

UNIVERSITE DE TLEMCEM  
INSTITUT DE BIOLOGIE

**THESE**

Pour l'obtention du diplôme de

*Magister en Biologie*

*Option: Ecologie Animale*

*Thème*

B/377  
M64/02

**Etude de la production de protéases extracellulaires  
chez Bacillus: Evaluation semi-quantitative  
du pouvoir protéolytique et effet des acides aminés  
sur la production des protéases**

Présentée par

**MALEK Fadila**

Soutenue le 1995

Devant le jury

<b>Président</b>	: Mr CHABANE SARI, D.	Thèse unique
<b>Promoteur</b>	: Mr NGO TU THANH	Docteur d'état
<b>Examinateurs</b>	: Mr BENYOUCEF, M.	Docteur ès sciences
	Mr BOUCHERIT, K.	Docteur Ingénieur
	Mr. ABDELOUAHID, D.E.	Thèse unique

UNIVERSITE DE TLEMCCEN  
INSTITUT DE BIOLOGIE

مكتبة كلية العلوم  
ملحقه البيولوجيا

**THESE**

Pour l'obtention du diplôme de

*Magister en Biologie*

*Option: Ecologie Animale*

*Thème*

**Etude de la production de protéases extracellulaires  
chez Bacillus: Evaluation semi-quantitative  
du pouvoir protéolytique et effet des acides aminés  
sur la production des protéases**

Présentée par

MALEK Fadila

Soutenue le 1995

Devant le jury



<b>Président</b>	: Mr CHABANE SARI, D.	Thèse unique
<b>Promoteur</b>	: Mr NGO TU THANH	Docteur d'état
<b>Examinateurs</b>	: Mr BENYOUCEF, M.	Docteur ès sciences
	Mr BOUCHERIT, K.	Docteur Ingénieur
	Mr. ABDELOUAHID, D.E.	Thèse unique

*Ces mots harassants*

*arrachés au jour le jour*

*à un présent douloureux et combien hostile*

*nourris, longtemps, à la sève de l'espoir inespéré*

*à chaque fois ressuscités,*

*sont, pour moi, le témoignage de la miséricorde de Dieu*

*Louange à Dieu*

*À tous ceux pour qui ces mots ont un sens*

*en particulier, ma mère et mon père,*

*je dédie ce mémoire.*

Ce travail est le fruit d'une communion d'idées et de personnes. Il est aussi un hommage à ces mêmes idées et mêmes personnes.

Mes remerciements les plus sincères et mes sentiments les meilleurs vont à Mr NGO TU THANH, maître de conférence en microbiologie, qui a accepté de diriger ce travail et lui a consacré tant d'efforts et de temps. Outre l'enseignement scientifique qu'il m'a assuré, je lui dois celui, inestimable, du courage et de l'humilité. Je n'oublierai jamais la sérénité et la grande finesse avec lesquelles il accueillait mes interrogations perplexes et souhaiterais que le travail tel qu'il a été accompli en son absence soit digne de ce qu'il était en droit d'en attendre.

Je remercie vivement M<sup>r</sup> CHABANE SARI, D. maître de conférence à l'institut de biologie de Tlemcen, qui a bien voulu s'intéresser à ce travail et me faire l'honneur d'en présider le jury de soutenance.

J'exprime ma profonde gratitude et ma grande sympathie à Mr BOUCHERIT, K. chargé de cours à l'institut de Biologie de Tlemcen et Mr ABDELOUAHID, D.E., maître assistant à l'institut de Biologie de Tlemcen, qui ont su, généreusement, trouver le temps et la patience de lire ce manuscrit et d'y apporter les corrections nécessaires. Je les remercie pour les très nombreuses et très valables suggestions qu'ils ont faites pour en améliorer la valeur scientifique. Je suis également honorée par leur participation au jury de cette thèse.

J'exprime mes plus vifs remerciements au Dr BENYOUCEF, responsable du Laboratoire de Biochimie au C.H.U. de Tlemcen qui, malgré ses nombreuses occupations, a accepté de juger ce travail.

Je remercie très respectueusement Mr le professeur KHALID MADJID HAMEED pour l'empressement avec lequel il a entrepris la lecture de ce manuscrit, les critiques qu'il y a apportées et pour l'intention qu'il avait de suivre de près l'achèvement de ce travail.

Je ne saurai jamais remercier assez Messieurs HASSAINE Abdelkader et MOUSSA BOUDJEMAA B., pour les longues nuits qu'ils ont passées au laboratoire afin d'y effectuer les prélèvements des heures tardives. C'est grâce à un tel dévouement que rien ne peut récompenser, que j'ai pu terminer ce travail.

Ma reconnaissance s'adresse également au Dr MELZI de l'institut Pasteur d'Algerie pour l'aide qu'il m'a apportée, en particulier, dans l'identification de la souche bactérienne.

J'adresse aussi mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes de l'institut de Biologie ou d'ailleurs qui, de la manière la plus infime qui soit, m'ont aidée à réaliser ce travail, particulièrement, M<sup>lle</sup> KORSO FECIANE Nadia, pour son aimable collaboration.

Enfin, tout ce recueil, dans ses moindres lignes porte la trace du soutien moral et matériel, constamment renouvelé, de celles qui se nomment mes amies. C'est dans ces mêmes lignes que j'espère, qu'elles trouveront l'expression de toute ma reconnaissance.

# TABLE DES MATIERES

Résumé.....	1
présentation du sujet .....	2

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Introduction.....	3
II. Généralités sur le genre Bacillus.....	3
III. Les protéases extracellulaires de Bacillus....	6
III-1. Définition et rôle physiologique .....	6
III-2. Importance industrielle .....	7
III-3. Caractérisation générale des protéases .....	7
<u>III-3-1. Les séryl protéases alcalines</u> .....	8
<u>III-3-2. Les métalloprotéases neutres</u> .....	8
III-4. Régulation de la synthèse de protéases .....	9
<u>III-4-1. Les gènes régulateurs pléiotropes</u> .....	11
<u>III-4-2. Le phénomène de répression</u> .....	11
<u>III-4-3. Le phénomène d'induction</u> .....	12
IV. Détermination du pouvoir protéolytique .....	13
IV-1. Les techniques de diffusion sur plaque .....	14
<u>IV-1-1. Les techniques de culture sur milieu solide</u> ..	14
<u>IV-1-2. Diffusion des solutions d'enzymes à travers un</u> <u>gel d'agar</u> .....	15
IV-2. Dosage des produits d'hydrolyse solubles ....	15

## MATERIEL ET METHODES

I. Isolement des souches .....	16
I-1. Sources d'isolement .....	16

I-2. Techniques d'isolement .....	16
I-3. Purification .....	17
II. Détermination du pouvoir protéolytique des souches isolées et screening.....	17
II-1. Techniques semi-quantitatives.....	17
II-1-1. <u>Technique 1</u> .....	17
II-1-1-1. <i>Milieu de culture</i> .....	17
II-1-1-2. <i>Ensemencement</i> .....	18
II-1-2. <u>Technique 2</u> .....	18
II-1-3. <u>Technique 3</u> .....	19
II-2. <u>Technique quantitative</u> .....	19
II-2-1. <u>Les cultures de production de protéases</u> .....	19
II-2-2. <u>Récupération des solutions de protéases</u> .....	20
II-2-3. <u>La réaction enzymatique</u> .....	20
II-2-4. <u>Dosage de la tyrosine soluble</u> .....	21
III Influence des acides aminés sur la production de protéase chez la souche S70.....	21
III-1. En milieu minimal (conditions d'induction) .	22
III-2. En milieu SM (conditions de répression) ....	22
IV. Essai de caractérisation des protéases de la souche S70.....	23
IV-1. Effet de la température sur l'activité des protéases .....	23
IV-2. Effet du pH sur l'activité des protéases ....	23
IV-3. Effet des inhibiteurs .....	23

## RESULTATS ET DISCUSSION

I. Isolement .....	25
--------------------	----

II.	Evaluation semi-quantitative du pouvoir protéolytique des souches isolées .....	26
II-1.	Les souches protéolytiques .....	28
II-2.	Importance du pouvoir protéolytique des souches protéolytiques .....	28
II-3.	Les souches non protéolytiques .....	30
II-4.	Les souches non développées .....	30
II-5.	Classement des souches protéolytiques selon les différentes techniques de diffusion sur plaque	31
III.	Sélection finale et caractères de la souche choisie: la souche S70.....	33
IV.	Influence des acide aminés sur la production de protéases chez la souche S70 .....	35
IV-1.	Cas de l'induction .....	35
IV-1-1.	<u>Mélanges d'acides aminés et de peptides</u> .....	35
IV-1-2.	<u>Les acides aminés un à un</u> .....	37
IV-2.	Cas de la répression .....	41
IV-2-1.	<u>Mélange d'acides aminés</u> .....	41
IV-2-1-1.	<i>Hydrolysat de caséine</i> .....	41
IV-2-1-2.	<i>Ajout de l'hydrolysat de caséine à T7 et T13</i> .....	41
IV-2-1-3.	<i>Mélanges d'acides aminés naturels</i> .....	44
IV-2-2.	<u>Les acides aminés individuels</u> .....	44
IV-2-2-1.	<i>Ala, Gly</i> .....	44
IV-2-2-2.	<i>Val, Tyr</i> .....	47
IV-2-2-3.	<i>Leu, Cys</i> .....	49
IV-2-2-4.	<i>Arg, Trp</i> .....	51
IV-2-2-5.	<i>Asp, Glu, Phe</i> .....	51
IV-2-2-6.	<i>La cystéine à différentes concentrations</i> .....	54
IV-2-2-7.	<i>Ajout de la cystéine à T7 et T13</i> .....	54
IV-2-3.	<u>Les combinaison d'acides aminés</u> .....	54

IV-2-3-1. Combinaison de deux acides aminés .....	54
IV-2-3-2. Combinaison de trois acides aminés .....	57
V. Propriétés générales des protéases de la	
souche S70 .....	60
V-1. Températures optimales .....	60
V-2. pH optimaux .....	62
V-3. Identification des sites actifs .....	64
Conclusion générale .....	67
Référence bibliographiques.....	69
Annexe.....	86

## LISTE DES ABREVIATIONS

AR	: Activité relative
DFP	: Diisopropylfluorophosphate
EDTA	: Ethylène diamine tétracétate
H.C.	: Hydrolysate de caséine
H <sub>g</sub> Cl <sub>2</sub>	: Chlorure de mercure
P	: peptone
PCMB	: Para chloro mercuri benzoate
PMSF	: Phényl méthyl sulfonyl fluorure
SM (milieu)	: milieu de SCHLEGEL modifié
Tris	: (Hydroxy méthyl) amino méthane
TGEA	: gélose glucosée à l'extrait de levure
UA	: unité d'activité

## RÉSUMÉ

La première partie de ce travail porte sur l'évaluation semi-quantitative du pouvoir protéolytique d'un ensemble de 178 souches de *Bacillus* isolées du sol et de substrats alimentaires. La souche S70 originaire du sol présente le pouvoir protéolytique le plus important.

L'étude de la production de protéases extracellulaires chez cette souche a montré qu'il s'agit d'enzymes répressibles dont la synthèse est sous l'effet des acides aminés et peptides. Ceux-ci sont ajoutés au milieu de culture sous forme d'acides aminés naturels et d'hydrolysats de caséine. Une diminution de la production de protéase est notée en présence de l'hydrolysat de caséine et du mélange de 11 acides aminés, aux concentrations élevées (1%). Les acides aminés testés individuellement ont des effets variables. Certains d'entre eux sont potentiellement inducteurs (Ala et Gly) ou stimulent simplement la production de protéase (Leu, Asp et Arg), d'autres (Phe et Glu) sont sans effet significatif. Une répression plus ou moins importante est observée en présence de tyr, trp et Val tandis que la cystéine réprime complètement la production d'enzyme.

Les protéases de cette souche ont également été identifiées. L'action des inhibiteurs a révélé la présence d'au moins deux protéases extracellulaires différentes dans le surnageant de culture, une séril protéase alcaline inhibée par le PMSF et une métalloprotéase neutre sensible à l'action de l'EDTA.

## PRESENTATION DU SUJET

L'exploitation industrielle des microorganismes pour la fabrication de substances utiles couvre une gamme de produits très variés et révèle des possibilités infinies chez ces microorganismes. La production d'enzymes revêt un intérêt tout particulier, vu les domaines d'application de plus en plus nombreux.

La recherche d'une nouvelle enzyme commence par l'isolement et la sélection du meilleur producteur naturel de cette enzyme. Dès lors le choix d'une technique permettant d'évaluer l'aptitude des germes à produire l'enzyme en question s'avère une grande nécessité. La définition des conditions de culture notamment la composition du milieu de culture et l'identification des métabolites répresseurs ou inducteurs de la production d'enzyme, constitue l'étape suivante. Les propriétés de l'enzyme sont également importantes à connaître afin d'établir si celle ci possède des propriétés compatibles avec les conditions des processus industriels et convient, par conséquent, à une exploitation de cet ordre.

Notre étude se situe dans ce cadre. Après évaluation du pouvoir protéolytique d'un ensemble de souches de Bacillus par une technique semi-quantitative, l'aptitude de la meilleure souche productrice de protéases, à produire ces enzymes est examinée dans des conditions d'induction et de répression, réalisées par la supplémentation des milieux de culture en acides aminés. Une caractérisation sommaire des protéases extracellulaires produites par cette souche est également entreprise.

SYNTHÈSE  
BIBLIOGRAPHIQUE

## **I. Introduction**

La plupart des enzymes utilisées actuellement en industrie sont produites par les bactéries et les champignons. [Il s'agit d'hydrolases non hautement purifiées constituées principalement de protéases et d'amylases. Les enzymes d'origine fongique sont le plus souvent obtenus des espèces d'*Aspergillus* et de plus en plus de levures (WISEMAN, 1993). Parmi les bactéries, les espèces qui appartiennent au genre *Bacillus* jouent un rôle capital. *Bacillus* est surtout important par la production de protéases extracellulaires.

