forward 27F, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', and reverse 1525R, 5'-AAGGAGGTGATCCAAGCC-3', designed from base positions 8 to 27 and 1541 to 1525, respectively, which were the conserved zones within the rRNA operon of *E. coli* [20]. The genomic DNA of the K7A strain was purified using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) and then used as a template for PCR amplification (35 cycles, 94 °C for 30 s denaturation, 61 °C for 45 s primer annealing, and 72 °C for 60 s extension). The amplified ~1.5 kb PCR product was then cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA), leading to the pHL-16S plasmid (This study). The *E. coli* DH5α (F[−] *supE*44 Φ 80 Δ *lacZ* Δ *M15* Δ (*lacZYA-argF*) *U169 endA1 recA1 hsdR17* (*r_k[−]*, *m_k[−]*) *deoR thi-1 λ [−] gyrA96 relA1*) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as a host strain. All recombinant clones of *E. coli* were grown in LB broth media with the addition of ampicillin (100 µg/mL), isopropyl-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) (160 µg/mL), and X-gal (360 µg/mL) for screening. DNA electrophoresis, DNA purification, restriction, ligation, and transformation were all performed in accordance with the method of Sambrook et al. [21].

2.5. Assay of proteolytic activity

The protease activity was assayed by a modified caseinolytic Mechri's method protocol using Hammerstein casein (Merck, Darmstadt, Germany) as a substrate [1]. Unless otherwise stated, a suitably diluted enzyme solution (0.5 mL) was mixed with 2.5 mL 100 mM glycine-NaOH buffer at pH 10 supplemented with 2 mM CaCl₂ (Buffer A) containing 10 g/L casein, and incubated for 15 min at 70 °C. The reaction was stopped by adding 2.5 mL 20% trichloroacetic acid. The mixture was left at room temperature for 30 min, and the precipitated proteins (non-digested) were removed by centrifugation at 10,000 rpm for 20 min. Afterwards, 0.5 mL of the clear supernatant were mixed with 2.5 mL 500 mM Na₂CO₃ and 0.5 mL Folin-Ciocalteu's phenol reagent, followed by incubation at room temperature for 30 min. The absorbance of the resulting supernatant was measured at 660 nm against a blank control. Unit of caseinolytic activity was defined as the amount of the enzyme yielding the equivalent of 1 µg of tyrosine per minute under the defined assay conditions.

The proteolytic activity present in the laundry detergent solution was evaluated by the method suggested by Boulkour Touiou et al.

[22] using *N,N*-dimethylated casein (DMC) as a substrate. Unless otherwise stated, enzyme solution (0.5 mL) suitably diluted was mixed with 1 mL laundry detergent, 2 mL 50 mM Borate-NaOH buffer (pH 9) containing 0.4% DMC and 0.25 mL of 5% 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBSA) as a colour indicator. The mixture was shaking-incubated at 40 °C for 30 min followed by the addition of a 2.5 mL of cold water for 15 min to stop the reaction and then centrifuged at 10,000 g for 15 min to remove the precipitate. Absorbance was spectrophotometrically measured at 450 nm. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to catalyze the liberation of 1 μ mole of peptide bond from DMC per min under the experimental conditions used.

2.6. SAPHM purification procedure

Five hundred millilitres of a 24 h-old culture of the *Bacillus licheniformis* strain K7A were centrifuged for 30 min at 14,000 g to remove microbial cells. The supernatant containing extracellular protease was used as the crude enzyme preparation and submitted to the following purification steps. The clear supernatant was heat-treated for 30 min at 70 °C, and insoluble material was removed by centrifugation at 9,000 g for 20 min. The supernatant was precipitated between 40 and 70% ammonium sulfate saturation. The precipitate was then recovered by centrifugation for 20 min at 9,000 g, resuspended in a minimal volume of 25 mM citric acid buffer at pH 6 containing 2 mM CaCl₂ (Buffer B), and dialyzed overnight against repeated changes of buffer B. Insoluble material was removed by centrifugation for 20 min at 9,000 g. The clear supernatant was loaded and applied to FPLC using UNO Q-12 column (15 mm $\times$ 68 mm) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) equilibrated with buffer B. The column was rinsed with 500 mL of the same buffer. Adsorbed material was eluted with a linear NaCl gradient (0–500 mM) in buffer B at a rate of 60 mL/h. The fractions containing protease activity were pooled and then applied to HPLC system using a ZORBAX PSM 300 HPSEC (6.2 mm $\times$ 250 mm) (Agilent Technologies, Lawrence, Kansas, MO, USA), pre-equilibrated with 25 mM MOPS buffer at pH 7.4 supplemented with 2 mM CaCl₂ (Buffer C). Proteins were separated by isocratic elution at a flow rate of 30 mL/h with buffer C and detected using a UV/VIS Spectrophotometric detector at 280 nm. The fractions were collected manually and analyzed by measuring absorbance at 280 nm for protein content and the proteolytic activity on casein at 600 nm. Pooled fractions containing protease activity were concentrated in centrifugal microconcentrators (Amicon Inc., Beverly, MA, USA) with 10 kDa cut off membranes and stored at –20 °C in a 20% glycerol (v/v) solution and then used for the determination of the biochemical properties.

2.7. Proteins measurement, electrophoresis, and analytical methods

Protein concentration was determined at 595 nm using a Dc protein assay kit purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) based on the method of Bradford [23]. The total protein concentration of the enzyme solution was estimated from a calibration curve that was constructed using bovine serum albumin (BSA). Analytical sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using 10% (w/v) acrylamide in gels as described by Laemmli [24]. The protein bands were visualized with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) staining. Low molecular weight markers (LMW) from Amersham Biosciences were used as protein marker standards (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany). Casein zymography staining was performed as described by Jaouadi et al. [17]. The molecular mass of purified SAPHM was determined by MALDI-TOF/MS using a Voyager DE-RP instrument (Applied Biosystems/PerSeptive Biosystems, Inc., Framingham, MA, USA).

2.8. Amino acid sequencing

Sequencing Bands of purified SAPHM enzyme were separated on SDS gels and transferred to a ProBlott membrane (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the NH₂-terminal sequence analysis was performed by automated Edman's degradation using a protein sequencer (Applied Biosystems Protein sequencer ABI Procise 492/610A) equipped with 140C HPLC system per standard operating procedures. Amino acid residues were detected as individual signals.

2.9. Biochemical characterization of the purified protease

2.9.1. Effects of inhibitors, reducing agents, and metallic ions on protease stability

The effects of PMSF; DFP; soybean trypsin inhibitor (SBTI); $N\alpha$ -*p*-tosyl L-lysine chloromethyl ketone (TLCK); $N\alpha$ -*p*-tosyl L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK); benzamidinium hydrochloride hydrate; 5,5'-dithio-bis-2-nitro benzoic acid (DTNB); *N*-ethylmaleimide (NEM); iodoacetamide; leupeptin; pepstatin A; ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA); and ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), as well as various divalent metallic ions on protease stability were investigated by pre-incubating the purified enzyme for 1 h at 40 °C with each additive. Enzyme assays were carried out under standard assay conditions.

2.9.2. Determination of the optimum pH and stability

The effect of pH was determined over the pH range of 3–13 using casein as a substrate at 70 °C. The pH stability of SAPHM was determined by pre-incubating the enzyme in buffer solutions with different pH values for 24 h at 40 °C. Aliquots were then withdrawn, and residual enzymatic activities were determined under standard assay conditions. The following buffer systems, supplemented with 2 mM CaCl₂, were used at 50 mM: glycine-HCl for pH 2–5, MES for pH 5–6, HEPES for pH 6–8, Tris-HCl for pH 8–9, glycine-NaOH for pH 9–11, bicarbonate-NaOH for pH 11–11.5, Na₂HPO₄-NaOH for pH 11.5–12, and KCl-NaOH for pH 12–13.

2.9.3. Determination of optimum temperature and thermostability

The effect of temperature on SAPHM activity was examined at 30–90 °C and pH 10 for 15 min using casein as a substrate. Thermostability was determined by incubation at 70 °C, and 80 °C for 24 h at pH 10 in the presence and absence of 2 mM CaCl₂. Aliquots were withdrawn at specific time intervals to test the remaining activity under described standard conditions. The non-heated enzyme, which was cooled on ice, was considered as control (100%).

2.9.4. Effect of polyols on protease thermostability

To study the influence of polyols on thermostability, the SAPHM was pre-incubated for 1 h at 80 °C in the presence and absence of some polyols, at 100 g/L of concentration, such as: propylene glycol (PEG) 1,000; PEG 1,500; PEG 6,000; sorbitol; glycerol; mannitol; and xylitol and for 24 h at 80 °C in the presence or absence of 2 mM CaCl₂ and/or 100 g/L sorbitol. Aliquots were withdrawn at desired time intervals to test the remaining activity under standard conditions.

2.9.5. Substrate specificity profile of SAPHM

The substrate specificity profile of SAPHM was determined using natural (casein, albumin, gelatin, ovalbumin, and keratin) and modified (azocasein, albumin azure, keratin azure, and collagen types I and II) protein substrates as well as esters [*N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTee), *N*-acetyl-L-tyrosine ethyl ester monohydrate (ATEE), *N*-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE), *S*-benzyl-L-cysteine ethyl ester hydrochloride (BCEE), and $N\alpha$ -*p*-tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME)], and synthetic peptides [*N*-succinyl-L-Phe-*p*-nitroanilide, *N*-benzoyl-L-Tyr-*p*-nitroanilide, *N*-acetyl-L-Leu-*p*-nitroanilide, L-Met-*p*-nitroanilide, L-Pro-*p*-nitroanilide trifluoroacetate salt, *N*-acetyl-L-Ala-*p*-nitroanilide, L-

Val-*p*-nitroanilide hydrochloride, *N*-benzoyl-L-Arg-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl-L-Tyr-L-Leu-L-Val-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Ala-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Phe-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Val-*p*-nitroanilide, *N*-benzoyl-L-Phe-L-Val-L-Arg-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl-L-Phe-L-Ala-L-Ala-L-Phe-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Val-L-Ala-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl-L-Leu-L-Leu-L-Val-L-Tyr-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Met-*p*-nitroanilide, *N*-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Leu-*p*-nitroanilide, and *N*-acetyl-L-Tyr-L-Val-L-Ala-L-Asp-*p*-nitroanilide] substrates. Enzymatic activities were determined on each substrate according to standard conditions previously described by Zarái Jaouadi et al. [25].

2.10. Performance evaluation of the purified proteases

2.10.1. Kinetic measurements of SAPHM, Alcalase Ultra 2.5 L, and Thermolysin type X

Kinetic parameters were calculated from the initial rate activities of the purified enzymes using casein at different concentrations ranging from 0.10 to 10 mM at 70 °C and pH 10 for 10 min. The purified enzymes were, SAPHM (This study), Alcalase Ultra 2.5 L (commercial enzyme), and Thermolysin type X (commercial enzyme), at a final concentration of proteins 1.5 mg/mL. Each assay was carried out in triplicate, and kinetic parameters were estimated by Lineweaver-Burk plots. Kinetic constants, Michaelis-Menten constant (K_m), and maximal reaction rate (V_{max}) values were obtained using the Hyper32 software.

2.10.2. Effect of organic solvents on stability of SAPHM and Thermolysin type X

Various organic solvents, with different Log *P* values at 50% (v/v), were tested by shaking at 200 strokes per min and 37 °C for 72 h to evaluate their effects on SAPHM and Thermolysin type X protease stabilities. The relative and residual caseinolytic activities were assayed under each assay condition at 70 °C and pH 10 (for SAPHM) and at 60 °C and pH 8 (for Thermolysin type X). The activity of the enzyme without any organic solvent was taken as 100%.

2.10.3. Stability and compatibility of SAPHM and Alcalase Ultra 2.5 L with laundry detergents

The stability and compatibility of purified SAPHM and Alcalase Ultra 2.5 L enzymes with currently commercialized liquid and solid detergents were investigated. The liquid detergents used in this study included Pril-iSiS (Henkel, Algiers, Algeria), Ariel (Procter & Gamble, Switzerland), Nadhif (Henkel-Alki, Tunisia), OMO, and Skip (Unilever, France). The solid detergents included, Tide (Procter & Gamble, Switzerland), Dixon (Henkel, France), Dipex (Klin Productions, Sfax, Tunisia), Judy (Ennadhafa, Sfax, Tunisia), and Detch (SOTUP, Sfax, Tunisia).

In order to investigate their stability and compatibility, the mentioned commercial detergents were diluted in tap water so as to give a final concentration of 7 mg/mL (to simulate washing conditions). The endogenous proteases contained in those laundry detergents were inactivated by heating the diluted detergents for 1 h at 70 °C prior to the addition of the purified SAPHM enzyme. After the treatment, the purified SAPHM and Alcalase Ultra 2.5 L enzymes were pre-incubated for 1 h at 40 °C to investigate the effect of its stability and compatibility with the modified laundry detergents and the residual activity was determined at pH 10 and 70 °C. The enzymatic activity of a control (without any detergent), incubated under similar conditions, was taken as 100%.