Deux raisons principales sont à l'origine de l'essor important que connaissent ces protéases de *Bacillus*. D'une part, leurs propriétés remarquables de stabilité et d'activité dans les détergents, leur ont assuré un usage intense dans cette industrie, dès les années soixante (BARFORD, 1981). D'autre part, ces mêmes enzymes, par leur actions dégradatives contre les protéines des gènes hétérologues, font obstacle à l'utilisation des espèces de ce genre pour la production de ces protéines (DOI et al, 1991; WANG et al, 1989; HE et al, 1991b). La réduction des taux de synthèse de ces enzymes est adoptée comme la solution à ce problème, ce qui a suscité le développement intense des études génétiques de la régulation.

Les protéases de *Bacillus* ont également fait l'objet de travaux nombreux de purification et de caractérisation (SHISHKOVA et al, 1975; YAN et al, 1985; KUNITATE et al, 1989; SHIMOGAKI et al, 1991).

La régulation de la synthèse de ces enzymes et leur caractérisation sont ainsi les deux aspects sur lesquels portent les études actuelles.

## **II. Généralités sur le genre *Bacillus***

*Bacillus* appartient à la famille des Bacillaceae, un groupe hétérogène de bactéries formant des endospores. La formation d'endospores étant le seul critère taxonomique retenu, des organismes très variés sont classés ensemble /

(PRIEST et GRIGOROVA, 1990). La dernière édition du Bergey's manual, (1986) décrit six genres bactériens formant des endospores. Un genre supplémentaire, le genre Thermoactinomyète est cité par PRIEST et GRIGOROVA, (1990).

Un fait mérite d'être souligné. La morphologie cellulaire en forme de bâtonnet, bien que dominante (Bacillus, Clostridium, Sporolactobacillus et Desulfotomaculum) n'est pas la seule représentée. Des cocci (Sporosarcina) et des bactéries filamenteuses (Thermoactinomyces) sont également présentes. La plupart de ces organismes sont Gram-positifs mobiles et peuvent être aérobies stricts, anaérobies stricts ou anaérobies facultatifs. Bacillus se présente sous forme de bâtonnets droits, aérobie strict ou anaérobie facultatif et produisant généralement une catalase (Bergey's manual, 1986). Ces caractères permettent de le distinguer des autres genres formant des endospores ainsi que de genres voisins non sporulants/comme le montre le Tableau 1.

/Bacillus se distingue aussi par le nombre et la diversité des ses espèces. Le Bergey's manual, (1986) reconnaît 34 espèces parfaitement identifiables. De nombreuses autres espèces, dont la classification n'est pas encore bien définie, sont décrites, parmi elles, *B. amyloliquefaciens* et *B. natto* importantes sur le plan industriel pour la production de protéases et d'amylases (AUNSTRUP, 1979). L'identification des espèces de Bacillus est en effet problématique du fait de leur grand nombre et de leur variabilité phénotypique et même génomique (STACKEBRANDT et al, 1987). Certains auteurs sont même en faveur de la division du genre en cinq ou six genres nouveaux (BERKELEY et al, 1984; ALEXANDER et PRIEST, 1990).

/Cependant, une caractéristique commune à toutes les espèces de Bacillus, est la production d'enzymes extracellulaires, dont les protéases. *B. subtilis*, *B. Licheniformis* et *B. amyloliquefaciens* sont les principaux producteurs de protéases à l'échelle industrielle.

**Tableau n°1:** Principaux caractères de différenciation entre *Bacillus*, les autres genres formant des spores et des genres voisins non sporulants.

D'après le Bergey's manual, 1986.

\* PRIEST ET GRIGOROVA, 1990.

Genres formant des spores	Morphologie cellulaire	Rapport avec l'oxygène	Catalase	Mobilité
1° <i>Bacillus</i>	bâtonnet droit	aérobie strict/ anaérobie facultatif	+	+
2° <i>Clostridium</i>	bâtonnet	anaérobie strict	-	+
3° <i>Sporolactobacillus</i>	bâtonnet	anaérobie facultatif microaérophile	-	+
4° <i>Desulfatocaulum</i>	bâtonnet/ bâtonnet incurvé	anaérobie strict	-	+
5° <i>Sporosarcina</i>	coccie	aérobie strict	+	+
6° <i>Oscillospira</i>	bâtonnet/ filaments incurvés	anaérobie	non déterminé	+
7° <i>Thermoactinomyète</i> *	filaments ramifiés	aérobie	/	
<b>Genres non sporulants</b>				
1° <i>Planococcus</i>	coccies	aérobie strict	+	+
2° <i>Lactobacillus</i>	bâtonnet	anaérobie facultatif	-	+
3° <i>Kurthia</i>	bâtonnet ou filaments incurvés	aérobie strict	+	+

### III. Les protéases extracellulaires de *Bacillus*.

#### III-1. Définition et rôle physiologique

/Ces enzymes sont produites pendant la croissance de la bactérie et excrétées complètement dans le milieu de culture (PRIEST, 1977). Elles sont caractérisées par une spécificité d'action beaucoup plus large que celle des enzymes d'origine animale (MILLET, 1969)/

Leur rôle physiologique n'est pas encore connu de façon précise. Il est habituellement reconnu que ces enzymes jouent un rôle principalement dans le renouvellement protéique et la sporulation (LEVISOHN et ARONSON, 1967; ARONSON et al, 1973 et SANCHEZ-SALAS et SELTON, 1993), bien que, parfois, cette fonction soit attribuée aux protéases intracellulaires (CHENG et ARONSON, 1977 et MILLET et GREGOIRE, 1979). La relation avec la sporulation est, en effet, controversée. Elle a été précisée dans certains cas grâce à l'analyse des mutants asporogènes (MILLET et al, 1976) et des mutants déficients en protéases extracellulaires (WANG et al, 1989).

Les études génétiques de la régulation de la synthèse des protéases ont, de leur côté, pu montrer que l'expression des protéases est affectée par les mêmes conditions physiologiques ou lésions génétiques qui affectent la sporulation (YANG et al, 1984). Les gènes de ces enzymes sont soit régulés par certains gènes de la sporulation soit en coordination avec eux (DOI, 1991; HE et al, 1991a).

Cependant, dans de nombreux cas, l'absence de relation entre les deux phénomènes est telle qu'il n'est pas surprenant de voir des auteurs attribuer aux protéases de *Bacillus* le rôle d'enzymes « Scavenger » dont la seule fonction serait de dégrader les polymères de l'environnement (PRIEST, 1977 et YANG et al, 1984).

### **III-2. Importance industrielle**

L'application des protéases extracellulaires de *Bacillus* couvre les secteurs industriels les plus divers. En plus des détergents, on peut citer: l'utilisation des hydrolysats protéiques par les industries alimentaires et pharmaceutiques (VUILLEMARD et al, 1988 et TURGEON et al, 1991), le tannage des peaux dans l'industrie du cuir (CHANDRASEKARAN et DHAR, 1982). Leur emploi dans l'industrie alimentaire intéresse également l'attendrissement de la viande, la pannification (FOGARTY et al, 1974) et la coagulation du lait pour la fabrication de fromages (Mc KELLAR et NICHOLS-NELSON, 1984; EL MAYDA et al, 1986 et LOPEZ-FRANDINO et al, 1991). Une autre application intéressante de ces enzymes est l'hydrolyse de la gélatine pour la récupération de l'argent des films photographiques usagés (FUJIWARA et al, 1989; 1991; CHEUNG et al, 1991).

### **III-3. Caractérisation générale des protéases**

Parmi les caractères qui permettent d'identifier et de caractériser les protéases microbiennes, les plus couramment recherchés sont les optimums de pH et de température de l'activité enzymatique, l'action des inhibiteurs et la spécificité de substrat. Il est courant de voir les auteurs classer les protéases en fonction de leurs pH optimaux en protéases acides, neutres et alcalines (FOGARTY et al, 1974 SHISHKOVA et al, 1975). Cette classification rejoint celle qui tient compte des groupements fonctionnels des sites actifs (PRIEST, 1977). Les protéases de *Bacillus* sont ainsi classées en séryl protéases alcalines, métalloprotéases neutres et protéases acides. Ces dernières ne sont pas spécifiques du genre *Bacillus*, bien que parfois décrites (MURAO et al, 1988). Elles sont surtout produites par les moisissures (Wang et al, 1974; NAKADAI et NASUNO, 1977 et BARTHOMEUF et al, 1989).

Par contre les protéases alcalines et les protéases neutres sont les deux protéases extracellulaires majeures de

Bacillus. Elles sont produites en quantité importante et par un grand nombre d'espèces. Elles ont également fait l'objet de nombreuses revues de synthèse. Celles de FOGARTY et al (1974) et PRIEST (1977) en exposent les principales caractéristiques.

### III-3-1. Les séryl protéases alcalines

Ces enzymes possèdent un résidu sérine à leur site actif. Elles sont inhibées par le DFP et le PMSF qui sont les inhibiteurs des protéases à sérine les plus utilisés. leurs pH optimaux sont élevés (9 - 11). Elles sont stabilisées aux températures élevées par les ions de calcium. L'exemple type de ces protéases sont les subtilisines représentées en industrie par la subtilisine Carlsberg de *B. licheniformis* et la subtilisine BPN' de *B. amyloliquéfaciens* (AUNSTRUP, 1979 et FRANKENA et al, 1988).

Des séryls protéases hautement alcalines produites par des Bacillus alcalophiles sont de découvertes plus récentes (FUJIWARA et al, 1991 et SHIMOGAKI et al, 1991). Elles se distinguent des subtilisines par des pH d'activité encore plus élevés.

### III-3-2. Les métalloprotéases neutres

Celles ci possèdent un atome de zinc à leur site actif et 2 à 4 ions de calcium nécessaires à la stabilité de l'enzyme (McCONN et al, 1964; TSURU et al, 1964, 1966). Elles sont sensibles à l'action des chélateurs de métaux, le plus employé est l'EDTA. Leur spécificité d'action est assez étroite et est caractérisée par la coupure de la liaison péptidique faisant intervenir le groupe aminé des acides aminés hydrophobes (TSURU et al, 1967; MILLET et ACHER, 1969; DESMAZEAUD et HERMIER, 1971 et STOEVA et KLEINSCHMIDT, 1989).

Leurs pH optimaux sont proches de la neutralité. Elles sont moins stables que les séryl protéases alcalines. cependant, c'est à cette catégorie d'enzymes qu'appartiennent les thermolysines, enzymes hautement résistantes à l'inactivation thermique et produites par les Bacillus

Tableau n°2: Quelques exemples de protéases extracellulaires de Bacillus.

Classe de protéases	Exemples d'espèces productrices	Rang de pH		Stabilité thermique	Inhibiteurs	Références
		Max d'activité	Max de stabilité			
<u>Seryl protéases alcalines</u>						
- Subtilisines	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheriformis</i>	9-11	5-11	Thermolabile(a)	DFP - PMSF	FOGARTY et al, 1974
- Protéase TH.	<i>B. thurigiensis</i>	8-9	7-11	Thermostable(b)	PMSF-PCMB*	KUNITATE et al, 1989
<u>Seryl protéases hautement alcalines</u>	Bacillus sp-Y (alcalophile)	10-12,5	6,5-13	Thermostable(c)	DFP - PMSF	SHIMOGAKI et al, 1991
	Bacillus sp(B21-R) (alcalophile)	10,5-11,5	5-11,5	Thermolabile(a)	HgCl <sub>2</sub> - DFP	FUJIWARA et YAMAMOTO, 1987
<u>Metalloprotéases neutres</u>						
- Megatéropeptidases	<i>B. megaterium</i>	7-8	7-9	Thermolabile(a)	EDTA	MILLET, 1969
- Thermolysine	<i>B. thermoproteolyticus</i>	7-8	7-9	Thermostable(d)	EDTA	WEAVER et al, 1975

(a): inactivation à 60-65°C

(c): 40% d'activité 10' à 80°C

(b): 20% d'activité 15' à 70°C

(d): 80% d'activité 1 heure à 80°C

\* PCMB: para chloromercuribenzoate: inhibiteur des protéases à groupement thiol qui constituent un sous groupe des protéases à sérine (KUNITATE et al, 1989).

#### III-4-1. Les gènes régulateurs pléiotropes

L'accent est surtout mis sur la régulation pléiotrope vu le nombre de gènes qui lui sont associés (NAGAMI et TANAKA, 1986; TANAKA et al, 1987; TANAKA et KAWATA, 1988; WONG et al, 1988; WANG et DOI, 1990). Ces gènes sont connus pour augmenter la production de protéase, ils interviennent au niveau de la transcription.

Cette richesse en gènes régulateurs chez *Bacillus* est souvent expliquée par une grande faculté d'adaptation de ces bactéries aux multiples changements de l'environnement (DOI, 1991; HE et al, 1991a).

Un exemple de la sensibilité de certains de ces gènes régulateurs aux conditions du milieu de culture est, en effet, donné par le système *deg*: une paire de gènes, régulateurs pléiotropes, connu également sous le nom de système régulateur à deux composés (MSADEK et al, 1990; 1991; 1993; MUKAI et al, 1990; 1992; TANAKA et al, 1991; KUNST et al, 1994). L'effet de la paire de gènes du système *deg* est modulé par l'état nutritionnel de la cellule. Une carence en acides aminés et phosphore stimule leur expression, un excès de glucose la réprime. (MSADEK et al, 1991).

#### III-4-2. Le phénomène de répression

En milieu complexe, la synthèse de protéases extracellulaires chez *Bacillus*, a lieu en fin de phase exponentielle, début de la phase stationnaire (ARBIGE et al, 1993). Elle est décrite comme le résultat de la dérégulation des gènes de protéases, qui surviendrait quand la culture s'appauvrit en élément nutritif. En effet, il est largement admis que les composés azotés et carbonés facilement assimilables répriment la synthèse de protéases extracellulaires chez divers microorganismes (DRUCKER, 1972; 1973; HOLZER et HEINRICH, 1980; CHAMBLISS, 1993). L'effet inhibiteur des acides aminés chez *Bacillus* est souligné

(TSURU, 1962a; 1962b; 1962c; 1963a; 1963b; LEVISOHN et ARONSON, 1967; SLAPIKOFF et al, 1971 et KOLEV, 1978) ceux ci sont supposés jouer un rôle soit dans la répression catabolique (MILLET et AUBERT, 1969; PRIEST, 1977) soit dans une répression du type par produit final (PRIEST, 1977).

### III-4-3. Le phénomène d'induction

Bien que l'induction soit rapportée pour les enzymes dégradatives extra-cellulaires de *Bacillus* (PRIEST, 1977), elle n'est pas clairement établie dans les cas des protéases. Selon ce même auteur, ces enzymes sont au moins partiellement inductibles, toutefois, la nature exacte des substrats potentiellement inducteurs n'est pas précisée. Pour RAPOPORT (Communication personnelle), l'induction, qu'il préfère décrire comme une dérégulation, varie considérablement suivant les milieux de culture. Néanmoins, dans le cas du système deg, il est clairement fait état du phénomène d'induction. Selon MSADEK et al (1993) et KUNST et al (1994), ce système fonctionne en réponse à des stimuli intra ou extra-cellulaires grâce à la présence d'un récepteur capable de transmettre le signal capté à un effecteur qui est un activateur de la transcription. Cependant la nature de ces signaux n'est toujours pas connue.

L'induction des protéases par les protéines est fortement rejetée. Aucun effet inducteur n'est attribué à la caséine (ROWE et GILMOUR, 1983). L'induction en présence de la sérum albumine bovine, constatée dans le cas de *Neurospora crassa* est attribuée aux produits de l'Hydrolyse ménagée de la protéine en question (DRUCKER, 1973; COHEN et DRUCKER, 1977).

En effet, il est reconnu, qu'en raison de leur taille, les protéines ne peuvent être directement impliqués dans les processus d'induction mais plutôt leurs produits d'hydrolyse. Cette induction par les acides aminés et les peptides, déjà

rapportée dans le cas des moisissures (DESMAZEAUD et HERMIER, 1968; GRIPON et BERGERE, 1972; LENOIR et al, 1973; HANSON et MARZLUF, 1973) et des bactéries (KOLEV, 1978 et HELLIO et al, 1993) tendrait à rendre compte de la complexité du phénomène.

#### **IV. Détermination du pouvoir protéolytique**

L'examen de la littérature concernant l'évaluation de l'activité protéolytique chez les bactéries révèle une grande diversité dans les méthodes employées. Cette diversité concerne essentiellement les conditions opératoires de mise en oeuvre de ces techniques. La composition du milieu de culture, la concentration en certains éléments, le pH et la température sont les facteurs clés sur lesquels s'opèrent à chaque fois les modifications. Cependant en considérant les principes à la base de ces techniques, on distingue principalement deux types d'analyse.

- Celles qui tiennent compte des zones d'hydrolyse apparues suite à la diffusion d'enzymes protéolytiques sur un milieu solide (PROTH et al, 1976; CHANDRASEKARAN et DHAR, 1982 et VUILLEMARD et al, 1985) ou simplement sur un gel d'agar (CHEESEMAN, 1963, LAWRENCE et SANDERSON, 1969 et MONTVILLE, 1983).

- Le deuxième type comprend les techniques de dosage des produits solubles qui résultent de l'hydrolyse, en milieu liquide, de la protéine substrat.

A côté de ces méthodes, d'autres techniques d'un usage plus restreint sont récemment développées (LOPEZ-FRANDINO et al, 1991, CHEUNG et al, 1991), en plus de l'ancienne méthode de Kjeldhal (LAME, 1976; ELMAYDA et al, 1985; 1986) /

Cette diversité dans les techniques traduit essentiellement le besoin d'une technique qui satisfait aux exigences d'une mesure du pouvoir protéolytique rigoureuse et sensible et explique le souci toujours présent d'améliorer les techniques déjà existantes et de mettre au point des nouvelles (MARTLEY et al, 1970; SOKOL et al, 1979; CLIFFE et LAW, 1982).

#### **IV-1. Les techniques de diffusion sur plaque**

Elles ne sont pas exclusives des protéases mais s'appliquent à de nombreuses enzymes microbiennes extracellulaires (PRIEST et GRIGOROVA, 1990). Des protéases d'origine animale et végétale sont également recherchées par les techniques de diffusion sur plaque (CARTER et SYKES, 1961; SCHILL et SCHUMACHER, 1972). Elles reposent toutes sur le principe de la diffusion des enzymes à travers une gélose, la digestion du substrat enzymatique et l'apparition de zones transparentes dans un environnement opaque ou coloré ou de zones opaques sur un fond transparent.

D'une façon générale on distingue deux variantes de la technique de diffusion sur plaque.

##### **IV-1-1. Les techniques de culture sur milieu solide**

Les milieux utilisés sont essentiellement à base de lait, l'hydrolyse de la caséine du lait étant considéré comme le meilleur indicateur d'une activité protéolytique (MARTLEY et al, 1970). Dans leur formule la plus simple il s'agit de gélose au lait à 10% de lait écrémé « milk agar » (VUILLEMARD et al, 1985). Parfois, le lait est additionné à un milieu simple ou sélectif à des taux de 1 à 2% (MARTLEY et al, 1970; SOKOL et al, 1979) ou simplement à une solution de sels minéraux. C'est le cas du milieu de SCHLEGEL, 1961 modifié par THANH (1978) et de celui de CHANDRASEKARAN et DHAR (1982).

Les diamètres des zones qui apparaissent sur ces milieux autour des colonies peuvent être mesurés et renseignent sur l'importance du pouvoir protéolytique. En plus de la protéolyse, ces zones claires peuvent, toutefois, traduire une production éventuelle d'acide, ce qui rend souvent nécessaire l'emploi d'agent précipitant des protéines pour délimiter les zones de protéolyse réelle (MARTLEY et al, 1970; VUILLEMARD et al, 1985). Ce problème ne se pose pas avec les espèces de Bacillus, qui dans leur majorité ne fermentent pas le lactose et ne peuvent pas produire de l'acide dans du lait écrémé (Mc KELLAR et NICHOLS-NELSON, 1984).

Ces techniques sont qualitatives ou semi-quantitatives et conviennent bien pour la sélection de microorganismes protéolytiques.

#### IV-1-2. Diffusion des solutions d'enzymes à travers un gel d'agar

Cette technique n'est pas nouvelle. Déjà en 1953, REID et SOLOMON (CARTER et SYKES, 1961) l'utilisent pour la détermination d'enzymes saccharifiantes. Les méthodes telles qu'utilisées actuellement sont inspirées de celle mise au point par CHEESEMAN (1963).

Dans tous les cas, la protéine substrat est incorporée dans un gel d'agar. Les solutions d'enzymes contenues dans des puits percés dans la gélose diffusent en développant des zones d'hydrolyse. Là aussi, la caséine s'avère le substrat le plus favorable (CHEESEMAN, 1963; LAWRENCE et SANDERSON, 1969 et ARVIDSON, 1973).

Ces techniques sont utilisées pour des déterminations d'ordre quantitatif (MONTVILLE, 1983 et WIKSTROM, 1983).

#### **IV-2. Dosage des produits d'hydrolyse soluble**

Il s'agit de méthodes spectrophotométriques ou colorométriques basées sur la mesure de la tyrosine et du tryptophane soit à 280 nm soit à 580 - 600 nm après action du réactif de Folin-Ciocalteu. La caséine pure est le substrat enzymatique le plus couramment utilisé.

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui libère une micromole de tyrosine par minute dans les conditions du dosage. L'activité spécifique est souvent déterminée. Les protéines sont dans la plupart des cas, mesurées par la méthode de LOWRY.

MATERIEL  
ET  
METHODES

## **I. Isolement des souches**

### **I-1. Sources d'isolement**

Nous avons isolé les souches de Bacillus à partir du sol de l'Institut de Biologie de Tlemcen, du lait cru ou pasteurisé et de la viande du commerce.

Pour les échantillons provenant du sol, les prélèvements sont réalisés en enfonçant simplement une cuillère préalablement stérilisée dans le sol à une profondeur de 5 à 10 cm. La terre ainsi prélevée est ensuite placée dans des boîtes de pétri stériles.

### **I-2. Techniques d'isolement**

Les espèces de Bacillus cultivent bien sur milieux ordinaires. L'isolement sélectif de ces bactéries met à profit la résistance de leurs spores à la chaleur. La littérature scientifique préconise 10 minutes à 70 - 80 °C.

A partir des échantillons, on prépare des dilutions décimales dans de l'eau physiologique. On fait subir à ces échantillons et à leurs dilutions un traitement thermique, dans un bain marie, à 80 °C pendant 10 min. Les tubes sont ensuite refroidis sous un jet d'eau froide.

Pour l'ensemencement, nous avons utilisé soit la gélose nutritive soit le milieu TGEA. 0,1 ml des formes sporulées des bactéries sont ainsi étalées à la surface de ces milieux. Les incubations à 30 °C ± 1° durent 24 à 48 heures.

Un frottis est réalisé à partir de chaque type de colonie et observé au microscope après coloration de Gram. Les cellules dont la morphologie cellulaire est en forme de bâtonnet caractéristique du genre Bacillus, dans les cellules jeunes et contenant une spore bien visible dans les cellules âgées, ou entièrement à l'état de spores libres, sont conservées à 4 °C sur gélose nutritive inclinée.

### **I-3. Purification**

Quand il s'avérait nécessaire, les souches étaient purifiées en utilisant la technique classique des dilutions - étalement- sur milieu solide. une colonie bien isolée est de nouveau diluée puis ensemencée. La pureté de la souche est vérifiée par un examen microscopique après coloration au bleu de méthylène.

Pour confirmer l'appartenance au genre *Bacillus* des souches, nous avons examiné les caractères suivants:

- La morphologie et la position de la spore: bien qu'aucune méthode spéciale de coloration n'ait été utilisée (une technique au vert malachite a été tentée sans succès), on a pu observer les spores, grâce à leur réfringence, à l'intérieur des cellules bactériennes ou à l'état libre par la simple coloration au bleu de méthyle ou la double coloration de Gram.

- La mobilité par examen microscopique à l'état frais.

- La recherche de la catalase.

## **II. Détermination du pouvoir protéolytique des souches isolées et screening.**

### **II-1. Techniques semi-quantitatives**

#### **II-1-1. Technique 1**

Le pouvoir protéolytique de l'ensemble des souches isolées a été évalué par une technique de diffusion sur plaque selon les travaux de THANH (1978).

#### **II-1-1-1. Milieu de culture**

Aussi bien pour les déterminations du pouvoir protéolytique sur milieu solide que pour les cultures de production de protéases en milieu liquide, nous avons utilisé un seul milieu de culture: le milieu de SCHLEGEL, modifié (SM). (THANH, 1978).

Ce milieu est préparé en deux parties.

- La solution minérale composée de  $K_2HPO_4$  0,5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g,  $CaCl_2$  0,01 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01 g, NaCl 1 g, dissout dans 900 ml d'eau de robinet. 15 à 20 g d'agar sont ajoutés dans le cas du milieu solide. Cette partie du milieu de culture est autoclavé 15' à 120 °C.

- Une solution concentrée (10%) de lait écrémé. Cette solution est portée à ébullition pendant 30 min soit en autoclave ouvert soit dans un bain marie. Un traitement thermique excessif du lait réduit la quantité de protéases produites (HEGAZI, 1990).

Les pH des deux solutions sont ajustés de telle manière que le pH final du milieu soit 6,8-7. Les deux solutions sont mélangées aseptiquement. Le milieu ainsi obtenu est de couleur blanchâtre, il est coulé immédiatement dans des boîtes de pétri de 14 cm de diamètre, à raison de 30 ml par boîte, et maintenu à 4 °C.

#### **II-1-1-2. Ensemencement**

Les souches conservées sur gélose nutritive inclinée sont laissées environ une heure à la température ambiante avant l'ensemencement. Celui-ci est réalisé par des stries transversales suffisamment espacées à la surface du milieu de culture, bien solide. Plusieurs souches sont ensemencées dans une même boîte.

Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 48-72 h. Une première lecture est effectuée à 24 h, une autre à 48h, et une dernière à 72 h. On mesure le diamètre de la culture qui s'est développée le long de la strie d'ensemencement (a) et celui de la zone d'hydrolyse qui l'entoure (b). Le rapport a/b reflète l'importance du pouvoir protéolytique.

#### **II-1-2. Technique 2**

Le pouvoir protéolytique des meilleures souches productrices de protéases, est évalué par la même technique de diffusion sur plaque modifiée selon la technique décrite par VUILLEMARD et al (1985).

Les souches sont d'abord cultivées sur le milieu de SCHLEGEL modifié liquide, puis à partir, de ces cultures et de leurs dilutions, on effectue des ensemencements par étalement sur le milieu solide coulé en boîte.

Les incubations à 30 °C durent 48 h avec une première lecture à 24 h. Les diamètres des zones claires qui apparaissent autour des colonies sont mesurées.

### **II-1-3. Technique 3**

Pour cette technique, on s'est inspiré des travaux de CARTER et SYKES (1961) et MONTVILLE (1983). Les mêmes souches à pouvoir protéolytiques élevés sont ainsi testées.

Le milieu de SCHLEGEL modifié est utilisé à la place du gel de caséinate de sodium décrit par ces mêmes auteurs. Après solidification du milieu dans les boîtes de pétri, on coupe dans la gélose des puits d'environ 0,5 cm de diamètres à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Ces puits sont remplis avec les solutions de protéases obtenues de la manière qui sera décrite en II-2-3. On les laisse diffuser 6 h à 30 °C. Les diamètres des zones claires apparues sur la gélose opacifiée par le lait sont mesurés.

## **II-2. Technique quantitative**

Nous avons utilisé la technique quantitative pour mesurer l'activité enzymatique des 4 souches retenues pour la sélection finale et celle de la souche choisie dans les différentes conditions de l'expérimentation. Cette technique utilisée par THANH (1978), est basée sur la mesure de la tyrosine soluble, libérée par hydrolyse de la caséine sous l'action des surnageants des cultures bactériennes. Plusieurs étapes sont nécessaires à la réalisation de cet objectif.

### **II-2-1. Les cultures de production de protéases**

Les cultures sont effectuées sur le milieu de SCHLEGEL modifié, liquide et incubées 24 h à 30 °C dans un bain-marie agité. Les bactéries conservées sur gélose inclinée sont revivifiées, au préalable, par culture dans le même milieu.

Après 30 min de repos à la température ambiante, les produits solubles dans le TCA sont séparés des précipités par filtration sur papier Whatman.