2.10.4. Removal of blood stain from cotton fabrics

New white cotton cloth pieces (4 cm × 4 cm) were stained with blood stains and used to simulate the washing condition and determine the efficiency of SAPHM as a biode detergent additive compared to the commercially protease Alcalase Ultra 2.5 L. The endogenous proteases contained in Pril-iSiS liquid laundry detergent were inactivated by

heating the diluted detergents for 1 h at 70 °C prior to the addition of the purified tested enzymes. The stained cloth pieces were shake-incubated (250 rpm) in different wash treatments at 40 °C for 1 h in 1-L beakers containing a total volume of 100 mL of: Tap water, Pril-iSiS detergent (7 mg/mL, in tap water), and detergent added with SAPHM (500 U/mL) or Alcalase Ultra 2.5 L (500 U/mL). After treatment, the cloth pieces were taken out, rinsed with water, dried and submitted to visual observation to examine the stain removal effects of the enzymes. The untreated blood-stained piece of cloth was taken as a control.

2.11. Molecular cloning and heterologous expression of the *sapHM* gene

2.11.1. Genomic DNA extraction of strain K7A and gene cloning of the protease

The preparation of plasmid DNA, digestion with restriction endonucleases, and separation of fragments by agarose gel electrophoresis were performed using general molecular biology techniques as described by Sambrook et al. [21]. Two external oligonucleotides were synthesized based on the high degree of sequence homology published for the alkaline proteases from *Bacillus licheniformis* strain NH1 [26] and *Bacillus licheniformis* strain MP1 [27] used for the isolation and determination of the *sapHM* encoding gene sequence. The complete *sapHM* gene and its flanking regions were amplified using the upstream primer F-LH10 (5'-GTGCTAAGACAGTTATTAATAACC-3') and downstream primer R-LH11 (5'-TCAAGATTTTAAATACGGCCATCC-3') to generate an approximately 1.4 kb PCR fragment using genomic DNA from *Bacillus licheniformis* strain K7A as a template and DNA polymerase (*Pyrococcus furiosus* from Biotools, Madrid, Spain). The internal primers, namely forward primer F-LH12 (5'-CCGGATGTCGTTATGTGAAGAG-3') and reverse primer R-LH13 (5'-GTGTTCTCTGAAGATCCGCTCTTC-3'), were used to amplify and sequence the internal region of the *sapHM* gene (~0.5 kb). DNA amplification was performed with the TechnePrime G Gradient Thermal Cycler, 96 × 0.2 mL (Cole-Parmer International, Vernon Hills, IL, USA). The amplification reaction mixtures (100 µL) contained 30 pg of each primer, 300 ng of DNA template, amplification buffer, and 2 U of DNA polymerase. The cycling parameters used were 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, primer annealing at 56 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 90 s. The PCR products were then purified using an agarose gel extraction kit (Jena Bioscience, GmbH, Germany). The purified 1.4 kb PCR fragment was cloned in pCR-Blunt cloning vector into an *E. coli* BL21(DE3)pLysS [F[−] *ompT* *hsdSB*(rB[−], mB[−]) *gal dcm* (DE3) *pLysS* (CamR)] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) host strain. A clone was noted to harbor a plasmid called pLH4 (This study) and was, therefore, retained for further study. The pLH4 plasmid was digested with *EcoRI* restriction enzyme and used for expression studies. The resulting DNA fragment, which was noticed to harbor the *sapHM* encoding gene, was sub-cloned in the pTrc99A vector under the control of the inducible *Ptac* promoter that was previously digested with the *EcoRI* restriction enzyme leading to the pLH4 plasmid.

2.11.2. Recombinant enzyme localization and purification

After reaching an optical density of about 0.7, the production of enzyme from BL21(DE3)pLysS/pLH4 was induced by the addition of IPTG at a concentration of 5 mM. The protease crude extracts were prepared from the extracellular fraction [17].

2.11.3. DNA sequencing and bioinformatics analysis

The nucleotide sequences of the cloned 16S rRNA and *sapHM* genes were determined on both strands using BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kits and the automated DNA sequencer ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The RapidSeq36_POP6 run module was used, and the samples were analyzed using the ABI sequencing analysis software v. 3.7 NT. Internal primers were used to complete the sequence of the two genes. All sequencing data were assembled using the STADEN

(version 4.5; <http://www.mrcmb.cam.ac.uk/pubseq>) and DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, WI, US) software packages. The nucleotide sequences data were analyzed using the Softberry Gene Finding tool (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>).

The obtained sequences were compared with sequences available in the public sequence databases and with the EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>), a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S rRNA gene sequences from type strains. Phylogenetic and molecular evolutionary genetic analyses were performed using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software v. 4.1. Distances and clustering were calculated using the neighbor-joining method. The tree topology of the neighbor-joining data was evaluated by Bootstrap analysis with 100 re-samplings.

Multiple nucleotide sequence alignment was performed using the BioEdit version 7.0.2 software program. The promoter was predicted by Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). The signal peptide was predicted by SignalP version 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Protein functional analysis was performed with InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) and MEROPS Blast (<http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml>). The NH₂-terminal sequence was compared to those in the Swiss-Prot/TrEMBL database using homology search techniques (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Protein sequence alignment was carried out using the ClustalW2 program available at the European Bioinformatics Institute server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

2.12. Statistical analysis

All determinations were performed at least three independent replicates, and the control experiment without protease was carried out under the same conditions. The experimental results were expressed as the mean of the replicate determinations and standard deviation (mean $\pm$ SD). The results were considered statistically significant for *P* values of less than or equal to 0.05.

2.13. Nucleotide sequence accession numbers

The data reported in this work for the nucleotide sequences of the 16S rRNA (1502 bp) and *sapHM* (1438 bp) genes have been deposited in the GenBank/DBJ/EMBL databases under accession numbers **MG748549** and **MG753560**, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Screening of alkaline protease-producing bacteria

In the current study, about one hundred aerobic bacterial strains, isolated from the Algerian desert, were identified as protease producers based on their patterns of clear zone formation on protein-containing media. The ratio of the clear zone diameter and that of the colony served as an indicator for the selection of strains with high protease production ability. Using the ratio of the clear zone diameter (onto skimmed milk agar plates) and that of the colony, twenty proteolytic strains were isolated. Among them two isolates (K7A and K2B) exhibiting the highest ratio (> 4 mm) were tested for protease production in liquid culture. Among the two strains, K7A exhibited the highest ratio of 5.1 mm and the highest extracellular protease activity (about 12,500 U/mL) after 24 h incubation in an optimized medium (Fig. 1A) and was, therefore, retained for all subsequent studies.

3.2. Identification and molecular phylogeny of the microorganism

The identification of the newly isolated bacterium (called K7A) was built in the basis of both catabolic and molecular methods. According to the methods described in the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, the morphological, biochemical, and physiological characteristics

showed that the K7A isolate appeared in a bacilli form, and was an aerobic, spore-forming rods, Gram-positive, catalase-positive, oxidase-positive, motile, and colonies are round, undulate, dull white, and non-luminescent. The carbohydrate profile of the isolate was further investigated using API 50 CH gallery tests. The results showed that the strain metabolized citrate, malate, D-glucose, glycerol, L-arabinose, ribose, D-xylose, galactose, fructose, mannose, inositol, mannitol, cellobiose, maltose, sucrose, trehalose, D-turanose, D-tagatose, gluconate, lactate, L-aspartate, and L-glutamate are readily utilized as energy sources in addition to other simple sugars. Lactose, sorbitol, glycogen, L-xylose, xylitol, D-lyxose, D-arabinose, starch, adonitol, sorbose, erythritol, inulin, D-arabitol, L-arabitol, capric acid, adipic acid, phenyl acetic acid, propionate, and glycine are not utilized as energy sources. The 16S rRNA gene sequence from K7A was 99% similar to those of the *Bacillus licheniformis* strain NBRC 12197^T (accession no. AB680252) and *Bacillus licheniformis* strain ATCC 14580^T (accession no. AB039328). The phylogenetic trees (Fig. 1A) were then constructed using neighbor-joining methods and Jukes-Cantor distance matrices. Based on the results obtained in the course of the present study, the assignment of this isolate was suggested as *Bacillus licheniformis* strain K7A.

3.3. Purification of SAPHM enzyme

The culture supernatant containing extracellular protease (12,500 U/mL), in an optimized medium (Fig. 1B), was purified from the culture supernatant obtained by the centrifugation of a 24 h old culture of the *Bacillus licheniformis* strain K7A (Fig. 2A) using broth (500 mL) as a crude enzyme solution. The SAPHM enzyme was purified from the culture supernatant (1923 U/mg protein) by heat treatment (for 30 min at 70 °C) and ammonium sulfate precipitation (40–70%)-dialysis followed by FPLC (Fig. 2A) and HPLC (Fig. 2B) to obtain 42.5 fold enrichment and a specific activity of about 81,730 U/mg proteins at a yield of 34%. The results of the purification procedure are summarized in Table 1. In fact, the heat treatment is often used during the purification by assuring the elimination of contaminant proteins. So, thermostable enzymes are easy to purify by heat treatment [28]. Moreover, ammonium sulfate precipitation is mostly used during early stages of purification, considered as a crude separation step and is followed by a combination of chromatographic steps [29]. Data from various studies suggested that proteases had been purified with ammonium sulfate precipitation followed by HPLC [2,17]. The level of specific activity of SAPHM (81,730 U/mg) was significantly high compared to those previously reported for other protease confirmed the potential prospects in various biotechnological and industrial bioprocesses.

3.4. Molecular weight determination and NH₂-terminal amino-acid sequence determination of SAPHM

SDS-PAGE analysis revealed that the purified SAPHM enzyme was monomer, with an estimated molecular mass of 30 kDa (Fig. 2C). This preparation was a homogeneous enzyme with high purity as it exhibited a unique symmetrical elution peak with a retention time of 10.360 min, corresponding to a protein of nearly 30 kDa on HPLC gel filtration chromatography (Fig. 2B). MALDI-TOF/MS analysis confirmed that the purified SAPHM had an exact molecular mass of 30,325.12 Da (Data not shown). Zymogram activity staining revealed one zone of caseinolytic activity for the purified sample co-migrating with proteins with an estimated molecular mass of 30 kDa (Fig. 2D). These observations strongly suggest that SAPHM is a monomeric protein comparable to those reported for other *Bacillus* proteases. Similar molecular mass values (15–34 kDa) were reported for most microbial serine alkaline proteases [1,25,30]. Indeed, the molecular masses of alkaline proteases range from 15 to 30 kDa with few reports of higher molecular masses 51 kDa [2], 45 kDa [19], 55 kDa [31], and 71 kDa [32].