#### II-2-4. Dosage de la tyrosine soluble

La mesure de la tyrosine se fait à 580 nm après action du réactif de Folin-Ciocalteu. Le mélange réactionnel a la composition suivante: à 0,1 ml de filtrat on ajoute 1 ml de réactif c (un mélange de bicarbonate de Na (2%) dans NaOH 0,1 N, de sulfate de cuivre (1%) et de tartrate de sodium (2%). le mélange est laissé 10 min à la température ambiante. On ajoute ensuite, 0,1 ml de réactif de Folin dilué au 1/2. On laisse reposer le mélange à la température ambiante pendant 30', après une agitation légère au vortex. Le mélange est finalement dilué avec 2 ml d'eau distillée. La lecture se fait dans un colorimètre, à 580 nm, contre un blanc dans lequel le filtrat est remplacé par le même volume de la solution tampon.

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

La courbe d'étalonnage de la tyrosine a été établie, au préalable.

### **III Influence des acides aminés sur la production de protéase chez la souche S70.**

La souche S70, choisie sur la base de son pouvoir protéolytique élevé (évalué par les techniques semi-quantitative et quantitative) a fait l'objet de cette partie de l'expérimentation.

Ces expériences sont inspirées des travaux de MILLET et AUBERT (1969), COHEN et DRUCKER (1973) KOLEV (1978), HELLIO et al (1993). Elles sont réalisées sur deux types de milieu de culture: le milieu minimal et le milieu SM. L'utilisation de ces deux milieux a pour but de simuler les conditions d'induction et de répression de la synthèse des protéases

Après 30 min de repos à la température ambiante, les produits solubles dans le TCA sont séparés des précipités par filtration sur papier Whatman.

#### II-2-4. Dosage de la tyrosine soluble

La mesure de la tyrosine se fait à 580 nm après action du réactif de Folin-Ciocalteu. Le mélange réactionnel a la composition suivante: à 0,1 ml de filtrat on ajoute 1 ml de réactif c (un mélange de bicarbonate de Na (2%) dans NaOH 0,1 N, de sulfate de cuivre (1%) et de tartrate de sodium (2%). le mélange est laissé 10 min à la température ambiante. On ajoute ensuite, 0,1 ml de réactif de Folin dilué au 1/2. On laisse reposer le mélange à la température ambiante pendant 30', après une agitation légère au vortex. Le mélange est finalement dilué avec 2 ml d'eau distillée. La lecture se fait dans un colorimètre, à 580 nm, contre un blanc dans lequel le filtrat est remplacé par le même volume de la solution tampon.

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

La courbe d'étalonnage de la tyrosine a été établie, au préalable.

### **III Influence des acides amines sur la production de protéase chez la souche S70.**

La souche S70, choisie sur la base de son pouvoir protéolytique élevé (évalué par les techniques semi-quantitative et quantitative) a fait l'objet de cette partie de l'expérimentation.

Ces expériences sont inspirées des travaux de MILLET et AUBERT (1969), COHEN et DRUCKER (1973) KOLEV (1978), HELLIO et al (1993). Elles sont réalisées sur deux types de milieu de culture: le milieu minimal et le milieu SM. L'utilisation de ces deux milieux a pour but de simuler les conditions d'induction et de répression de la synthèse des protéases

extracellulaires, chez les microorganismes, telles que décrites dans les travaux cités précédemment. Le milieu minimal est issu du milieu de SCHLEGEL modifié (milieu de base).

### **III-1. En milieu minimal (conditions d'induction)**

Pour préparer le milieu minimal, on remplace le lait du milieu SM par la source d'acide aminé. Celle-ci constituée, selon les cas, d'hydrolysate de caséine, de peptone ou d'acides aminés naturels, est la source unique d'azote et de carbone du milieu minimal. Les acides aminés naturels utilisés sont: Ala, Gly, Leu, Arg, GLU. Les cultures sont effectuées à 30 °C dans un bain-marie agité, les cultures témoins (dépourvues d'acides aminés) sont réalisées sur le milieu SM dans les mêmes conditions. Ces conditions de température, d'agitation, d'inoculum et de volume du milieu de culture sont maintenues constantes pour toutes ces expériences. Les prélèvements pour la mesure de la croissance bactérienne (D.O.) et celle de l'activité enzymatique sont effectuées toutes les 4 heures. L'activité enzymatique est mesurée selon la technique décrite en II-2-3 et II-2-4.

### **III-2. En milieu SM (conditions de répression)**

Pour ces essais, le milieu SM ne subit aucune modification. La source d'acide aminé est, cette fois ci, soit incorporée à ce milieu au moment de sa préparation, soit ajoutée aux cultures, sous forme de solutions concentrées après 6 heures de culture (T7) et 12 heures (T13).

En plus de l'hydrolysate de caséine, onze acides aminés sont testés: Ala, Gly, Leu, Phe, Tyr, Trp, Cys, Arg, Val, Asp, Glu. Ces acides aminés sont ajoutés au milieu de culture soit un à un, soit en mélange des onze, soit en combinaisons diverses. En plus du témoin de production, on teste l'effet de deux ou 3 acides aminés, ajouté séparément au milieu de culture, constituant ainsi 3 à 4 échantillons, au cours d'une même expérience.

Les mêmes conditions de culture et de mesure de la croissance et de l'activité enzymatique que celles décrites pour le milieu minimal sont utilisées dans le cas du milieu SM.

#### **IV. Essai de caractérisation des protéases de la souche S70**

Nous avons étudié l'influence de la température du pH et de deux inhibiteurs de protéases sur l'activité des protéases produites par la souche S70, pour tenter de déterminer les caractéristiques générales de ces enzymes.

##### **IV-1. Effet de la température sur l'activité des protéases**

Les réactions enzymatiques sont réalisées dans les conditions habituelles (II.2.3 et II.2.4), seules, les incubations sont effectuées aux températures choisies (30, 40, 50, 60 et 70 °C). Les températures optimales et la température d'inactivation de ces enzymes sont ainsi déterminées.

##### **IV-2. Effet du pH sur l'activité des protéases**

Le mélange réactionnel est tamponné aux différents pH par les solutions tampons suivantes: tampon phosphate pH 6 et 7, 0,05 M tampon tris-HCl pH 8 et 9, 0,1M, tampon glycine-NaOH pH 10, 11 et 12 , 0,1 M.

La dissolution de la caséine dans les différentes solutions tampons est totale après un léger chauffage sauf à pH 6: à ce pH, il y a formation d'un trouble qui disparaît après filtration.

##### **IV-3. Effet des inhibiteurs**

Nous avons testé l'effet de deux inhibiteurs de protéases: le PMSF et l'EDTA selon la technique décrite par MILLET (1969).

On prépare d'abord des solutions mère concentrées de ces deux inhibiteurs:

- La solution de PMSF 0,01 M. Celui-ci instable dans l'eau se dissout difficilement après chauffage. BARTHOMEUF et al (1989) utilisent un solvant organique, l'isopropanol, dans lequel la dissolution est totale.

- La solution d'EDTA de Na 0,1 M (ampoule Titrisol).

Ces inhibiteurs sont testés aux concentrations suivantes:  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  POUR L'EDTA ET  $10^{-4}$ ,  $10^{-4}$  pour le PMSF. On les incube avec les surnageants de culture 5 minutes avant la réaction enzymatique.

## I. Isolement

La technique d'isolement et les milieux de culture utilisés ont permis l'isolement de 178 souches de bacillus, dont 70 à partir du sol, 58 du lait et 50 de la viande. Les souches du sol sont codifiées S et numérotées de 1 à 70, celles du lait (L) et de la viande (V), de 1 à 108.

Ces résultats sont tout à fait conformes aux données de la littérature (PRIEST et CRIGOROVA, 1990) où le sol est le substrat le plus largement exploité pour l'isolement des Bacillus et des bactéries sporulantes en général. Il constitue l'habitat principal de ces bactéries où elles séjournent pendant de longues périodes à l'état de spores et d'où elles peuvent contaminer toutes sortes d'environnements. Leur présence dans des substrats tels que le lait ou la viande n'est, en fait, qu'occasionnelle et est tributaire des hasards de contamination.

L'appartenance au genre Bacillus a été établie, après sélection thermique, sur la base des caractères suivants:

- La morphologie cellulaire en forme de bâtonnets caractéristiques du genre Bacillus (bacilles grands, rectangulaires à bouts droits, parfois arrondis).

- La présence d'une spore à l'intérieur de la cellule après culture en aérobiose. C'est, d'ailleurs, le caractère déterminant pour déclarer l'appartenance au genre Bacillus. La forme de la spore, sa position dans la cellule et le type de morphologie qu'adopte le sporange sont autant de critères d'identification. La majorité des souches que nous avons isolées, possèdent des spores orales, centrales ou subterminales à paroi mince non déformantes. Elles peuvent, de ce fait, être rapportée au groupe I de la classification de GORDON (1973) cité dans le Bergey's manual et dont l'espèce type est *B. subtilis*. Les autres souches peuvent être classées dans le groupe II de cette même classification. Leurs spores ovales à paroi épaisse déforment le sporange.

- La mise en évidence de la catalase

D'après le Bergey's manual (1986), ces caractères sont suffisant pour confirmer l'appartenance au genre Bacillus. SUNG et al (1988) ont, sur la base, de ces mêmes caractères, identifié au genre Bacillus des isolats bactériens qui ont été à l'origine de la découverte de deux espèces nouvelles au genre.

Cependant, il est utile de remarquer que, malgré le traitement thermique appliqué, il était fréquent de rencontrer des formes végétatives variées: (cocccies, cellules de levures...) qui étaient écartées, d'emblée lors de l'isolement. La thermorésistance, bien que pratique, n'assure pas une sélection absolue.

## **II. Evaluation semi-quantitative du pouvoir protéolytique des souches isolées**

Le comportement de chacune des 178 souches testées par la technique de diffusion sur plaque utilisant les stries, technique 1, est présenté au tableau 3.

Au point de vue qualitatif, ce test fournit trois types de réponse: absence de croissance, croissance sans zone d'hydrolyse (souche négative -) et croissance avec zone d'hydrolyse (souche positive +). Des résultats semblables ont été obtenus par VUILLEMARD et al (1985) qui ont réparti les souches testées dans ce même type de catégorie.

En termes de proportions, le même tableau montre que plus du 1/3 des souches ont pu croître sur le milieu de SCHLEGEL modifié en donnant des zones de protéolyse. Les 2/3 qui restent se répartissent comme suit: 1/3 n'a pas pu croître sur ce milieu, l'autre tiers a donné des cultures dépourvues de zones d'hydrolyse.

Ce type de comportement est observé sur l'ensemble des souches isolées qu'elles que soient leurs origines.

## **II-1. Les souches protéolytiques**

Le sol est le substrat le plus riche en bactéries protéolytiques, avec le rapport souche (+)/souche (-) le plus élevé (3,6), suivi par le lait (1,4). La viande vient en dernier avec un rapport relativement faible: 0,3. (Tableau 3). Ces résultats concordent avec la bibliographie (PRIEST et GRIGOROVA, 1990) où le sol est également décrit comme l'habitat majeur des bactéries sécrétant des enzymes de dégradation extracellulaires notamment les protéases.

## **II-2. Importance du pouvoir protéolytique des souches protéolytiques**

Les tableaux qui portent les valeurs du pouvoir protéolytique sont donnés en annexe. le tableau 4 indique la répartition des souches protéolytiques selon l'importance de leur pouvoir protéolytique.

La plupart des souches ont une activité relativement faible ( $1 \leq a/b \leq 5$ ) ou moyenne ( $5 \leq a/b \leq 10$ ). Des activités plus élevées ( $10 \leq a/b \leq 20$ ) sont obtenues avec les souches du sol et celle du lait. C'est d'ailleurs parmi les souches isolées de ces substrats que se recrutent les souches les plus fortement protéolytiques ( $a/b > 20$ ). Néanmoins, une proportion non négligeable (3%) des souches de la viande montrent une activité protéolytique importante ( $15 \leq a/b \leq 20$ ).

Cependant, il est difficile de rapporter cette variabilité dans les résultats aux origines des différentes souches. En effet, les capacités enzymatiques reflètent avant tout des potentialités génétiques particulières, propres à chaque souche indépendamment de son origine. Ceci, en association avec l'aptitude des Bacillus à la sporulation, n'autorise pas des considérations d'ordre écologique. La spécificité de substrat reste, à notre avis, le seul argument en faveur de l'adaptation à tel ou tel milieu.

**Tableau n°4:** Répartition des souches en fonction de l'importance de leur pouvoir protéolytique.

a / b	Sol		Lait		Viande		Total des souches	
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
$1 \leq a/b \leq 5$	7	11	9	14	5	7,5	21	32
$5 < a/b \leq 10$	14	21	5	7,5	1	1,5	20	30
$10 < a/b \leq 15$	10	15	5	7,5	1	1,5	16	24
$15 < a/b \leq 20$	4	6	1	1,5	2	3	7	11
$a/b > 20$	1	1,5	1	1,5	0	0	2	3
Total des souches	36	54,5	21	32	9	13,5	66	100

### **II-3. Les souches non protéolytiques**

Concernant les souches qui n'ont pas donné de zones d'hydrolyse, le tableau N° 3 montre que le pourcentage le plus élevé (62%) est obtenu avec les souches provenant de la viande. Le sol et le lait présentent sensiblement les mêmes proportions: 24% et 26% respectivement.

L'absence de zones de protéolyse n'implique pas forcément une absence totale de pouvoir protéolytique chez ces souches. En effet, comme le souligne, WIKSTROM (1983), dans un même milieu de culture, les conditions optimales de croissance, de production d'enzyme et d'activité enzymatique ne sont pas toujours réunies. C'est probablement le cas du milieu SM qui aurait été, à priori, favorable à une bonne croissance de ces souches mais non à une production optimale de protéases. Inversement ce même milieu, de composition relativement pauvre pourrait être à l'origine d'une croissance insuffisante de certaines souches. Dans de telles conditions, VUILLEMARD et al, considèrent que l'activité protéolytique des souches est largement affectée par le stress nutritionnel. Des milieux plus riches, tels que ceux décrits par MARTLEY et al (1970) et SOKOL et al (1979) et où la source d'azote est constituée, en plus du lait, de protéines animales riches, seraient, sans doute, plus propice à une meilleure production d'enzymes chez ces souches.

Par ailleurs, les techniques à base de lait sont jugées inaptes à détecter les faibles quantités d'enzymes. Les zones claires qui apparaissent sur de tels milieux et qui traduisent des stades avancés de la dégradation de la caséine nécessitent des quantités importantes d'enzymes protéolytiques (CHEESEMAN, 1963; ARVIDSON, 1973; MONTVILLE, 1983).