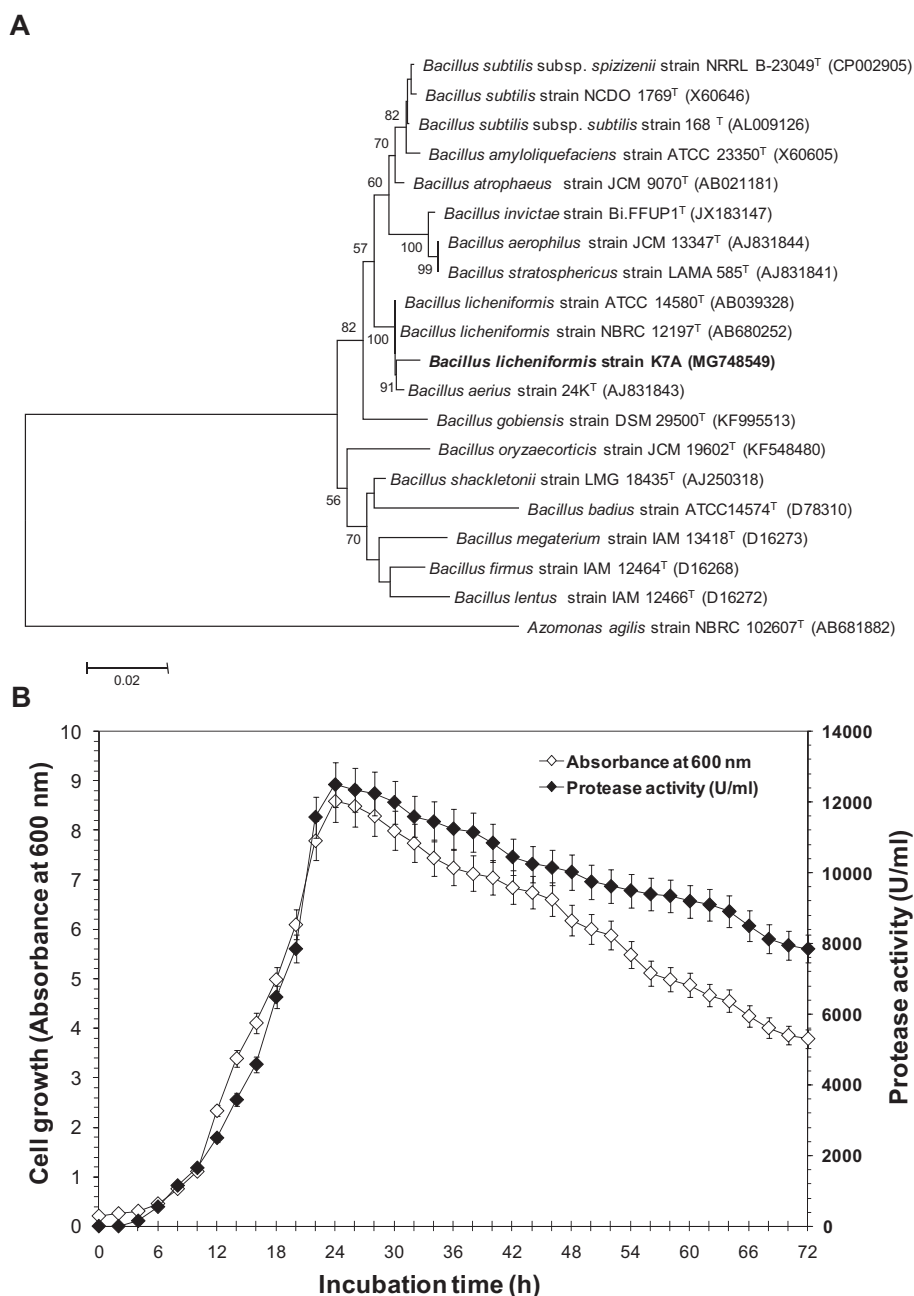


Fig. 1. (A) Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain K7A (accession n°. **MG748549**) within the radiation of the genus *Bacillus*. The sequence of *Azomonas agilis* strain NBRC 102607^T (accession n°. AB681882) was chosen as an outgroup. Bar, 0.05 nt substitutions per base. Numbers at nodes (> 50%) indicate support for the internal branches within the tree obtained by bootstrap analysis (percentages of 1,000 bootstraps). NCBI accession numbers are presented in parentheses. (B) Time course of *Bacillus licheniformis* strain K7A cell growth (◇) and protease production (◆) using casein as substrate. Cell growth was monitored by measuring the absorbance at 600 nm.

The NH₂-terminal sequencing of the blotted purified SAPHM allowed the identification of 26 residues, AQTVPQGIPLIKAQVQAQGFQDARV, showing uniformity, thus indicating that it was isolated in a pure form. A comparison of NH₂-terminal amino acid sequences of SAPHM proteases from *Bacillus* strains reported in previous study demonstrating that SAPHM is a new member of the serine protease family (Table 2).

3.5. Biochemical characterization of SAPHM enzyme

3.5.1. Effects of inhibitors and metallic ions on protease stability of SAPHM enzyme

To further identify the nature of the purified protease under investigation, the effects that natural and synthetic inhibitors, as well as chelating agents and group-specific reagents, might have on protease activity

determined as the molar ratio of inhibitor/enzyme = 100. Enzyme inhibitors are substances which alter the catalytic action of the enzyme and consequently slow down, or in some cases, stop catalysis [2]. The relative inhibitory effects of the various assayed compounds are listed in Table 3. SAPHM was strongly inhibited by PMSF and DFP, indicated that it belong to the serine protease family. This behavior was similar to that observed for the purified protease SAPB from *Bacillus pumilus* strain CBS [17]. The literature indicated that almost one-third of all proteases can be classified as serine proteases, named for the nucleophilic serine residue at the active site [33]. Other inhibitors, such TPCK and TLCK (chymotrypsin alkylating agents), benzamidine, SBTI (serine protease competitive reagents) and thiol reagents (DTNB, NEM, and Iodoacetamide) were also assayed, and the results revealed that they had almost no influence on enzyme activity. In the presence of 10 mM

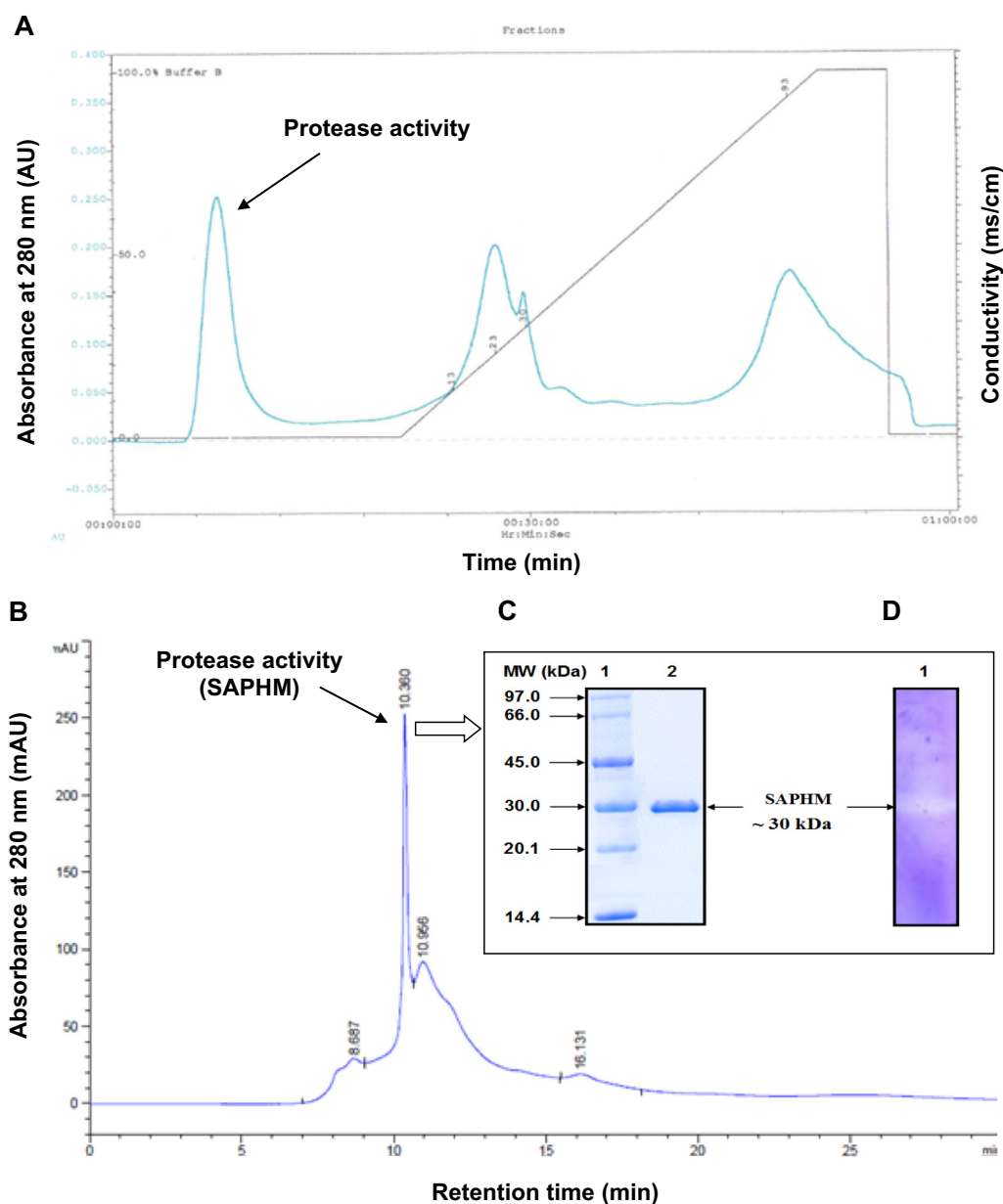


Fig. 2. Purification of the protease SAPHM from *Bacillus licheniformis* strain K7A. **(A)** Chromatography profile of the protease activity on FPLC system using UNO Q-12. The column (15 mm × 68 mm) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) was equilibrated with buffer B. Adsorbed material was eluted with a linear NaCl gradient (0 to 500 mM) in buffer B at a flow rate of 60 mL/h, and assayed for protein content at 280 nm. **(B)** Chromatography profile of the protease SAPHM on HPLC system using ZORBAX PSM 300. The column (6.2 mm × 250 mm) (Agilent Technologies, Lawrence, Kansas, MO, USA) was equilibrated with buffer C. **(C)** 12% SDS-PAGE of the purified protease SAPHM. Lane 1, Amersham LMW protein marker (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany). Lane 2, the purified SAPHM enzyme (50 µg) obtained after ZORBAX PSM 300 HPLC chromatography (RT = 10.360 min). **(D)** Zymogram caseinolytic activity staining of the purified protease SAPHM (50 µg).

Table 1

Flow sheet purification of the SAPHM enzyme from *Bacillus licheniformis* strain K7A.

Purification step ^a	Total activity (units) ^b × 10 ³	Total protein (mg) ^{b,c}	Specific activity (U/mg of protein) ^b	Activity recovery rate (%)	Purification factor (fold)
Crude extract	6,250 ± 34	3,250 ± 45	1,923	100	1
Heat treatment (30 min at 70 °C)	5,312 ± 25	1,022 ± 30	5,198	85	2.70
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation (40–70%)-dialysis	4,375 ± 18	190 ± 7	23,026	70	11.97
FPLC (UNO Q-12)	3,187 ± 12	87 ± 5	36,632	51	19.05
HPLC (ZORBAX PSM 300)	2,125 ± 10	26 ± 1	81,730	34	42.5

^a Experiments were conducted three times and ± standard errors are reported.

^b One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to release 1 µg tyrosine per minute under the experimental conditions used.

^c Amounts of protein were estimated by the method of Bradford [23].

Table 2Alignment of the NH₂-terminal amino acid sequence of the purified SAPHM enzyme from *Bacillus licheniformis* strain K7A with the sequences of other *Bacillus* proteases.

Enzyme	Origin	NH ₂ -terminal amino acid ^a	Identity (%) ^b
SAPHM (This work)	<i>Bacillus licheniformis</i> strain K7A	AQTVPQGIPLIKAEKVQAQGFQDARV	–
Subtilisin Carlsberg	<i>Bacillus licheniformis</i> strain NCIB-6816	AQTVPYGIPLIKADKVAQGF	90
APRMP1	<i>Bacillus licheniformis</i> strain MP1	AQTVPYGIPLIKAD	86
SAPB	<i>Bacillus pumilus</i> strain CBS	AQTVPYGIPIKAPAVHAQGY	71
BPP-A	<i>Bacillus pumilus</i> strain MS-1	AQTVPYGIPIKAPAVHAQGY	71
DHAP	<i>Bacillus pumilus</i> strain UN-31-C-42	AQTVPYGIPIKAPAVHAQGY	71
SPVP	<i>Aeribacillus pallidus</i> strain VP3	APSGPYGPQGIKADKVHAQGFKGAN	70
SAPLF	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain C250R	VPSGPYGPIDIKADKVIDEGFKMDEYF	64
SAPDZ	<i>Bacillus circulans</i> strain DZ100	AQTVPYGMQIKDPAVHGQGYKGAN	54
Subtilisin E	<i>Bacillus subtilis</i> strain 168	AQSVFYGISQIKAPALHSQGY	52
Subtilisin Novo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain ATCC 23844	AQSVFYGVSQIKAPALHSQGY	48

^a Amino acid sequences for comparison were obtained using the program BLASTP (NCBI, NIH, USA) database.^b Residues not identical with SAPHM are indicated in black box.

EDTA or 2 mM EGTA, SAPHM retained 85 or 89% of its activity, respectively, which suggested that no metallic cofactors were required. Serine proteases contain two calcium binding sites, and the removal of Ca²⁺ from the strong binding site is associated with significant reduction in thermostability. This property is highly valued in detergent additives since chelators are a common ingredient in most laundry detergents. Its sensitivity to chelators would be a valuable property for potential applications in detergent compositions [34]. They have a number of different functions such as reducing water hardness, assisting in keeping particulate soil in suspension and the removal of certain stains, thus complementing the action of the anionic surfactants [35]. So, the presence of both chelators and enzymes in a liquid detergent presents a challenge. As the most commonly used serine proteases within the detergent industry are dependent on two calcium binding sites, to maintain conformational stability and function at elevated temperatures. The role of calcium ion is probably related to the stabilization of the active form of SAPHM and the preservation of its structure against possible autolysis. Similar serine protease activity effects were previously reported for EDTA and calcium [6,30,36]. The addition of CaCl₂, MgCl₂, and MnCl₂ at 2 mM was noted to enhance enzymatic activity by 477, 210, and 120% as compared to the control, respectively. Protease activity was, however, completely inhibited by mercure, cadmium, and nickel.

Table 3

Effects of various inhibitors, reducing agents, and metallic ions on SAPHM stability. Protease activity measured in the absence of any inhibitor or reducing agent was taken as control (100%). The non-treated and dialyzed enzyme was considered as 100% for metallic ion assay. Residual activity was measured at pH 10 and 70 °C.

Inhibitor/reducing agent/metallic ion	Concentration	Residual activity (%) ^a
None	–	100 ± 2.5
PMSF	5 mM	0 ± 0.0
DFP	2 mM	0 ± 0.0
SBTI	2 mg/mL	104 ± 2.6
TLCK	1 mM	105 ± 2.5
TPCK	1 mM	102 ± 2.5
Benzamidine	10 mM	99 ± 2.5
DTNB	10 mM	97 ± 2.5
NEM	2 mM	102 ± 2.5
Iodoacetamide	5 mM	98 ± 2.5
Leupeptin	50 µg/mL	101 ± 2.5
Pepstatin A	2 µg/mL	95 ± 2.4
EDTA	10 mM	85 ± 2.0
EGTA	2 mM	89 ± 2.2
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	2 mM	477 ± 7.7
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	2 mM	210 ± 3.5
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	2 mM	120 ± 2.8
Zn ²⁺ (ZnCl ₂)	2 mM	101 ± 2.5
Co ²⁺ (CoCl ₂)	2 mM	98 ± 2.5
Cu ²⁺ (CuSO ₄)	2 mM	80 ± 1.8
Ni ²⁺ (NiCl ₂), Cd ²⁺ (CdCl ₂), Hg ²⁺ (HgCl ₂)	2 mM	0 ± 0.0

^a Values represent means of four independent replicates, and ± standard errors are reported.

Results show that several metallic ions (Ca²⁺, Mg²⁺, and Mn²⁺) facilitate a better interaction between the catalytic site of the enzyme with the respective substrate, there by increasing product formation [37]. This phenomenon indicates that the enzyme requires metallic ions as cofactors. In fact, those bivalent ions (Ca²⁺, Mg²⁺, and Mn²⁺) apparently promoted enzyme activity by stabilizing its structure and protecting it against thermal denaturation, thus playing a vital role in maintaining its active conformation at higher temperatures.

Report on the effect of metallic ions on proteases is quite diverse. In addition, specific calcium binding sites that influence the protein activity and stability apart from the catalytic site were described for the following proteases: SPVP from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 [1], KERDZ from *Actinomyces viridilutea* strain DZ50 [30], and BM1 from *Bacillus mojavensis* strain A21 [38]. Another reason for an increase in activity in the presence of calcium may be due to stabilization of enzyme in its active conformation rather than it being involved in the catalytic reaction. It probably acts as a salt or ion bridge via a cluster of carboxylic groups as has been suggested for subtilisins and there by maintains the rigid conformation of the enzyme molecule [39].

Mercury, cadmium, and nickel are heavy metals that usually cause inactivation of the enzymes. The inhibitory effect of heavy metallic ions is well documented in the literature. Taking the example of SAPDZ from *Bacillus circulans* strain DZ100 was totally inhibited by Hg²⁺, Ni²⁺, and Cd²⁺ [40]. Mercury ions are, for instance, known to react with protein thiol groups (converting them to mercaptides) as well as histidine and tryptophan residues [41].

3.5.2. Determination of the optimum pH and stability

The effect of pH on the catalytic activity was studied by using casein as a substrate under the standard assay conditions. The SAPHM displayed activity over a broad range of pH (6–12), with an optimum at pH 10 (Fig. 3A). The relative activities at pH 6 and 12 were 70 and 55%, respectively. The pH stability profile of SAPHM illustrated in Fig. 3B indicated that the purified enzyme was highly stable in the pH range of 7–12. The half-life times of SAPHM at pH 7, 8, 9, 10, 11, and 12 were 24, 18, 14, 10, 6, and 4 h, respectively.

For these characteristics, such as enzymes are often preferred over well-known Subtilisins that have optimal pH values of 8.5 to 10 [42] have previously isolated alkalophilic *Bacillus* strain that produced high-alkaline protease with optimum pH values of 10. These properties added to the high activity and stability in high alkaline pH makes this novel protease an ideal choice for application in detergent formulations. This result is in accordance with several previous reports in the literature [19,32]. This confirmed the promising potential of SAPHM for future industrial applications that require enzyme stability in wide pH (9–11) range. The high activity exhibited by SAPHM enzyme at high pH solutions is, in fact, a very important attribute that lends further support to their strong candidacy for application in detergent formulations. Its pH stability profile exceeds the ones reported for most of the currently

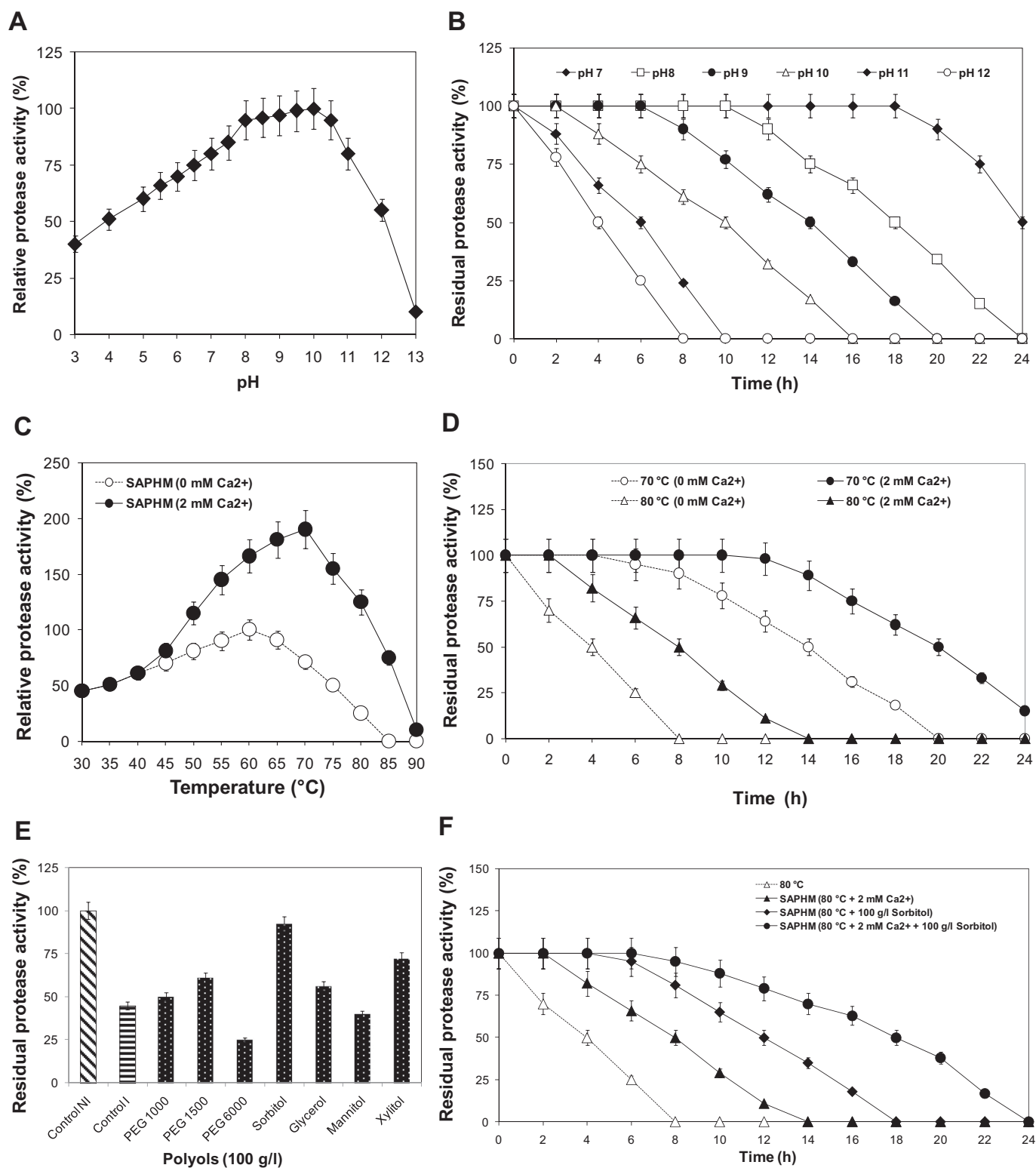


Fig. 3. Physico-chemical properties of the purified SAPHM from *Bacillus licheniformis* strain K7A. Effects of pH on the activity (A) and stability (B) of SAPHM. The activity of the enzyme at pH 10 was taken as 100%. Effects of the thermoactivity (C) and thermostability (D) of SAPHM. The enzyme was pre-incubated in the presence and absence of CaCl_2 at 70 and 80 °C. The activity of the non-heated enzyme was taken as 100%. Each point represents the mean of three independent experiments. (E) Stability of SAPHM in the presence of various polyols at 100 g/L. Enzyme activity of the control sample, without additive, was incubated under similar conditions, and taken as 100%. Vertical bars indicate standard error of the mean ($n = 3$). (F) Effect of the thermostability of SAPHM at 80 °C. The enzyme was pre-incubated in the absence (Δ) or presence of additive: 2 mM Ca^{2+} ($\blacktriangle$); 100 g/L sorbitol ($\blacklozenge$); and 2 mM Ca^{2+} and 100 g/L sorbitol ($\bullet$). The residual protease activity was determined from 0 to 24 h at 2 h intervals. The activity of the non-heated enzyme was considered as 100%. Each point represents the mean ($n = 3$) $\pm$ standard deviation.

used detergent proteases, including Subtilisin Novo and Savinase™ whose pH optimum and pH stability are 10.5 and 8–10, respectively [17]. In fact, the importance of alkaline proteases for different

applications in alkaline environments has been growing rapidly. A great deal of research is currently going into developing proteases, which will work under alkaline conditions as fat stain removers.

3.5.3. Determination of optimum temperature and thermostability

The enzymatic activity was detected over a broad range of temperature (40–90 °C). The optimum temperature recorded for SAPHM activity was 60 °C in the absence of CaCl₂ and 70 °C in the presence of 2 mM Ca²⁺ when tested at pH 10 using casein as a substrate (Fig. 3C). The half-life times of SAPHM in the absence of additives were 14 and 4 h at 70 and 80 °C, respectively (Fig. 3D). The addition of different concentrations of CaCl₂ (from 0.1 to 10 mM) enhanced the thermostability of the SAPHM enzyme. As shown in Fig. 3D, the half-life times of SAPHM at 70 and 80 °C increased to 20 and 8 h in the presence of 2 mM CaCl₂.

The optimal temperature of SAPHM (70 °C) was found to be much higher than those of most other reported microbial proteases with optimal temperatures in the range of 50–65 °C [1,17,43] and similar to the values reported earlier for some proteases from other *Bacillus licheniformis* strains [26,27,44].

Thermostability is one of the most important characteristics determining the potential adoption of enzymes in industrial processes involving high temperatures. Thermostable enzymes, derived mainly from thermophilic microorganisms have found a number of commercial applications because of the less reaction time and contamination risk [45].

3.5.4. Effect of polyols on the thermal stability

The activities of SAPHM towards different polyols are presented in Fig. 3E. SAPHM showed highest activity towards sorbitol followed by

xylitol and PEG 1,500 at a concentration of 100 g/L (Fig. 3E). To further study the stabilizing effect of sorbitol and calcium on the enzyme, their effects were investigated on the thermostability of SAPHM at 80 °C. Furthermore, thermostabilization was more effective with calcium at 2 mM and sorbitol at 100 g/L since the half-life time at 80 °C was determined to be respectively 18 h compared to 4 h in the absence of any additive (Fig. 3F). Mechri et al. have examined the effect of calcium combined with different polyols on the thermostability of protease activity and shown that the studied polyols at 100 g/L (PEG 1,000; glycerol; mannitol; and xylitol) stabilize the enzyme at 80 °C [1]. In fact, polyols are commonly used for protein stabilization against unfolding under the environmental stresses such as high temperatures, organic solvents and Freeze-drying.

3.5.5. Substrate specificities profile of SAPHM enzyme

The important feature of alkaline proteases is their ability to discriminate among competing substrates and the utility of these enzymes often depends on their substrate specificity [43]. Proteases can hydrolyse natural protein well as modified protein, ester and synthetic peptide. The substrate specificity of proteases is often attributed to the amino acid residues preceding the peptide bond they hydrolyze. Proteases preferentially hydrolyze the peptide bonds of polypeptide substrates depending on the amino acids preceding and/or following the cleavage site. The relative hydrolysis rates of various substrates were investigated to elucidate the amino acid preference/substrate specificity of SAPHM (Table 4). Among

Table 4
Substrate specificity profile of SAPHM enzyme from *Bacillus licheniformis* strain K7A.