### **II-4. Les souches non développées**

Comme pour les souches présentant une croissance sans zone d'hydrolyse, il est difficile de conclure au sujet des souches n'ayant pas poussé sur le milieu SM. Deux raisons pourraient, toutefois, être évoquées.

L'absence de culture pourrait être le cas de souches totalement dépourvues d'enzymes protéolytiques extracellulaires et donc incapable de croître sur un milieu dont la source d'azote est constituée de protéines. On serait ainsi en présence des rares espèces de *Bacillus* qui ne produisent pas de protéases extracellulaires comme l'espèce *B. coagulans* (AUNSTRUP, 1979), ou alors de mutants déficients en protéases défavorisées par un milieu à base de protéine.

La deuxième raison est probablement une composition de milieu de culture relativement pauvre en éléments nutritifs pour quelques bactéries exigeantes. C'est le cas de souches pouvant appartenir aux espèces *B. thurigiensis* et *B. sphaericus* plus exigeantes sur le plan nutritionnel que les autres espèces de *Bacillus* (KUPPUSAMY et BALARAMAN, 1990).

### **III-5. Classement des souches protéolytiques selon les différentes techniques de diffusion sur plaque**

Après de nombreuses répétitions, la technique 1, a permis d'établir une première sélection de 25 souches aptes à hydrolyser la caséine du lait et dont certaines semblent posséder une activité protéolytique élevée. Seules les souches présentant un rapport a/b710 ont été retenues: 14 du sol, 8 du lait et 3 de la viande. Les pouvoirs protéolytiques des 8 premières souches ainsi sélectionnées ont été évalués par les deux autres techniques de diffusion sur plaque, les techniques 2 et 3. Le tableau N° 5 montre le classement de ces souches en fonction de leurs pouvoirs protéolytiques par les trois techniques. La souche du sol, S70 vient en première position, suivie d'une souche du lait la L48 qu'elle que soit la technique utilisée. Les autres souches sont classées suivant le même ordre par les techniques 1 et 3 tandis qu'avec la technique 2 cet ordre est quelque fois modifié mais sans de grandes variations.

**Tableau n°5:** Classement des souches fortement protéolytiques par les trois techniques de diffusion sur plaque.

	Technique 1		Technique 2		Technique 3	
	a/b	Classement	a/b	Classement	a/b	Classement
<b>S70</b>	24,5	1°	22,5	1°	28,5	1°
<b>L48</b>	22,5	2°	20	2°	26	2°
<b>S33</b>	20,5	3°	20	2°	25,5	3°
<b>L47</b>	20,5	3°	19	4°	22	4°
<b>V102</b>	19	5°	18,5	5°	20,33	5°
<b>S38</b>	18,75	6°	15	7°	20	6°
<b>L54</b>	18,25	7°	16,5	6°	20	7°
<b>S12</b>	16,66	8°	14,75	8°	18,5	8°

Ces résultats tendraient à prouver que les trois techniques sont comparables au plan de l'efficacité et de la sensibilité et que la technique d'évaluation que nous avons adoptée convient mieux pour le screening . Elle offre l'avantage d'être rapide et de mise en oeuvre plus facile.

Quatre souches hautement productrices de protéases sont ainsi sélectionnées: les souches S70, S33, L48 et L47. Ces souches présentent les rapports a/b les plus élevés et les zones d'hydrolyse les plus claires.

### **III. Sélection finale et caractères de la souche choisie: la souche S70**

Le pouvoir protéolytique des 4 souches sélectionnées par la technique semi-quantitative (S70, L48, S33 et L47) a été finalement évalué par la technique quantitative. Les niveaux de production d'enzyme sont exprimés en unités d'activité par ml (UA/ml). Celle-ci consiste en la quantité d'enzyme que libère une micromole de tyrosine en 20 minutes à 30 °C.

Les figures 1 et 2 montrent l'évolution de la production d'enzyme et de la croissance, au cours du temps, chez ces 4 souches.

Les courbes de croissance des souches S70, L48, et L47 ont sensiblement la même allure; la souche S70 montre les densités optiques les plus importantes. la souche S33 se distingue par une phase de croissance exponentielle relativement longue.

Quant à la production de protéase, on constate que seules les souches S70 et S33 montrent des niveaux d'activités importants. Les souches L48 et L47 présentent des taux d'activité très faibles, à peine détectables. Cette absence d'activité enzymatique chez des souches qui ont été capables de produire des quantités notables de protéases sur milieu solide, ne peut s'expliquer que par une perte d'activité ou de stabilité. Cela pourrait être le cas de l'une de ces

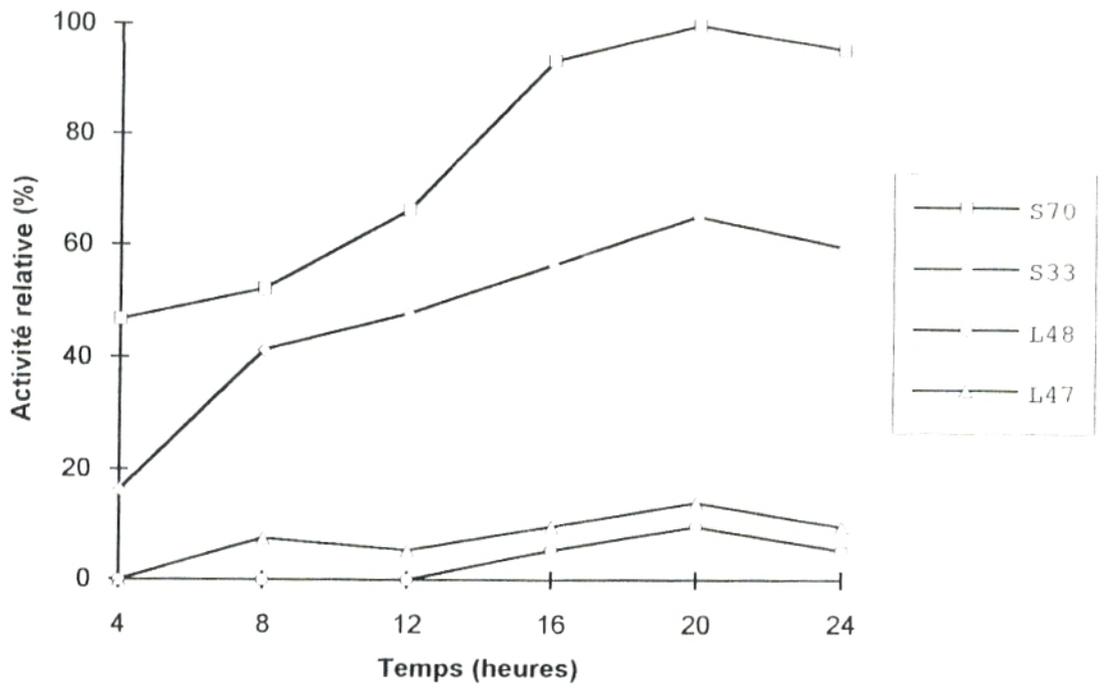


Figure 1: Production de protéase sur milieu SM par les souches S70, S33, L48 et L47

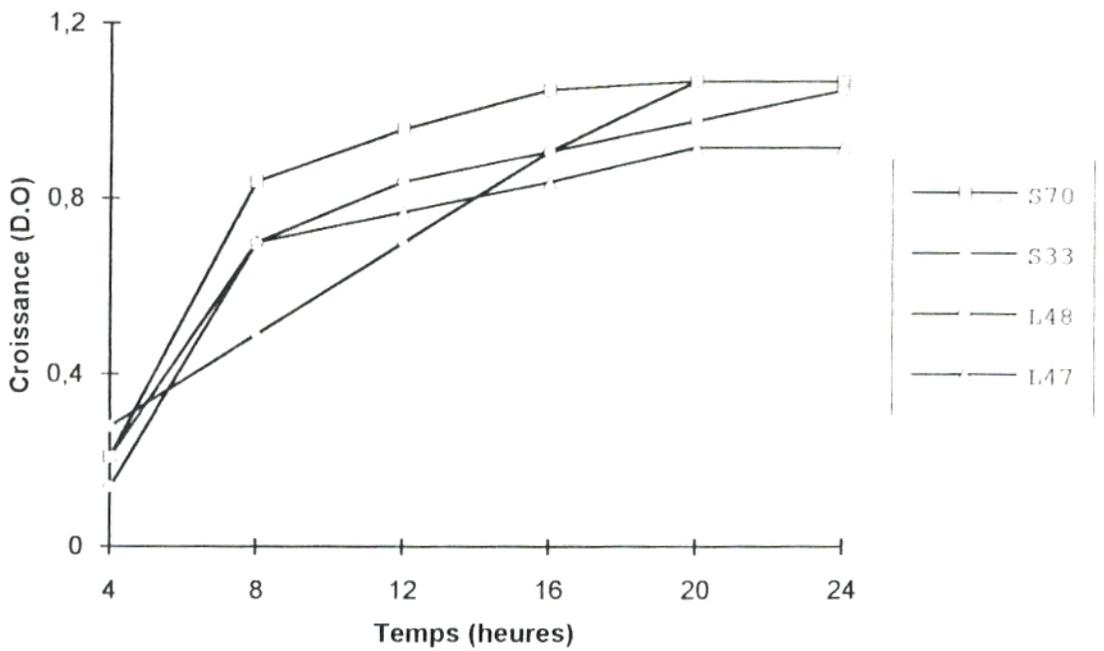


Figure 2: Croissance des souches S70, S33, L48 et L47 sur milieu SM.

métalloprotéases neutres que la bibliographie décrit comme les moins stables de toutes les protéases microbiennes (FOGARTY et al, 1974).

Pour les souches S70 et S33, la production de protéases est parallèle à la croissance, les quantités maximales d'enzymes sont atteintes pendant la phase stationnaire. C'est plus ou moins, le schéma classique de production de protéase chez *Bacillus* (ARBIGE et al, 1993). L'évolution de la production d'enzyme suit la même allure chez les deux souches, toutefois, la souche S70 est de loin la plus active.

Ainsi, et après élimination des deux souches du lait, la souche S70 se retrouvant seule avec la souche S33, c'est elle qui a été retenue pour la suite des travaux.

La souche S70 est un bâtonnet long mince à bouts légèrement arrondis, Gram<sup>+</sup> catalase<sup>+</sup> et mobile. Ses colonies sont lisses et crémeuses sur gélose nutritive et sèche et rugueuse sur milieu SM. Une caractérisation biochimique de la souche effectuée à l'institut Pasteur d'Algérie est en faveur d'une orientation vers l'espèce *B. subtilis*

#### **IV. Influence des acides aminés sur la production de protéases chez la souche S70**

##### **IV-1. Cas de l'induction**

L'aptitude de la souche S70 à produire des enzymes protéolytiques a été déterminée sur le milieu minimal, additionné des différents acides aminés comme source unique d'azote et de carbone, et sur le milieu SM utilisé comme témoin.

##### **IV-1-1. Mélanges d'acides aminés et de peptides**

La culture de la souche en présence d'hydrolysate de caséine est responsable de la diminution de l'activité enzymatique de 32% en moyenne (figure 3). La croissance observée dans ces conditions (figure 4) étant identique à

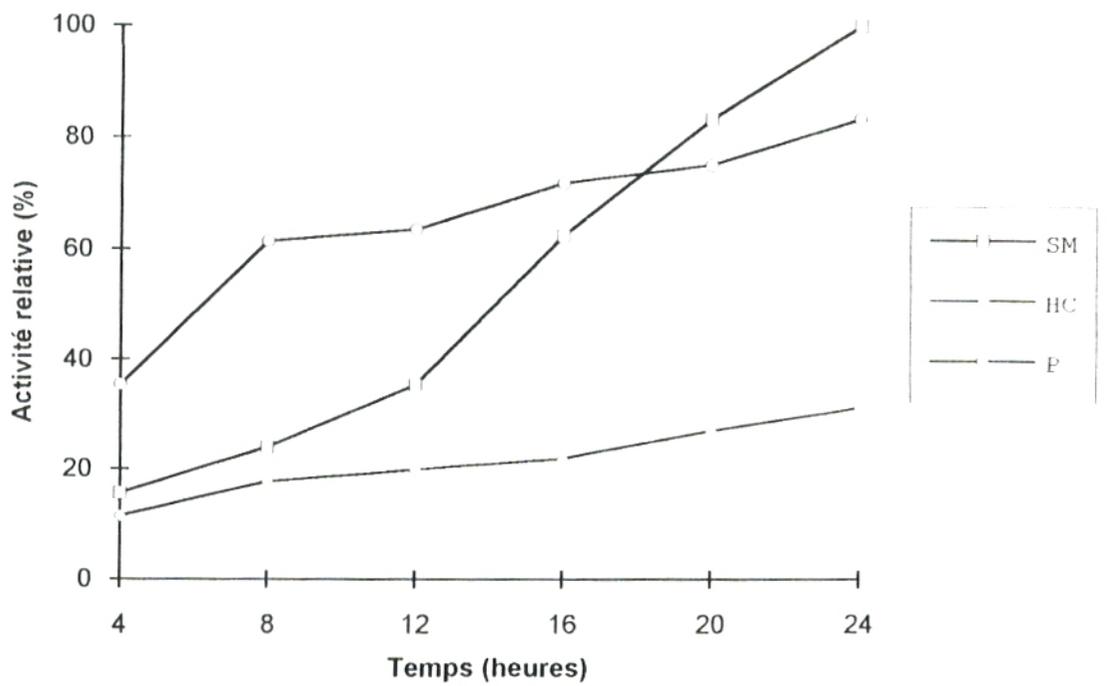


Figure 3: Production de protéase sur milieu minimal à base d'hydrolysate de caséine et de peptone, par la souche S70.