Substrate		Concentration	Absorbance (nm) ^a	Relative activity (%) ^b
Natural protein	Casein	30 g/L	600	100 ± 2.5
	Albumin	30 g/L	600	88 ± 2.1
	Gelatin	30 g/L	600	32 ± 1.2
	Ovalbumin	30 g/L	600	19 ± 0.7
	Keratin	30 g/L	600	22 ± 0.8
Modified protein	Azo-casein	25 g/L	440	100 ± 2.5
	Albuminazure	25 g/L	440	55 ± 1.5
	Keratin azure	25 g/L	440	33 ± 1.2
	Collagen type I	10 g/L	440	0 ± 0.0
	Collagen type II	10 g/L	440	0 ± 0.0
Ester	BTEE	10 mM	253	100 ± 2.5
	ATEE	10 mM	253	92 ± 2.3
	BAEE	10 mM	253	0 ± 0.0
	BCEE	10 mM	253	0 ± 0.0
	TAME	10 mM	253	0 ± 0.0
Synthetic peptide (pNA)	P4 – P3 – P2 – P1 – P'1			
	Suc-Phe-pNA	5 mM	410	56 ± 1.6
	Benz-Tyr-pNA	5 mM	410	45 ± 1.5
	Met-pNA	5 mM	410	41 ± 1.4
	Ac-Leu-pNA	5 mM	410	39 ± 1.2
	Pro-pNA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Ac-Ala-pNA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Benz-Arg-pNA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Suc-Tyr-Leu-Val-pNA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Suc-Ala-Ala-Val-pNA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Suc-Ala-Ala-Phe-pNA	5 mM	410	51 ± 1.5
	Benz-Phe-Val-Arg-pNA	5 mM	410	0 ± 0.0
	Suc-Phe-Ala-Ala-Phe-pNA	5 mM	410	100 ± 2.5
	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	5 mM	410	98 ± 2.5
	Suc-Ala-Ala-Val-Ala-pNA	5 mM	410	90 ± 2.5
	Suc-Ala-Ala-Pro-Met-pNA	5 mM	410	81 ± 2.1
	Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	5 mM	410	70 ± 1.8
	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-pNA	5 mM	410	60 ± 1.6
	Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-pNA	5 mM	410	0 ± 0.0

^a Values represent means of three independent replicates, and ± standard errors are reported.

^b The activity of each substrate was determined by measuring absorbance at specified wave lengths according to the relative method reported elsewhere Zarái Jaouadi et al. [25].

Table 5

Kinetic parameters of purified proteases: SAPHM, Alcalase Ultra 2.5 L, and Thermolysin type X for hydrolysis of natural protein (Casein) and synthetic peptide (Suc-Phe-Ala-Ala-Phe-pNA).

Substrate	Enzyme	K_m (mM)	V_{max} ($\times 10^3$ U/mg)	k_{cat} ($\times 10^3$ min $^{-1}$)	k_{cat}/K_m ($\times 10^3$ min $^{-1}$ mM $^{-1}$)
Casein	SAPHM	0.453 $\pm$ 0.01	81.560 $\pm$ 283	54.373	120.029
	Alcalase Ultra 2.5 L	0.641 $\pm$ 0.02	24.915 $\pm$ 365	16.610	25.913
	Thermolysin type X	0.738 $\pm$ 0.05	17.126 $\pm$ 114	11.417	15.470
Suc-Phe-Ala-Ala-Phe-pNA	SAPHM	0.755 $\pm$ 0.06	178.200 $\pm$ 852	118.800	157.350
	Alcalase Ultra 2.5 L	0.899 $\pm$ 0.07	39.135 $\pm$ 202	26.090	29.021
	Thermolysin type X	1.063 $\pm$ 0.09	30.551 $\pm$ 190	20.367	19.160

Values in the table represent means of three independent replicates, and $\pm$ standard errors are reported.

the proteinaceous substrates tested, SAPHM enzyme was noted to show highest activity with casein followed by azo-casein and albumin. Relatively moderately levels of activity were also observed against albumin and gelatin, although a low hydrolysis level was observed with keratin and keratin azure. This specificity of cleavage to natural protein was already elaborated in other *Bacillus* proteases. For that produced by a thermophilic strain of *Bacillus subtilis* strain DM-04, casein served as the most preferred substrate, followed by gelatin, whereas BSA and fibrinogen were least hydrolysed by this enzyme [46]. No collagenase activity was detected on collagen types I and II, which provided further support for the usefulness of SAPHM for hair removal in the leather industry [47].

The cleavage specificity of SAPHM towards various esters was also investigated. Hence, the purified SAPHM was noted to exhibit both esterase and amidase activities on N-terminal and C-terminal protected L-tyrosine such as BTEE and ATEE, but not on N-terminal and C-terminal protected L-arginine and cysteine: BAEE, BCEE, and TAME, respectively.

The preferences of the SAPHM enzyme for synthetic substrates incorporating N-terminal residues to the cleavage site (P1, P2, etc.) have also been elucidated (Table 4). The amino-acids at position P1 exerted strong effects on the catalytic action of the SAPHM enzyme. The obtained results in Table 4 clearly indicate the variation in absorbance, and therefore, demonstrated the released of the pNA only at the aminoacyl-pNA amide bond of the used synthetic peptides. In fact, the relative activities of SAPHM are 100 and 98% with Suc-Phe-Ala-Ala-Phe-pNA and Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, respectively when phenylalanine residue is placed in P1 position. However it can not hydrolyze the alanine residue even it is placed in P1 (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA and Ac-Ala-pNA) and P2 or P3 (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA and Suc-Ala-Ala-Val-pNA) positions. Additionally, the relative activity of SAPHM is 60% with Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-pNA when tyrosine residue is placed in P1 position. However it can not hydrolyze the valine residue even it is placed in P1 (Val-pNA, Suc-Tyr-Leu-Val-pNA, and Suc-Ala-Ala-Val-pNA), P2 (Benz-Phe-Val-Arg-pNA), and P3 (Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-pNA) positions. The substrate specificity profile of SAPHM enzyme suggested that it's largely preferred hydrophobic substrates, especially those with aromatic residues occupying the P1 and P4 positions of pNA substrates and exhibited the highest activity for Suc-Phe-Ala-Ala-Phe-pNA (100%) and Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (98%). These characteristics, also reported for other subtilisins from *Bacillus* origins [1,17] indicated that the SAPHM protease was closely similar to subtilisins not only in terms of specificity for position P1 but also with regard to the effects of amino acids residues neighboring the cleavage site. Nevertheless, some differences were observed in side chain specificity at P2, which could presumably indicate the presence of an extended active site. Proline was also noted to promote hydrolysis at the P2 position in SAPHM enzyme, a feature that was not observed for Subtilisin E from *Bacillus subtilis* strain 168 [48].

3.6. Performance evaluation of the purified SAPHM, Alcalase Ultra 2.5 L, and Thermolysin type X proteases

3.6.1. Determination of kinetic parameters

The kinetic constants K_m and k_{cat} of the purified used proteases were determined. V_{max} is the maximum rate when an enzyme is fully

saturated with substrate concentration [49]. The affinity of a protease for substrate hydrolysis is determined by Michaelis constant (K_m) that is the substrate concentration at which the rate of reaction is half of the maximum rate (V_{max}). SAPHM, Alcalase Ultra 2.5 L, and Thermolysin type X proteases exhibited the classical kinetics of Michaelis-Menten for the two used substrates. The order of the k_{cat}/K_m values of each enzyme was almost the same, i.e., Suc-Phe-Ala-Ala-Phe-pNA > casein (Table 5). When casein was used as a natural substrate, SAPHM was noted to exhibit k_{cat}/K_m values that were 4.63 and 7.75 times elevated than those of Alcalase Ultra 2.5 L and Thermolysin type X, respectively. When Suc-Phe-Ala-Ala-Phe-pNA was used as a synthetic substrate, SAPHM was also noted to exhibit k_{cat}/K_m values that were 5.42 and 8.21 times higher than those of Alcalase Ultra 2.5 L and Thermolysin type X, respectively.

The catalytic efficiencies values of SAPHM were higher than that of Alcalase Ultra 2.5 L and Thermolysin type X.

3.6.2. Effects of organic solvents on protease activity and stability of SAPHM and Thermolysin type X proteases

The use of enzymes in organic media has been one of the most novelties of catalysis in last few years. One major concern in this regard has been their instability/low-activity in organic media, since proteases may be suitable for peptide and ester synthesis under non-aqueous conditions [50]. Various organic solvents were examined for their effects on the activity and stability of the purified SAPHM and Thermolysin type X proteases (Fig. 4A). The enzyme solutions containing 50% (v/v) of organic solvent were incubated for 72 h at 37 °C with shaking. When compared to the control, the activity and stability shown by SAPHM in the presence of DMF ($\log P = -1.03$), chloroform ($\log P = 1.97$), cyclohexane ($\log P = 3.2$), and ethyl acetate ($\log P = 0.73$) were higher than those of Thermolysin type X. Similar results were found for others solvent-stable proteases such as *Pseudomonas aeruginosa* strain MN7 [51] and *Pseudomonas aeruginosa* strain CTM50182 [7] elastases of which stabilities were enhanced by many organic-solvents and only. The major drawback of using enzymes in organic solvents is their significantly reduced activity compared to that in buffer media. If enzymes were naturally stable in organic solvents and exhibited high activity therein, they would be more useful for synthetic reactions [52].

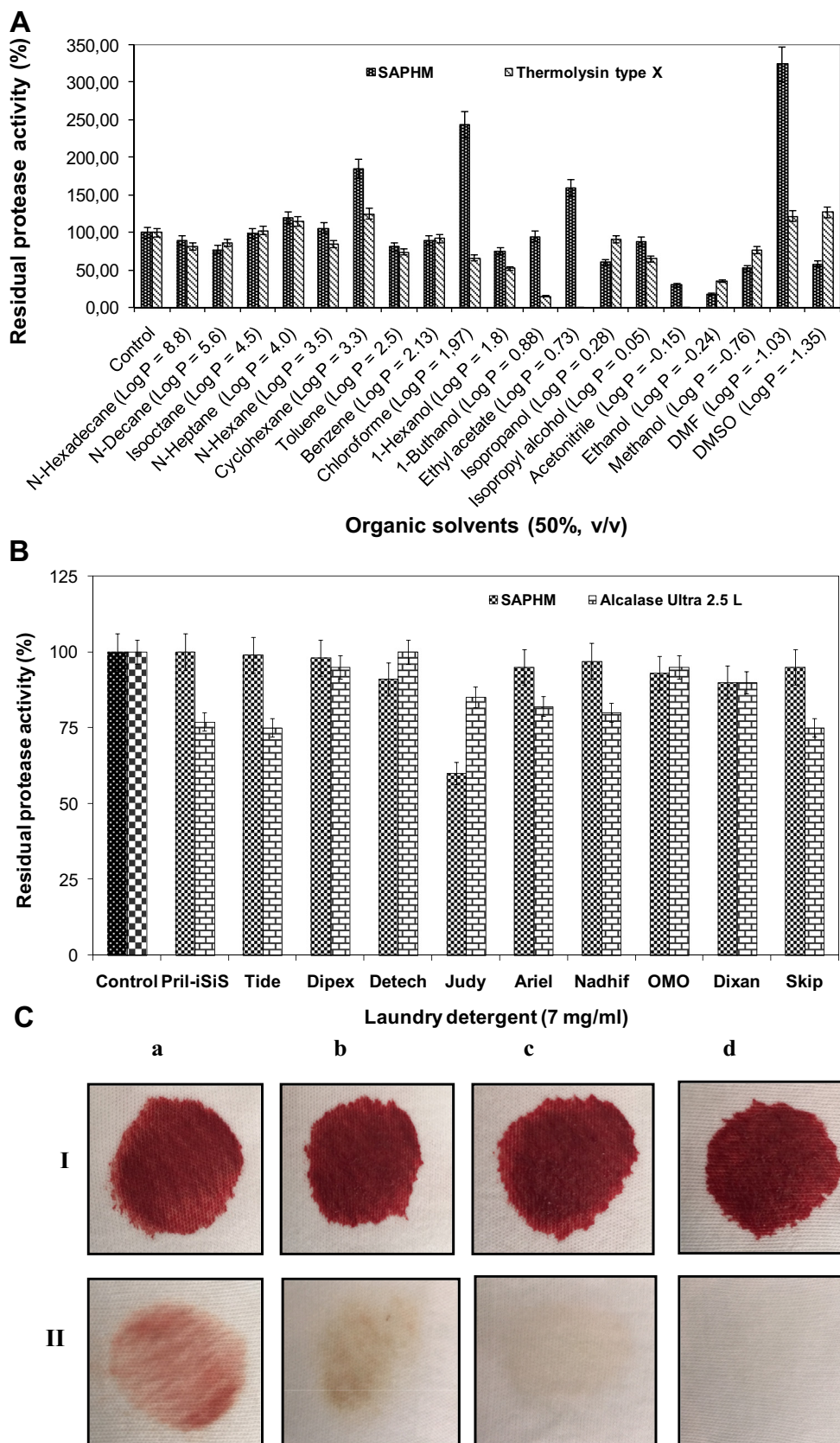
3.6.3. Stability and compatibility of SAPHM and Alcalase Ultra 2.5 L with laundry detergents

To check the compatibility and stability of the alkaline protease with washing detergents, the purified enzyme was pre-incubated in the presence of various commercial laundry detergents for one hour at 40 °C. The enzyme was found to be affected by OMO, Detech, Ariel, and Judy at 40 °C, retaining about 93, 91, 95, and 60% of its initial activity, respectively. In addition, SAPHM was highly stable in the presence of liquid laundry detergents at a concentration of 7 mg/mL (Fig. 4B). The alkaline proteases exhibited higher stability in Pril-iSiS (100%) (vs 77% for Alcalase Ultra 2.5 L). SAPHM facilitated the release of proteinaceous materials in a much easier way than the currently used Alcalase Ultra 2.5 L enzyme. However, SAPHM was noted to be less stable in the presence of Judy, retaining only 60% (vs 85% for Alcalase Ultra 2.5 L) of its initial activity.