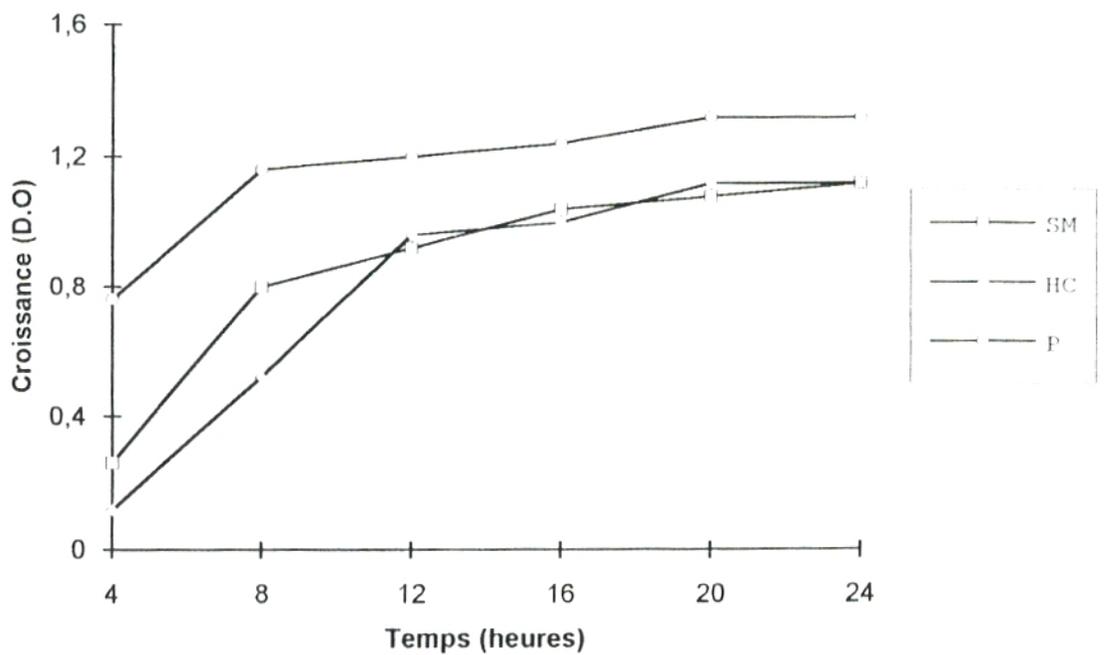


Figure 4: Croissance de la souche S70 dans le milieu minimal à base d'hydrolysate de caséine et de peptone.

celle du témoin, on est en présence d'une répression classique de la production de protéases par les acides aminés et les peptides.

Par contre ces mêmes figures montrent que l'addition de peptone au milieu provoque une augmentation de la production d'enzymes au cours de la phase exponentielle de croissance et début de la phase stationnaire, à un taux moyen de 24%. La croissance également stimulée pourrait expliquer cet accroissement dans la production de protéase, toutefois, l'effet inducteur des mélanges de peptides a déjà été rapporté (DESMAZEAUD et HERMIER, 1968).

#### IV-1-2. Les acides aminés un à un

##### a- L'alanine

En présence d'alanine (figure 5 et 6) la production d'enzyme est rapide et notable au cours des 8 premières heures de la croissance et qui correspondent, en fait, à une phase de latence. L'augmentation de cette production se fait à un taux moyen de 47%. Les taux maximaux sont atteints à la huitième heure de culture. Après quoi, on assiste à une chute rapide et continue de l'activité enzymatique.

L'accroissement de la production de protéase à un moment où la population bactérienne n'a pas encore augmenté indique qu'on est en présence d'une induction complète de la synthèse de ces enzymes. La chute enregistrée après ce délai et qui coïncide avec une augmentation importante de la croissance bactérienne, pourrait être expliquée par une utilisation potentielle de la protéine enzymatique au profit de la croissance, pour pallier au déficit nutritionnel qui sévit dans un tel milieu. L'utilisation des protéases extracellulaire à des fins nutritionnelles a déjà été rapportée par TSUGHIIYA et KIMURA (1984).

KOLEV (1978) ayant testé l'effet des 20 acides aminés en milieu minimal, trouve lui aussi que l'alanine est favorable à une bonne production de protéase chez une souche de *B. méésentéricus*.

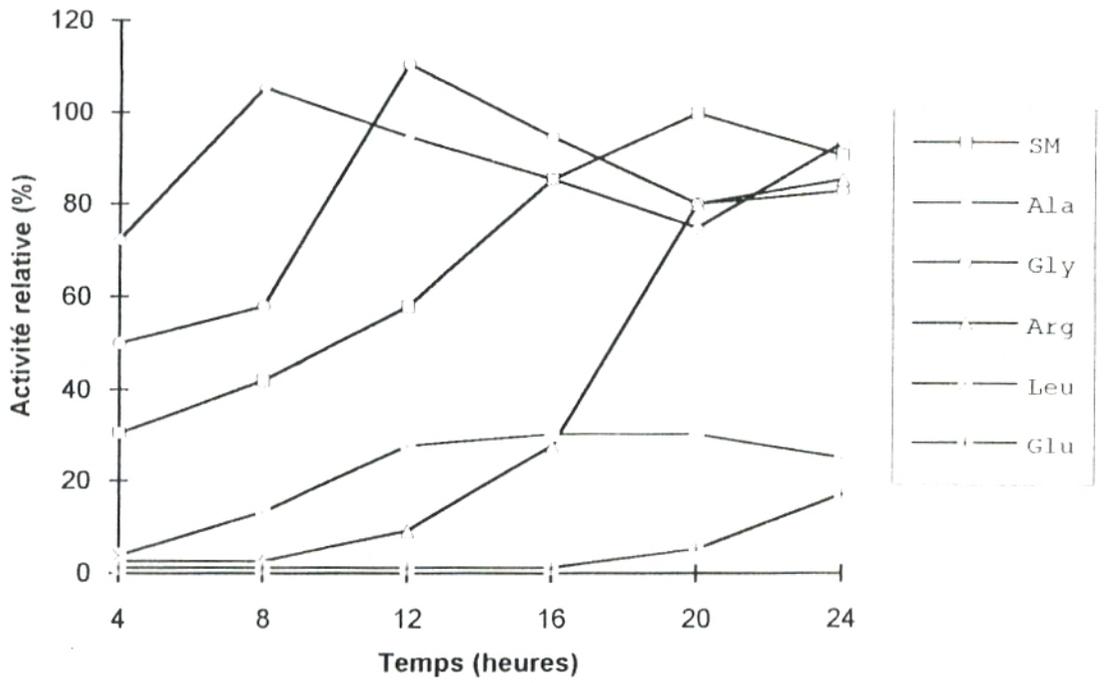


Figure 5: Production de protéase dans le milieu minimal à base des acides aminés, par la souche S70.

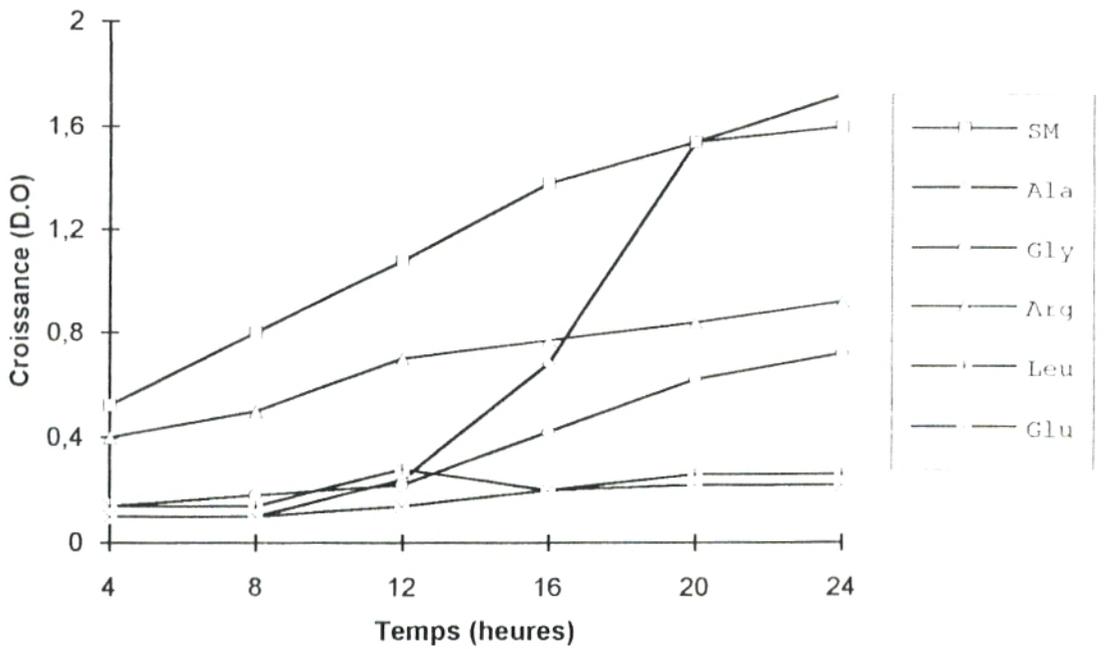


Figure 6: Croissance de la souche S70 dans le milieu minimal à base d'acides aminés.

### b- Glycine

En présence de la glycine, la situation semble analogue à celle rencontrée avec l'alanine. la production d'enzymes est importante dès les premières heures de culture et augmente à un taux moyen de 29%. Comme pour l'alanine, l'essentiel de la production, réalisé pendant la phase de latence semble suggérer que l'on est en présence d'une induction de la production de protéases. La glycine ne servant pas à la croissance mais plutôt à induire une synthèse protéique par le biais de laquelle, elle fournit à la cellule les nutriments nécessaires à sa croissance. On ajoutera seulement ici que, contrairement à l'alanine, le matériel induit par la glycine n'est pas favorable à une croissance optimale, l'acide aminé, lui même, ne permettant pas la croissance de la souche de *B. mesentericus* selon KOLEV (1978). Alternativement, la diminution de la production de protéases pourra être mise sur le compte d'une répression éventuelle exercée par les produits de dégradation de la protéine enzymatique.

### c- Arginine

La production d'enzyme dans le cas de l'arginine est réprimée à 59% pendant les 12 premières heures de culture. Cette répression sévère est suivie d'une augmentation continue de la production d'enzyme, la répression étant levée à 89%.

D'après ces résultats, il semblerait que l'arginine exerce une forte répression quand elle se trouve dans le milieu de culture à une forte concentration (1%). Cette répression est levée probablement après épuisement de cet acide aminé du milieu ou quand sa concentration devient faible. En effet une même substance peut avoir un effet répresseur aux fortes doses et être sans effet ou exercer un effet inducteur, quand sa concentration est faible. C'est le cas des mélanges d'acides aminés (PRIEST, 1977) et des peptides (DESMAZEAUD et HERMIER, 1968; CHANDRASEKARAN ET DHAR, 1983; TSUGHIYA et KIMURA, 1984). Néanmoins, seul, cet acide aminé n'est pas efficace pour une bonne croissance, l'addition d'un sucre au milieu de culture semble nécessaire.

#### d- Leucine et acide glutamique

Quant aux deux derniers acides aminés testés, Leu et Glu, la croissance et la production de protéase conservent, en leur présence, des niveaux très faibles pendant toute la durée de la croissance. Apparemment ces deux acides aminés ne sont efficaces ni en tant qu'inducteur de la production de protéases, ni en tant que sources convenables d'azote et de carbone pour la croissance de la souche. Dans une telle situation, une production faible serait la conséquence directe d'une croissance peu abondante. Si l'acide glutamique figure parmi les acides aminés permettant une faible croissance (KOLEV, 1978), un effet inducteur important est attribué à la leucine dans le cas d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* (HELLIO et al, 1993).

D'après les résultats obtenus à l'issue de tous ces essais, nous pouvons constater, qu'en présence d'un déficit en carbone et azote, un acide aminé, ou un mélange d'acides aminés et de peptides s'avèrent aussi efficaces à induire la production de protéase chez cette souche de *Bacillus* que la protéine inductrice (serum albumine bovine) rapportée dans le cas de la moisissure *Neurospora crassa* (DRUCKER, 1972; 1973; COHEN et DRUCKER, 1973).

Certains de ces acides aminés (Ala et Gly) se sont même révélés des sources de carbone suffisamment efficaces pour soutenir une croissance convenable sans qu'il soit nécessaire de supplémenter le milieu de culture par un sucre. Alors qu'en présence de la protéine inductrice sus-citée, il était indispensable d'ajouter 0,1% de saccharose au milieu de culture pour assurer la croissance du microorganisme.

Aussi, il est intéressant de remarquer que, l'aptitude de la souche S70 à cultiver sur de tels milieux associée à sa capacité de produire des protéases révèlent chez cette souche des potentialités enzymatiques et par suite génétiques, intéressantes.

## **IV-2. Cas de la répression**

Cette série d'expérience est réalisée sur le milieu SM entier. La production de protéase sur ce milieu est précoce et suffisante pour permettre de déceler toute répression éventuelle exercée par les acides aminés. Ceux-ci sont ajoutés au milieu de culture soit individuellement, soit en mélange.

### **IV-2-1. Mélange d'acides aminés**

#### ***IV-2-1-1. Hydrolysate de caséine***

La croissance et la production de protéase ont été mesurées sur le milieu SM à 0,5 et 1% de lait écrémé et sur le même milieu supplémenté de 1% d'hydrolysate de caséine. Les résultats correspondants sont donnés par les figures 7 et 8. Les courbes de croissance et de production d'enzymes sur le milieu SM aux différentes concentrations en lait ont sensiblement la même allure. Les taux sont, toutefois, légèrement plus élevés dans le milieu à 1% de lait. Pour LENOIR et al (1973), l'augmentation en source d'azote protidique se traduit par une stimulation de la croissance sans aucun effet sur la production de protéases.

L'hydrolysate de caséine provoque la même diminution de l'activité enzymatique (34%) que celle observée en milieu minimal (32%). Cependant, la croissance bactérienne connaît un accroissement significatif. Cet effet positif sur la croissance, de l'hydrolysate de caséine, semble traduire l'utilisation préférentielle des acides aminés fournis par ce composé.

#### ***IV-2-1-2. Ajout de l'hydrolysate de caséine à T7 et T13***

L'hydrolysate de caséine ajouté à ces différents temps de la croissance agit favorablement sur la croissance mais réprime, de façon inégale la production d'enzyme (figures 9 et 10). La répression est plus efficace à T7, où on note une chute importante et rapide de l'activité enzymatique (45%), qu'à T13. Il semblerait qu'à ce dernier moment de la croissance, la production d'enzyme est suffisamment avancée pour contrebalancer toute diminution de l'activité enzymatique.

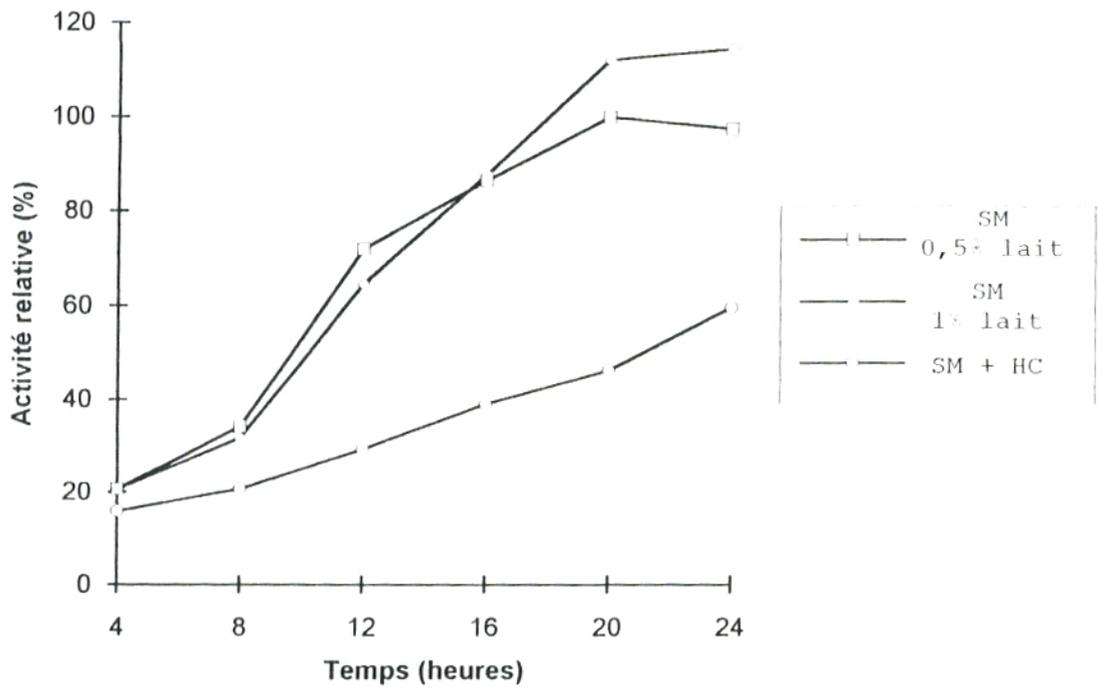


Figure 7: Production de protéase dans le milieu SM à deux concentrations en lait et dans le même milieu additionné d'hydrolysate de caséine par la souche S70

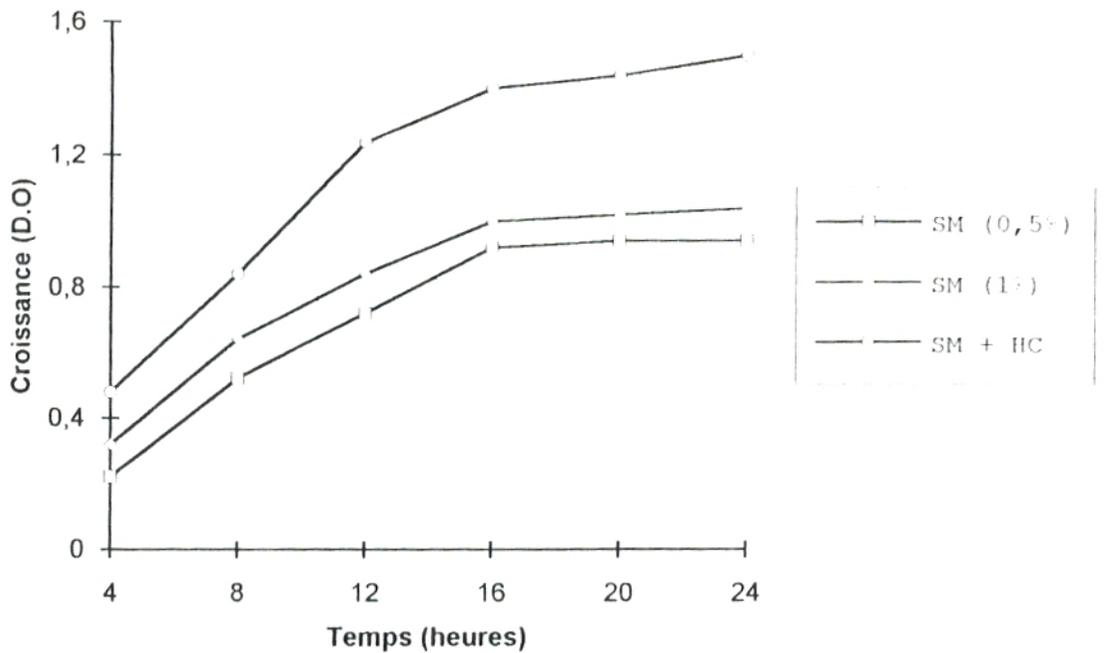


Figure 8: Croissance de la souche S70 dans le milieu SM à deux concentrations en lait et dans le même milieu additionné d'hydrolysate de caséine.

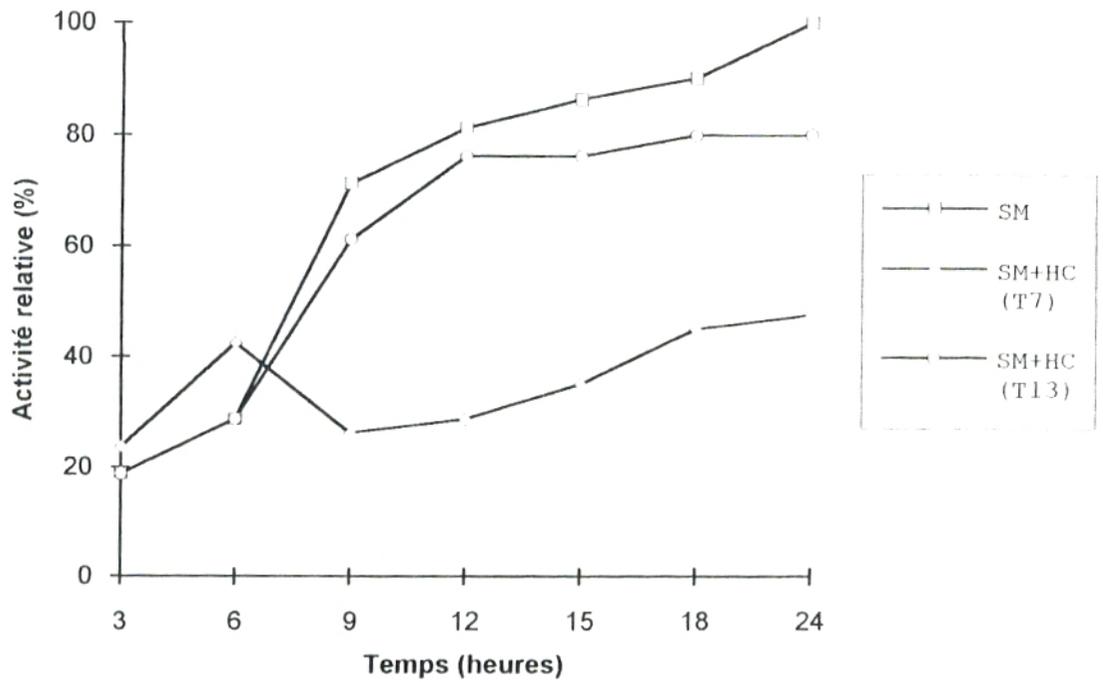


Figure 9: Production de protéase dans le milieu SM auquel l'hydrolysate de caséine est ajouté à T7 et T13, par la souche S70.

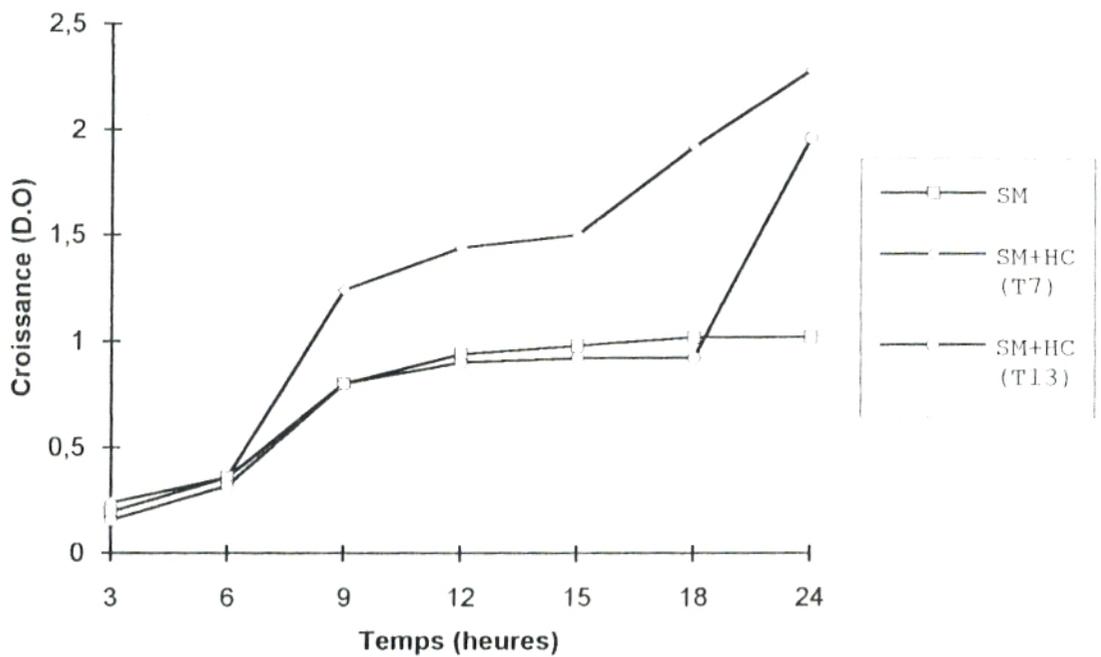


Figure 10: Croissance de la souche S70 dans le milieu SM auquel l'hydrolysate de caséine est ajouté à T7 et T13.

La croissance bactérienne est stimulée dans les deux cas mais selon des schémas différents. A T7, un allongement de la phase exponentielle de quelques heures encore, est enregistré, tandis qu'à T13, le modèle de croissance fait penser à un éventuel phénomène de diauxie: en présence d'une nouvelle source de carbone, les cellules en phase stationnaire entament un nouveau cycle de croissance.

#### ***IV-2-1-3. Mélanges d'acides aminés naturels***

Ce mélange est composé des onze acides aminés suivants: Ala, Gly, Val, Leu, Cys, Tyr, Trp, Phe, Arg, Glu, Asp. Il est ajouté au milieu complexe aux concentrations de 0,55% et 1,1%.

Les courbes de production de protéases telles que montrées par la figure 11 indiquent une diminution nette de l'activité enzymatique en présence des mélanges d'acides aminés. Cette diminution est plus forte (38%) à 1,1% qu'à 0,55% (18%). L'effet répresseur des acides aminés quand ils sont en mélange est surtout effectif aux concentrations élevées. Ce résultat est rapporté par LEVISOHN et ARONSON (1967) pour un mélange de 9 acides aminés dont six de ceux que nous avons testés et par MILLET et AUBERT (1969) pour le mélange des 20 acides aminés.

De même, la stimulation de la croissance bactérienne par le mélange d'acides aminés est surtout évidente à la concentration de 1,1% (figure 12) où il est possible de noter l'allongement de la phase de décelération déjà décrit pour l'hydrolysat de caséine.

#### **IV-2-2 Les acides aminés individuels**

Les onze acides aminés sont ajoutés chacun au milieu SM à la concentration de 0,5%.

##### ***IV-2-2-1. Ala, Gly***

Les figures 13 et 14 montrent les croissances et productions d'enzyme sur le milieu SM additionné d'alanine et de glycine, respectivement. En présence de chacun de ces deux acides aminés, la production de protéases est importante et

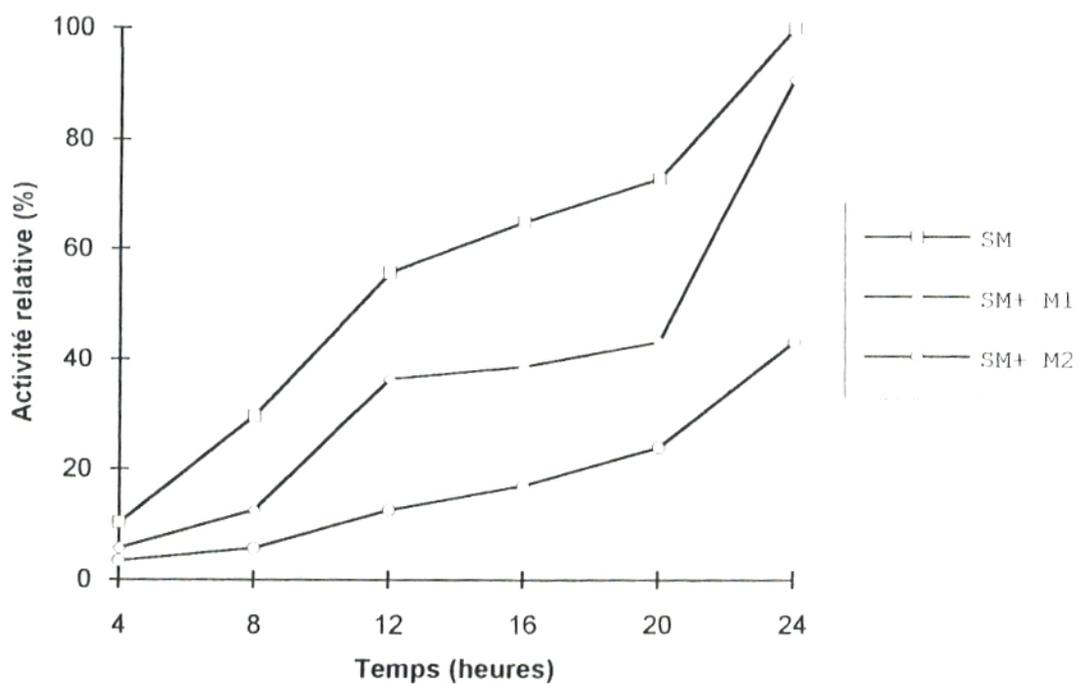


Figure 11: Production de protéase dans le milieu SM additionné du mélange de onze acides aminés M1 (0,5%) et M2 (1%), par la souche S70.