3.6.4. Removal of blood stains from cotton fabrics

Enzymes are biodegradable and not mutagenic. They have a low toxicity as the chemicals used in conventional detergents and leave no harmful residues. Almost commercial detergents contain hydrolytic

enzymes which are known as “green chemicals” and have a wide range of applications in laundry, dishwashing, textile and other related industrie [53]. The data presented in Fig. 4A show that the purified enzyme is highly stable and compatible with all tested solid laundry



detergents when incubated at 40 °C retaining 100% of its initial activity. These results are consistent with those reported for alkaline proteases from *Bacillus pumilus* strain CBS [16], *Caldicoprobacter guelmensis* sp. nov. strain D2C22^T [31], and *Bacillus invictae* strain A [54] and provide further support for the usefulness of SAPHM for future industrial application as a cleaning bioadditive in detergent composition.

The enzyme was supplemented with detergents to check its wash performance as detergent additive. As shown in Fig. 4C, a limited washing performance was observed with detergent Pril-iSiS only. The supplementation of SAPHM or commercial protease Alcalase Ultra 2.5 L in detergent seems to improve the cleaning process as evidenced by rapid blood stain removal when compared to detergent alone.

Blood removal from cotton fabrics using purified SAPHM protease showed that sole enzyme preparation was sufficient to remove blood stains from cotton fabrics (Fig. 4C). This finding further support the usefulness of SAPHM in future industrial applications as a cleaning bioadditive in detergent formulations. The performance of a good detergent protease is defined by multiple parameters such as proteinaceous stain degradation, the ability to hydrolyze large insoluble proteins and compatibility with other detergent components. Several works have reported the usefulness of alkaline proteases in the facilitation of blood stains removal from cotton cloth. Although reported the usefulness of thermostable alkaline protease from *Bacillus halodurans* strain US193 for the removal of blood stains from cotton cloth in the presence and absence of detergents [55]. We believe that the SAPHM enzyme from *Bacillus licheniformis* strain K7A is more effective. These results support the potential of SAPHM for its future use as a cleaning bioadditive in laundry detergent formulations.

3.7. Molecular cloning and heterologous expression of the *sapHM* gene

3.7.1. Cloning and sequencing of the *sapHM* gene

Using the serine alkaline protease *aprNH1* and *aprMP1* genes sequences of *Bacillus licheniformis* strains [26,27], two primers, called F-LH10 and R-LH11, were designed and used to amplify a fragment of about 1.4 kb that could contain the *sapHM* gene. This PCR fragment was purified and cloned in a pCR-Blunt cloning vector using an *E. coli* BL21(DE3)pLysS host strain, thus leading to pLH4.

The complete nucleotide sequence and amino acid sequence deduced for the *sapHM* gene are illustrated in Fig. 5. The analysis of the nucleotide sequence of the *sapHM* gene and its flanking DNA regions revealed the presence of an ORF of 1137 bp that encoded a pro-enzyme consisting of 379 aa with a predicted MW of 39,110.25 Da and a theoretical pI of 8.92. This ORF started with an ATG codon at nucleotide position 1 and terminated with a TAA stop codon. A Shine-Dalgarno-like sequence was observed 10 to 15 bp upstream from the ATG codon. The presumed putative promoter region, at −35 (TTAACA) and −10 (TATATCT) sequences, resembled the consensus sequences determined for the promoter region by the lambda P_R RNA polymerase of *E. coli* [56]. Analysis of the ORF revealed a 49.64% G + C content which is in line with the G + C genome content frequency of *Bacillus licheniformis* (46.19%) [57]. This ORF was confirmed as the gene encoding SAPHM since, as determined by the Edman degradation method, the deduced amino acid sequence was noted to include the 26 NH₂-terminal amino acid sequence of the purified SAPHM protein.

3.7.2. Amino acid sequence inspection

The deduced amino acid sequence shows a pre-pro-protease of 379 amino acids consisting of a signal peptide of 29 amino acids, a pro-

enzyme of 76 amino acids and a mature protease of 274 amino acids. The signalP predicted a signal peptide (pre-sequence) of 29 aa bordered with the signal peptidase recognition (SPR) site A-A-S-A, indicating that a group of strongly hydrophobic amino acids was conserved. Belonging to the signal sequence, the pro-sequence consisting of 76 aa had to be cleaved by autoproteolytic processing in the periplasm. The active mature protease consisted of 274 aa, with a predicted molecular weight of 27,566.77 Da and a predicted isoelectric point of 8.10. The apparent molecular weight of the purified enzyme (30 kDa) determined by SDS-PAGE, MALD-TOF/MS, and HPLC gel filtration chromatography was in good agreement with the predicted value. The typical triad catalytic residues (D32, H63, and S221) in the active site and three serine protease signatures (amino acid residues 28–39, 64–75, and 216–226) [56] were also conserved in *sapHM* gene.

The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence of the *sapHM* gene was compared to those of other known proteases from *Bacillus* strains. This sequence was identical to those of proteases from other *Bacillus* strains [17,25]. The amino acid composition of SAPHM indicated that it was devoid of cysteine and cystine residues. Considering that all trypsin-related enzymes contain such residues, SAPHM could not belong to the trypsin family. This corroborated its non-inhibition by SBTI (Table 3) and confirmed its membership in the subtilisin superfamily of serine proteases. The most significant feature of the amino acid composition of SAPHM was its high Asx content (Asp and Asn residues), compared to other subtilisins (data not shown). SAPHM contained 42 amino acid residues of Asx (8 Asp and 16 Asn), corresponding to 8.7 mol%, whereas Subtilisin Novo and Subtilisin Carlsberg contained only 10.2 and 9.45 mol%, respectively.

The classification analysis of the deduced amino acid sequence demonstrated that the mature protease was a member of the serine protease family. The alignment of the deduced amino acid sequence of *sapHM* with those of known proteases revealed high homology with the extracellular serine proteases previously isolated and characterized from *Bacillus* strains.

Sequence alignment with protein databank (Fig. 6) shows that the SAPHM enzyme has 96 and 97% homology with subtilisin-like serine protease from *Bacillus licheniformis* strain MP1 (accession no. ADJ80171) and strain NCIB-6816 (accession no. CAB56500), respectively. Nevertheless, one amino acid (L7F) in the signal peptide, two amino acids (I47K and G73A) in the pro-peptide, and 9 aa (Q6Y, E14D, D22K, R25N, E69G, W99G, K154 N, K180D, and R239N), and 12 aa (Q6Y, E14D, D22K, R25N, E69G, W99G, S102 T, A128P, K154 N, K180D, N211S, and R239N) in the mature SAPRH were noted to differ from the protease APRMP1 from *Bacillus licheniformis* strain MP1 and Subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis* strain NCIB-6816 residues, respectively. Although displaying high levels of homology, the latter proteases exhibited relatively different characteristics. In fact, they showed markedly different physico-chemical and kinetic properties as compared to SAPHM using casein as substrate. The pH and temperature optima as well as catalytic efficiency shown by APRMP1 and Subtilisin Carlsberg, were 10–11/70 °C and $23.800 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and 8.5/60 °C and $25.913 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively.

3.7.3. Expression of the *sapHM* gene in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme

To express SAPHM, the corresponding gene was cloned downstream of *P_{tac}* promoter in pLH4, and then introduced in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS strain. No alkaline protease activity was detected in the periplasmic fraction neither in the intracellular fraction for all recombinant strains.

Fig. 4. Performance evaluation of the purified protease SAPHM from *Bacillus licheniformis* strain K7A. (A) Stability of the purified SAPHM and Thermolysin type X proteases in the presence of organic solvents. The residual protease activities were assayed under the same conditions of each enzyme. The activity of the enzyme without any organic solvent was taken as 100%. The activity is expressed as a percentage of activity level in the absence of organic solvents. (B) Stability of SAPHM and Alcalase Ultra 2.5 L purified proteases in the presence of liquid and solid laundry detergents. Enzyme activity of the control sample, which contained no additive and incubated under similar conditions, was taken as 100%. Vertical bars indicate standard error of the mean (n = 3). (C) Washing performance analysis test of SAPHM in the presence of the commercial detergent Pril-iSiS. (a) Cloth stained with blood washed with tap water; (b) blood-stained cloth washed with Pril-iSiS liquid detergent (7 mg/mL), (c) blood-stained cloth washed with Pril-iSiS added with Alcalase Ultra 2.5 L (commercial enzyme, 500 U/mL), (d) blood-stained cloth washed with Pril-iSiS added with SAPHM (500 U/mL). I: untreated cloths (control) and II: treated cloths.

Primer F-LH10

1 GTGCTAAGACAGTTATTAATAACCAAAAAATTTTAAATTGGTCCTCCAAAAAATAGGCCTACCATATAA 70
71 TTCATTTTTTTTTCTATAATAAA**TTAACA**GAATAATTGGAATAGAT**TATATT**ATCCTTCTATTAAATTAT 140
141 TCTGAATAAAGAGGAGAGTGA**ATCAT**GAGGAAAAAGAGTCTTTGGCTTGGGATGCTGACGCCT 210
211 TCATGCTCGTGTTCACGATGGCATT**CAGCG**ATTCCGCTTCTGCTGCTCAACCGGCAGAAAAATGTTGAAA 280
281 GGATTATATGTTCGGATTTAAGTCAGGAGTGAAAACCGCATCTGTCAAAAAGGACATCATCAAAGAGAGC 350
351 GGCGGAAAAGTGGACAAGCAGTTTAGAATCATCAACGCGGAATCGCGAAGCTAGACAAAGAAGCGCTTA 420
421 AGGAAGTCAAAAATGATCCGGATGT**CGCTTATGTGGAAGAGGATCATGTGGGCCATGCCTTGGCGCAAAC** 490
491 CGTTCCTCAGGGCATTCTCTCATTAAAGCGGAAAAAGTGCAGGCTCAAGGCTTTGACGGAGCGAGAGTA 560
561 AAAGTAGCCGCTCTGGATACAGGAATCCAAGCTTCTCATCCGGAAGCTTGAACGTAGTCGGCGGAGCAAGCT 630
631 TTGTGGCTGGCGAAGCTTATAACACCGACGGCAACGGACACGGCACACATGTTGCCGAAACAGTAGCTGC 700
701 GCTTGACAATAACAACGGGTGTATTAGGCGTTGCGCCAAGCGTATCCTTGTACGCGGTTAAAGTACTGAAT 770
771 TCAAGCTGGAGCGGATCATACAGCGGCATTGTAAGCGGAATCGAGTGGGCGACAACAAACGGCATGGATG 840
841 TTATCAATATGAGCCTTGGGGGAGCATCGGGCTCGACAGCGATGAAACAGGCAGTCGACAATGCATATGC 910
911 AAGAGGGGTGTGCTGTGTAGCTGCAGCAGGGAAGAGCGGATCTTCAGGAAACACGAATACAATTGGCTAT 980
981 CCTGCGAAATACGATTCTGTCTATCGCTGTGTGGTGCGGTAAATCTAACAGCAACAGAGCTTCATTTTCCA 1050
1051 GTGTGGGAGCAGAGCTTGAAGTCATGGCTCCTGGCGCAGGCGTATACAGCACTTACCCAACGAACACTTA 1120
1121 TGCAACATTGAACGGAACGTCAATGGCTTCTCCTCATGTAGCGGGAGCAGCAGCTTTGATCTTGTCAAAA 1190
1191 CATCCGAGACTTTTCACTTCAAGTCCGCAACCGTCTCTCCAGCACGGCGACTTATTTGGGAAGCTCCT 1260
1261 TCTACTATGGGAAAGTCTGATCAATGTGAAGCTGCCGCTCA**TAA**CATATTCTAACAAATAGCATATA 1330
1331 **GAAAAAGCTAGTGT**TTTTTAG**CAGTAGCTTTTCT**TCATTCTGATGAAGTTGTTCAATATTTGAATCCG 1400
1401 TTCCATGATCGTCGGATGGCCGTATTTAAAAATCTTGA 1438

Fig. 5. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *sapHM* gene. The *sapHM* consisted of 1137 bp encoding a polypeptide of 379 amino acids residues. Translation starts at a nucleotide position 1. The first amino acid of the mature protease, Ala, is counted as +1. Numbers written on both sides of the lines indicate the positions of nucleotides and amino acids. The putative starting residues of the pre-peptide (pre-domain), pro-peptide (pro-domain), and mature protease and the active site residues D32, H63, and S220 are indicated bold and grey. The nucleotide sequences ATG and TAA (both highlighted) indicate the initiation and terminal codon of translation, respectively. The positions of the four used primers (external F-LH10 and R-LH11 and internal F-LH12 and R-LH13) were underlined. The black box indicates the NH₂-terminal amino acid sequence of the purified SAPHM. SD: Shine-Dalgarno-like sequence, SPR: signal peptide recognition site, SR: stacking region.

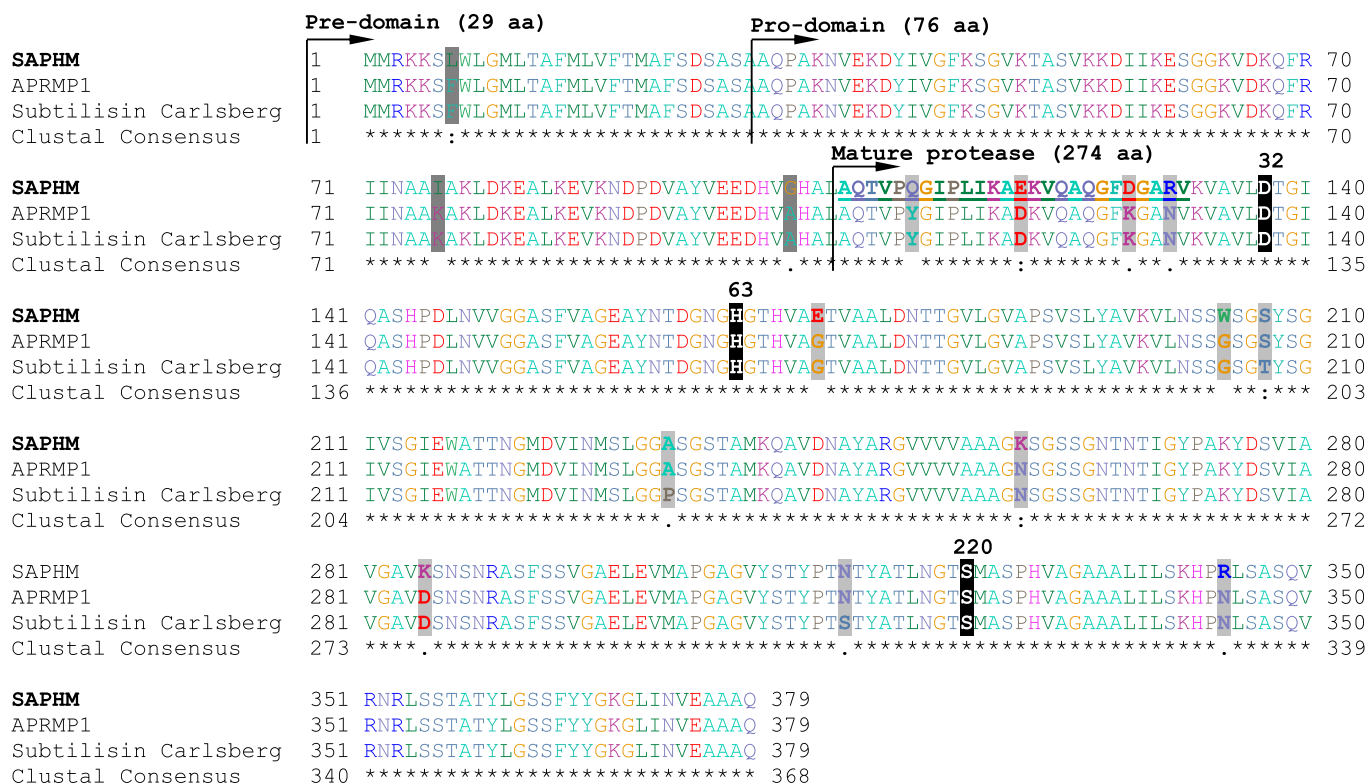


Fig. 6. Amino acid sequence alignment of SAPHM (accession no. MG753560) with those of protease APRMP1 from *Bacillus licheniformis* strain MP1 (accession no. ADJ80171) and Subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis* strain NCIB-6816 (accession no. CAB56500). Conserved amino acid residues are indicated by asterisks. The conserved catalytic triad D32, H63, and S220 are black boxed. The underlined box indicates the NH₂-terminal amino acid sequence of the purified SAPHM. Highlighted characters shows amino acid changes in SAPHM enzyme with other proteases.

Relatively high levels of specific activity of 750 U/mg was, however, detected in the extracellular fraction of BL21(DE3)pLysS/pLH4. Based on this study, the SAPHM protease was most efficiently expressed with the construction of *Ptac-sapHM* (pLH4). The latter was, therefore, retained for the purification of the recombinant protease (rSAPHM).

Extracellular rSAPHM was purified using the same strategy for the native enzyme from *Bacillus licheniformis* strain K7A. All the physico-chemical and kinetic parameter characteristics identified from rSAPHM were almost similar to those of the original one. Therefore, rSAPHM can be easily prepared in large scale for biotechnological and industrial applications.

4. Conclusions

In the present study, the present investigation revealed a novel extremophilic bacterium, identified as *Bacillus licheniformis* strain K7A and producing extracellular alkaline protease with attractive characteristics. The extracellular proteinase (SAPHM) was purified to homogeneity and biochemically characterized. The results revealed that it showed optimum activity at 70 °C and pH 10. The SAPHM protease also displayed high levels of activity and stability over a wide range of temperature and pH, which are highly valued in the detergent industry. Its catalytic efficiency was higher than those of Alcalase Ultra 2.5 L and Thermolysin type X. SAPHM exhibited high tolerance and stability in the presence of organic solvents than Thermolysin type X and excellent stability to detergents and wash performance analysis revealed that it could remove blood-stains effectively than Alcalase Ultra 2.5 L, making it particularly suitable for non-aqueous peptide biocatalysis and laundry detergent formulations. Accordingly, further studies, some of which are currently underway in our laboratories, are needed to explore the structure-function relationships of the enzyme using site-directed mutagenesis and 3-D structure modeling.

Acknowledgments We would like to thank Mr. K. Walha, Mrs. N. Kchaou, and Mrs. N. Masmoudi-Fourati (Analysis Unit-CBS) for assistance with the HPLC and FPLC and Pr. H. Mejdoub and Mr. C. Bouzid (USCR/SP-FSS, Sfax Faculty of Science, University of Sfax) for the NH₂-terminal amino acid sequencing of the SAPHM protein. They are also grateful to Mr. M. Djallali (Deputy Director of CNRDPA), Dr. Ben Elhouli, Dr. H. Rekik, and Mrs. M. Omrane Benmradi (LMBEE-CBS) for their constructive discussions and valuable help during the preparation of this study.

Funding information This study was funded Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research and the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research under the Project Tuniso-Algerian JAOUADI/BADIS, grant no. TA/04/2012_TNDZ-MicrooZymes_2012–2018.

Compliance with ethical standards.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- [1] S. Mechri, M. Ben Elhouli, M. Berrouina, N. Omrane Benmradi, H. Zrafi Jaouadi, E. Rekik, A. Moujehed, S. Chebbi, M. Sayadi, S. Chamkha, B. Jaouadi Bejar, Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest, *Int. J. Biol. Macromol.* 94 (2017) 221–232.
- [2] S. Mechri, M. Kriaa, M. Ben Elhouli, M. Berrouina, N. Omrane Benmradi, H. Zrafi Jaouadi, K. Rekik, A. Bouacem, A. Bouanane-Darenfed, S. Chebbi, M. Sayadi, S. Chamkha, B. Jaouadi Bejar, Optimized production and characterization of a detergent-stable protease from *Lysinibacillus fusiformis* C250R, *Int. J. Biol. Macromol.* 101 (2017) 383–397.
- [3] K. Bouacem, H. Laribi-Habchi, S. Mechri, H. Hacene, B. Jaouadi, A. Bouanane-Darenfed, Biochemical characterization of a novel thermostable chitinase from *Hydrogenophilus hirschi* strain KB-DZ44, *Int. J. Biol. Macromol.* 106 (2018) 338–350.

- [4] U. Hameed, I. Price, H. Ikram Ul, A. Ke, D.B. Wilson, O. Mirza, Functional characterization and crystal structure of thermostable amylase from *Thermotoga petrophila*, reveals high thermostability and an unusual form of dimerization, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Proteins Proteomics* 1865 (2017) 1237–1245.
- [5] D.J. Daroit, A.P.F. Corrêa, A. Brandelli, Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45, *Int. Biodeter. Biodegr.* 65 (2011) 45–51.
- [6] M. Omrane Benmrar, E. Moujehed, M. Ben Elhoul, N. Zarái Jaouadi, S. Mechri, H. Rekik, S. Kourdali, M. El Hattab, A. Badis, S. Sayadi, S. Bejar, B. Jaouadi, A novel organic solvent- and detergent-stable serine alkaline protease from *Trametes cingulata* strain CTM10101, *Int. J. Biol. Macromol.* 91 (2016) 961–972.
- [7] B. Jaouadi, N. Zarái Jaouadi, H. Rekik, B. Naili, A. Beji, A. Dhoubi, S. Bejar, Biochemical and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* CTM50182 organic solvent-stable elastase, *Int. J. Biol. Macromol.* 60 (2013) 165–177.
- [8] K. Bouacem, A. Bouanane-Darenfed, N. Zarái Jaouadi, M. Joseph, H. Hacene, B. Ollivier, M.L. Fardeau, S. Bejar, B. Jaouadi, Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities, *Int. J. Biol. Macromol.* 86 (2016) 321–328.
- [9] S. Dutta, Y.-S. Park, K. Park, Proteolytic activity of thermophilic *Bacillus licheniformis* strain SF5-1 for the efficient bioconversion of pork waste to amino acid fertiliser, *Int. Biodeter. Biodegr.* 111 (2016) 31–36.
- [10] D. Kumar, T.N. Savitri, R. Verma, T.C. Bhalla, Microbial proteases and application as laundry detergent additive, *Res. J. Microbiol.* 3 (2008) 661–672.
- [11] H. Yang, J. Li, H.D. Shin, G. Du, L. Liu, J. Chen, Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 23–29.
- [12] T. de Miguel Bouzas, J. Barros-Velazquez, T.G. Villa, Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: a review, *Protein Pept. Lett.* 13 (2006) 645–651.
- [13] R. Gupta, K.K. Beg, P. Lorenz, Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (2002) 15–32.
- [14] Q. Beg, R. Gupta, Purification and characterization of an oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*, *Enzym. Microb. Technol.* 32 (2003) 294–304.
- [15] K.H. Maurer, Detergent proteases, *Curr. Opin. Biotechnol.* 15 (2004) 330–334.
- [16] B. Jaouadi, S. Ellouz-Chaabouni, M.B. Ali, E.B. Messaoud, B. Naili, A. Dhoubi, S. Bejar, Excellent laundry detergent compatibility and high dehairing ability of the *Bacillus pumilus* CBS alkaline proteinase (SAPB), *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14 (2009) 503–512.
- [17] B. Jaouadi, S. Ellouz-Chaabouni, M. Rhimi, S. Bejar, Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency, *Biochimie* 90 (2008) 1291–1305.
- [18] A. Toplak, T. Nuijens, P.J.L.M. Quaedflieg, B. Wu, D.B. Janssen, Peptide synthesis in neat organic solvents with novel thermostable proteases, *Enzyme Microbiol. Technol.* 73 (2015) 20–28.
- [19] M. Ben Elhoul, N. Zarái Jaouadi, H. Rekik, W. Bejar, S. Boulkour Touioui, M. Hmidi, A. Badis, S. Bejar, B. Jaouadi, A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650, *Int. J. Biol. Macromol.* 79 (2015) 871–882.
- [20] V. Gurtler, V.A. Stanisich, New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region, *Microbiology (Reading, England)* 142 (Pt 1) (1996) 3–16.
- [21] J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989 23–38.
- [22] S. Boulkour Touioui, N. Zarái Jaouadi, H. Boudjella, F.Z. Ferradji, M. Belhoul, H. Rekik, A. Badis, S. Bejar, B. Jaouadi, Purification and biochemical characterization of two detergent-stable serine alkaline proteases from *Streptomyces* sp. strain AH4, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31 (2015) 1079–1092.
- [23] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [24] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [25] N. Zarái Jaouadi, H. Rekik, A. Badis, S. Trabelsi, M. Belhoul, A.B. Yahiaoui, H. Ben Aicha, A. Toumi, S. Bejar, B. Jaouadi, Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities, *PLoS One* 8 (2013), e76722.
- [26] N.E. Hadji-Ali, R. Agrebi, B. Ghorbel-Frikha, A. Sellami-Kamoun, S. Kanoun, M. Nasri, Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 515–523.
- [27] K. Jellouli, O. Ghorbel-Bellaaj, H.B. Ayed, L. Manni, R. Agrebi, M. Nasri, Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization, *Process Biochem.* 46 (2011) 1248–1256.
- [28] B. Sana, *Marine Microbial Enzymes: Current Status and Future Prospects*, Springer Handbook of Marine Biotechnology, Springer 2015, pp. 905–917.
- [29] S. Javed, F. Azeem, S. Hussain, I. Rasul, M.H. Siddique, M. Riaz, M. Afzal, A. Kouser, H. Nadeem, Bacterial lipases: a review on purification and characterization, *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 132 (2018) 23–34.
- [30] M. Ben Elhoul, N. Zarái Jaouadi, H. Rekik, M. Omrane Benmrar, S. Mechri, E. Moujehed, S. Kourdali, M. El Hattab, A. Badis, S. Bejar, B. Jaouadi, Biochemical and molecular characterization of new keratinolytic protease from *Actinomadura viridilutea* DZ50, *Int. J. Biol. Macromol.* 92 (2016) 299–315.
- [31] K. Bouacem, A. Bouanane-Darenfed, H. Laribi-Habchi, M.B. Elhoul, A. Hmida-Sayari, H. Hacene, B. Ollivier, M.-L. Fardeau, B. Jaouadi, S. Bejar, Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*, *Int. J. Biol. Macromol.* 81 (2015) 299–307.
- [32] D. Jain, I. Pancha, S.K. Mishra, A. Shrivastav, S. Mishra, Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: a potential additive for laundry detergents, *Bioresour. Technol.* 115 (2012) 228–236.
- [33] L. Hedstrom, Serine protease mechanism and specificity, *Chem. Rev.* 102 (2002) 4501–4524.
- [34] R. Gupta, K. Gupta, R. Saxena, S. Khan, Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp, *Biotechnol. Lett.* 21 (1999) 135–138.
- [35] H. Lund, S.G. Kaasgaard, P. Skagerlind, L. Jørgensen, C.I. Jørgensen, M. van de Weert, Protease and amylase stability in the presence of chelators used in laundry detergent applications: correlation between chelator properties and enzyme stability in liquid detergents, *J. Surfactant Deterg.* 15 (2012) 265–276.
- [36] N. Zarái Jaouadi, H. Rekik, M. Ben Elhoul, F. Zohra Rahem, C. Gorgi Hila, H. Slimene Ben Aicha, A. Badis, A. Toumi, S. Bejar, B. Jaouadi, A novel keratinase from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process, *Int. J. Biol. Macromol.* 79 (2015) 952–964.
- [37] T.M. Pasin, V.M. Benassi, P.R. Heinen, A.R.d.L. Damasio, M. Cereia, J.A. Jorge, M.d.L.T.d. M. Polizeli, Purification and functional properties of a novel glucoamylase activated by manganese and lead produced by *Aspergillus japonicus*, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 779–788.
- [38] A. Haddar, R. Agrebi, A. Bougatef, N. Hmidet, A. Sellami-Kamoun, M. Nasri, Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 3366–3373.
- [39] A.Y. Strongin, L. Izotova, Z. Abramov, D. Gorodetsky, L. Ermakova, L. Baratova, L. Belyanova, V. Stepanov, Intracellular serine protease of *Bacillus subtilis*: sequence homology with extracellular subtilisins, *J. Bacteriol.* 133 (1978) 1401–1411.
- [40] A. Benkari, Z.J. Nadia, A. Badis, F. Rebzani, B.T. Soraya, H. Rekik, B. Naili, F.Z. Ferradji, S. Bejar, B. Jaouadi, Biochemical and molecular characterization of a thermo- and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process, *Int. Biodeter. Biodegr.* 83 (2013) 129–138.
- [41] M. Kecha, S. Benallaoua, J.P. Touzel, R. Bonaly, F. Duchiron, Biochemical and phylogenetic characterization of a novel terrestrial hyperthermophilic archaeon pertaining to the genus *Pyrococcus* from an Algerian hydrothermal hot spring, *Extremophiles* 11 (2007) 65–73.
- [42] A. Deng, J. Wu, Y. Zhang, G. Zhang, T. Wen, Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 7111–7117.
- [43] S. Shankar, M. Rao, R.S. Laxman, Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp., *Process Biochem.* 46 (2011) 579–585.
- [44] N. Fakhfakh, S. Kanoun, L. Manni, M. Nasri, Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK, *Can. J. Microbiol.* 55 (2009) 427–436.
- [45] D.C. Demirjian, F. Moris-Varas, C.S. Cassidy, Enzymes from extremophiles, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 144–151.
- [46] A.K. Mukherjee, H. Adhikari, S.K. Rai, Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation, *Biochem. Eng. J.* 39 (2008) 353–361.
- [47] Z. Fang, Y.C. Yong, J. Zhang, G. Du, J. Chen, Keratinolytic protease: a green biocatalyst for leather industry, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 7771–7779.
- [48] H. Takagi, T. Maeda, I. Ohtsu, Y.C. Tsai, S. Nakamori, Restriction of substrate specificity of subtilisin E by introduction of a side chain into a conserved glycine residue, *FEBS Lett.* 395 (1996) 127–132.
- [49] H. Nadeem, M.H. Rashid, M.H. Siddique, Effect of Mg²⁺ and Al³⁺ ions on thermodynamic and physicochemical properties of *Aspergillus niger* invertases, *Protein Peptide Lett.* 22 (2015) 743–749.
- [50] A. Gupta, I. Roy, S.K. Khare, M.N. Gupta, Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA, *J. Chromatogr. A* 1069 (2005).
- [51] K. Jellouli, A. Bayoudh, L. Manni, R. Agrebi, M. Nasri, Purification, biochemical and molecular characterization of a metalloprotease from *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on shrimp wastes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 (2008) 989.
- [52] J. Xu, M. Jiang, H. Sun, B. He, An organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Bacillus cereus* WQ9-2: purification, biochemical properties, and potential application in peptide synthesis, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 7991–7994.
- [53] N. Hmidet, N.E.H. Ali, A. Haddar, S. Kanoun, S.K. Alya, M. Nasri, Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: characterization and potential application as detergent additive, *Biochem. Eng. J.* 47 (2009) 71–79.
- [54] A. Hammami, M. Hamdi, O. Abdelhedi, M. Jridi, M. Nasri, A. Bayoudh, Surfactant- and oxidant-stable alkaline proteases from *Bacillus invictae*: characterization and potential applications in chitin extraction and as a detergent additive, *Int. J. Biol. Macromol.* 96 (2017) 272–281.
- [55] L. Daoud, H. Hmani, M.B. Ali, M. Jliidi, M.B. Ali, An original halo-alkaline protease from *Bacillus halodurans* strain US193: biochemical characterization and potential use as bio-additive in detergents, *J. Polym. Environ.* (2016) 1–10.
- [56] R.J. Siezen, J.A. Leunissen, Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases, *Protein Sci.* 6 (1997) 501–523.
- [57] M.W. Rey, P. Ramaia, B.A. Nelson, S.D. Brody-Karpin, E.J. Zaretsky, M. Tang, A. Lopez de Leon, H. Xiang, V. Gusti, I.G. Clausen, P.B. Olsen, M.D. Rasmussen, J.T. Andersen, P.L. Jørgensen, T.S. Larsen, A. Sorokin, A. Bolotin, A. Lapidus, N. Gallon, S.D. Ehrlich, R.M. Berka, Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species, *Genome Biol.* 5 (2004).

Cadre réservé à l'administration For official use only	خاص بالإدارة
N° de dépôt Filing No	عدد الإيداع: 2018/0018
Date de dépôt Date of filing	تاريخ الإيداع: 10 JAN 2018

4. DEPOSANT 4. APPLICANT		المودع	
☒ شخص معنوي Personne morale LEGAL ENTITY		☐ شخص طبيعي Personne physique INDIVIDUAL	
Dénomination sociale : Company or business name Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS)		Nom & Prénom : Name & given name	
Statut juridique : Legal status E.P.S.T		الوضعية القانونية:	
Nationalité : Nationality Tunisienne		الجنسية:	
Rue : Street Centre de Biotechnologie de Sfax, Route Sidi Mansour Km 6, BP 1177, Sfax		العنوان: Adresse	
Code postal et ville : ZIP code and city 3063 - Sfax		الترميز البريدي والمدينة:	
Pays : Country Tunisie		البلد:	
Téléphone : Telephone (+216) 74 871 816		البريد الإلكتروني: E-mail : contact@cbs.mrt.tn	
Téléfax : Fax (+216) 74 875 818		الفاكس:	
☐ في حالة تعدد المودعين، ضع علامة في الخانة و استخدم المطبوعة " المرفق 2 " . En cas de pluralité de déposants, cochez cette case et utilisez l'imprimé « Annexe II ».			
5. INVENTEUR(S) (Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques) 5. INVENTOR(S) (Inventors are necessarily individuals)			
Nom & Prénom : Name & given name HADJIDJ Raziqa		الاسم و اللقب:	
Adresse : Address CBS, BP 1177, Sfax 3018 (Tunisie) + LCSN-BioM, Université Blida 1 (Algérie)		العنوان:	
Nom & Prénom : Name & given name MECHRI Sondes		الاسم و اللقب:	
Adresse : Address Centre de Biotechnologie de Sfax, Route Sidi Mansour Km 6, BP 1177, Sfax 3018		العنوان:	
Nom & Prénom : Name & given name EDOUAOUA Kamel		الاسم و اللقب:	
Adresse : Address LCSN-BioM, Université Blida 1, Route de Soumâa, BP 270, 09000 Blida (Algérie)		العنوان:	
Nom & Prénom : Name & given name BADIS Abdelmalek		الاسم و اللقب:	
Adresse : Address LCSN-BioM, Université Blida 1, Route de Soumâa, BP 270, 09000 Blida (Algérie)		العنوان:	
☒ في حالة تعدد المخترعين، ضع علامة في الخانة و استخدم المطبوعة " المرفق 3 " . En cas de pluralité d'inventeurs, cochez cette case et utilisez l'imprimé « Annexe III ».			
6. MANDATAIRE (le cas échéant) 6. ATTORNEY (if any)			
Nom & Prénom : Name & given name Samia Charfi Kaddour-Directeur Général de La Valorisation de la Recherche		الاسم و اللقب:	
Rue : Street Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique - Avenue Ouled Haffouz		العنوان: Adresse	
Code postal et ville : ZIP code and city 1030 - Tunis		الترميز البريدي والمدينة:	
Téléphone : Telephone 71 833 378		البريد الإلكتروني: E-mail : samia.charfikaddour@fst.utm.tn	
Téléfax : Fax 71 833 450		الفاكس:	



II- LISTE DES COMMUNICATIONS

II-1- Communications affichées présentées lors de réunions internationales :

1. **Raziqa Hadjidi**, Sondes Mechri, Mohamed El Hattab, Bassem Jaouadi & Abdelmalek Badis. Production, purification and biochemical characterization of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from *Bacillus licheniformis* suitable for peptide biocatalysis and detergent industries. Le 5^{ème} Colloque International de Chimie (CIC5-2018), 4-6 Décembre **2018** à **Batna- Algérie**.

2. **Raziqa Hadjidi**, Sondes Mechri, Kamel Eddouaouda, Abdelmalek Badis, Mohamed El Hattab & Bassem Jaouadi. Purification and characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A, newly isolated from the Algerian desert. 16^{ème} JIB2017 de l'A.T.Biotech., 18-22 Décembre **2017** à **Hammamet-Tunisie**.

3. **Raziqa Hadjidi**, Sondes Mechri, Maroua Omrane Benmradi, Mohamed El Hattab, Bassem Jaouadi & Abdelmalek Badis. Production and biochemical characterization of novel subtilisin from *Bacillus licheniformis* strain K7A isolated from the Hassi Messaoud region, Southeast of Ouargla in Algeria. 15^{ème} JIB2016 de l'A.T.Biotech., 18-22 Décembre **2016** à **Sousse- Tunisie**.

II-2- Communications affichées présentées lors de réunions nationales :

1. **Raziqa Hadjidi**, Sondes Mechri, Mohamed El Hattab, Bassem Jaouadi & Abdelmalek Badis. Microbial serine protease : Optimization of production parameters and their properties. 1^{ère} Journée Natolane Cancer, Environnement et Alimentation (JNCEA-2019), 4 Février **2019** à **Boumerdes- Algérie**.

2. **Raziqa Hadjidi**, Sondes Mechri, Mohamed El Hattab, Bassem Jaouadi & Abdelmalek Badis. Characterization of thermo-stable serine protease from isolated *Bacillus licheniformis* and evaluation of detergent application. 4^{èmes} Journée des Sciences et de la Nature de la Vie (JSNV-2018), 3-4 Octobre **2018** à **Bejaia- Algérie**.

3. **Raziqa Hadjidi**, Mohamed El Hattab & Abdelmalek Badis. Alkaline-protease from K7A *Bacillus licheniformis* : Purification, characterization and potential application as a detergent additive. Séminaire National de Biochimie –FSNV- USDB1-, 19-20 Juin **2018** à **Blida– Algérie**.

﴿قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ﴾

البقرة 32

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux.

32. Ils dirent : «Gloire à Toi! Nous n'avons de savoir que ce que Tu nous as appris. Certes c'est Toi l'Omniscient, le Sage».

AI-BAQARAH (LA VACHE) 32.