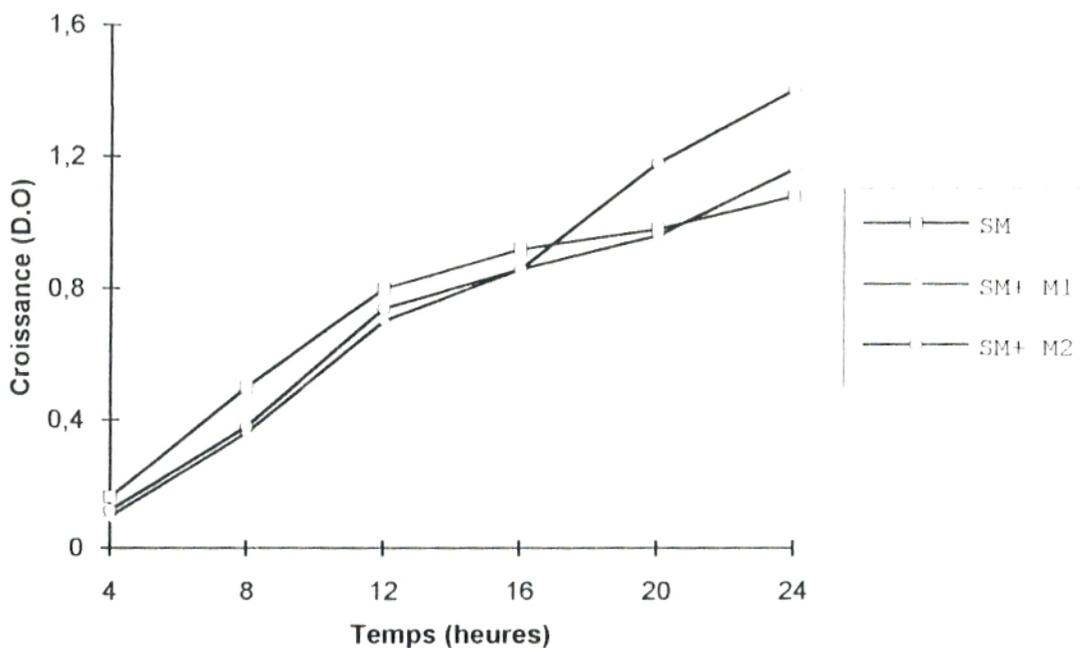


Figure 12: Croissance de la souche S70 sur le milieu SM additionné du mélange de onze acides aminés.

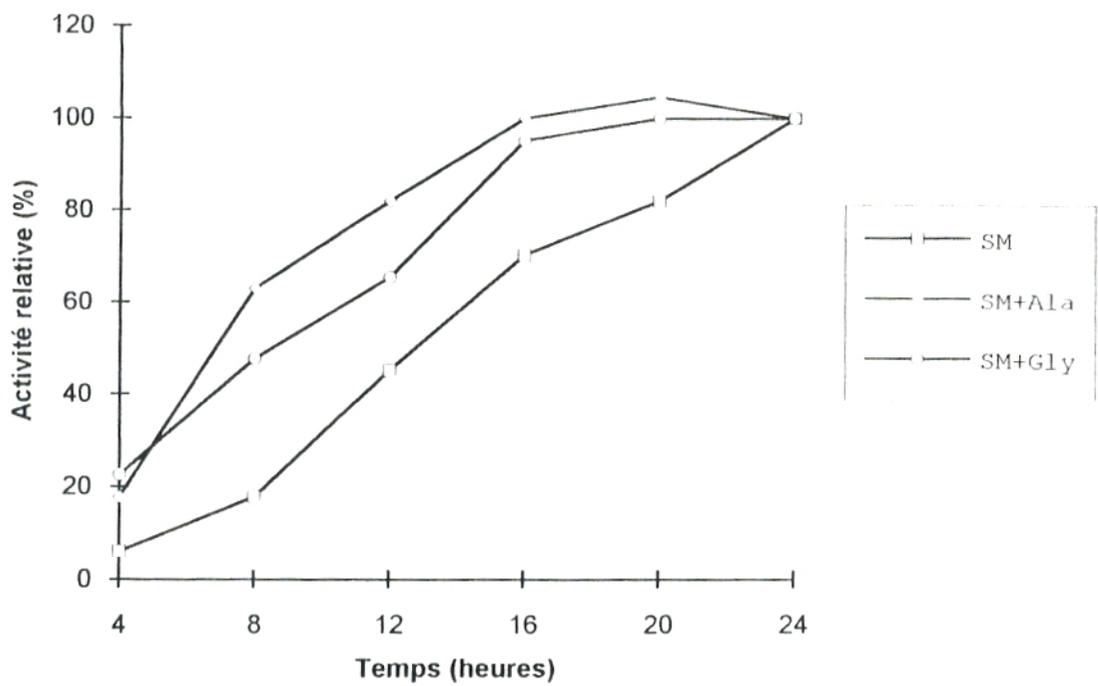


Figure 13: Production de protéase dans le milieu SM additionné des acides aminés, Ala et Gly, par la souche S70.

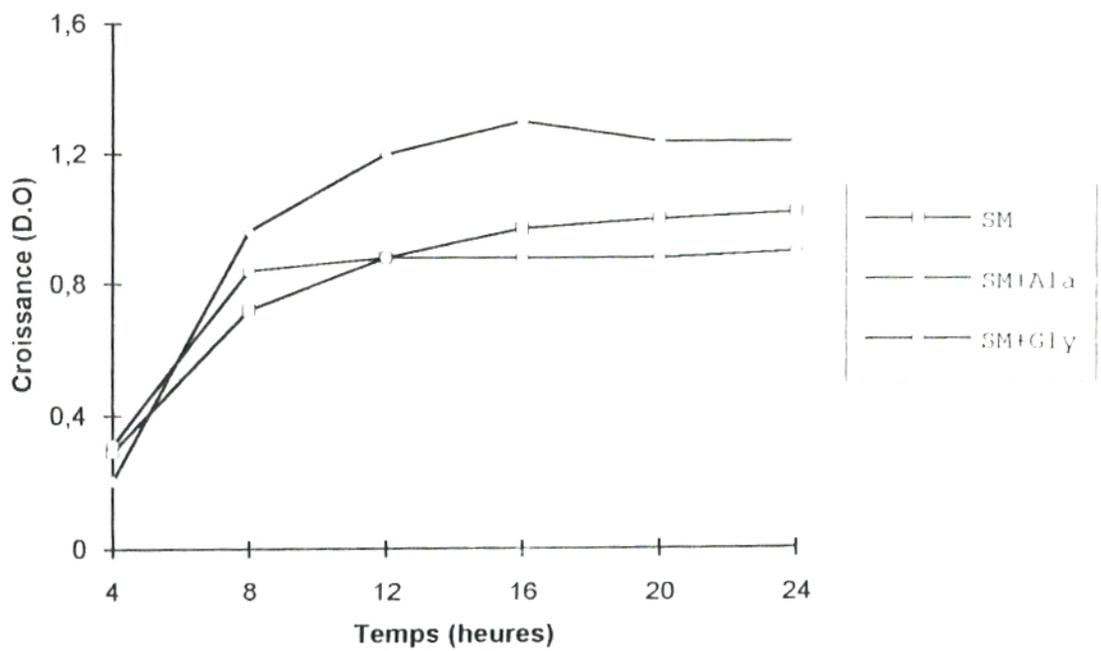


Figure14: Croissance de la souche S70 dans le milieu SM additionné des acides aminés, Ala et Gly.

précoce. Les taux moyens d'accroissement de l'activité enzymatique sont de 30% pour l'alanine et 22% pour la glycine. Ce résultat était attendu puisque les analyses en milieu minimal avaient révélé le pouvoir potentiellement inducteur de ces deux acides aminés. La croissance est également stimulée en présence d'alanine tandis que la glycine semble sans effet significatif. Dans leur étude complète, où les 20 acides aminés sont testés, MILLET et AUBERT (1969) n'attribuent aucun effet significatif (positif ou négatif) sur la production de protéases chez *B. mégatérium*, ni à l'alanine ni à la glycine. Par contre, les nombreux travaux de TSURU, révèlent un effet inhibiteur important de la glycine sur la production de protéase et d'amylase chez une souche de *B. subtilis*.

#### **IV-2-2-2. Val, Tyr**

Les courbes de croissance et de production de protéase en présence de Val et Tyr, respectivement, sont données par les figures 15 et 16.

Ces deux acides aminés provoquent une diminution de la production de protéases d'une importance inégale: 34% pour la tyrosine et seulement 11% pour la valine, ce même acide aminé réprime à 19% selon MILLET et AUBERT (1969). Cependant en présence de tyrosine, un accroissement du taux de production de 31%, en moyenne, est observé en fin de culture. Il semblerait que la répression exercée par cet acide aminé commence à être levée à l'issue de son épuisement du milieu. La croissance n'est toutefois pas stimulée.

Quant à la valine, la croissance notée en sa présence est supérieure à celle observée dans le cas du témoin. Ce qui indique clairement, comme il est bien établi, que des conditions optimales pour la croissance ne le sont pas nécessairement pour la production d'enzymes.

Par ailleurs, les résultats obtenus jusqu'à présent suggèrent que le milieu de SCHLEGEL modifié ne réunit pas les conditions d'une croissance optimale ni celles d'une

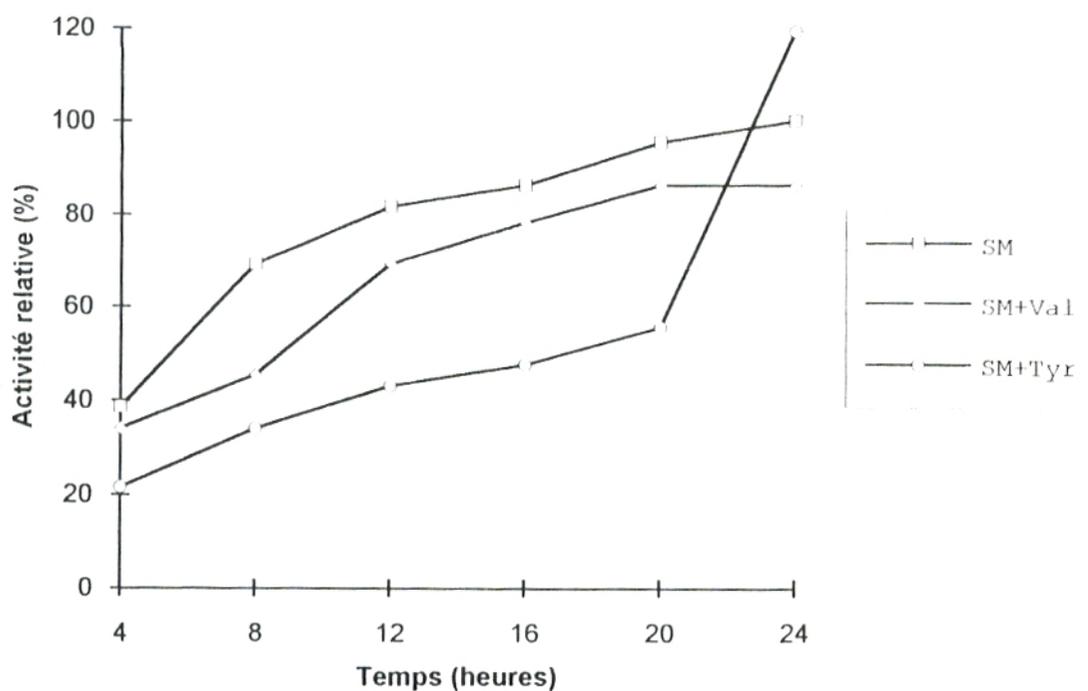


Figure 15: Production de protéase dans le milieu SM additionné des acides aminés, Val et Tyr, par la souche S70.

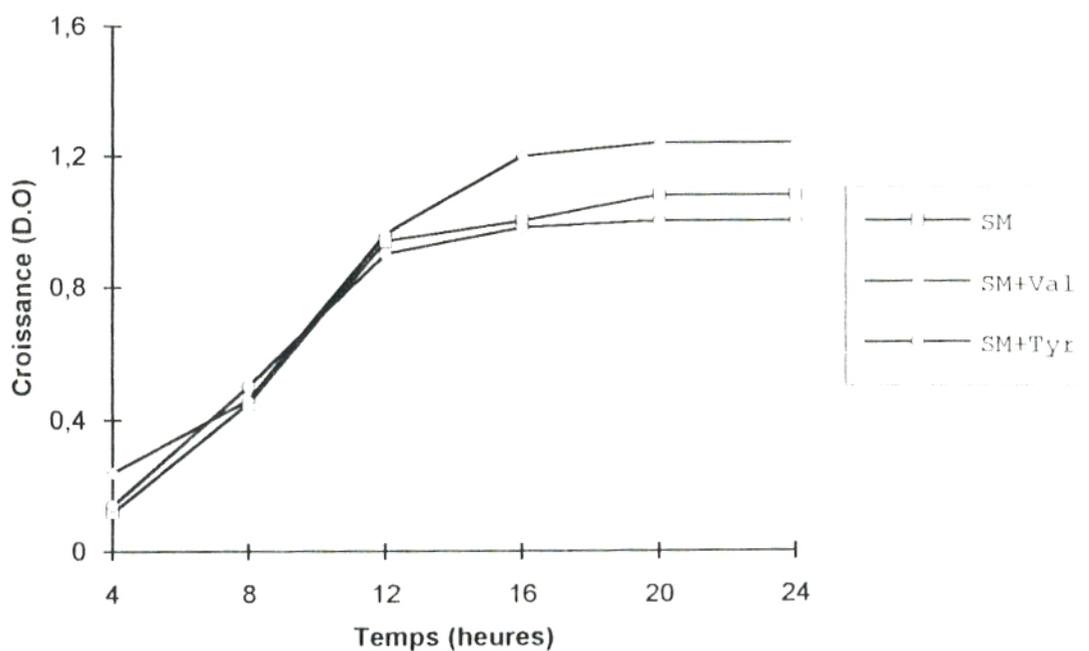


Figure 16: Croissance de la souche S70 dans le milieu SM additionné des acides aminés, Val et Tyr.

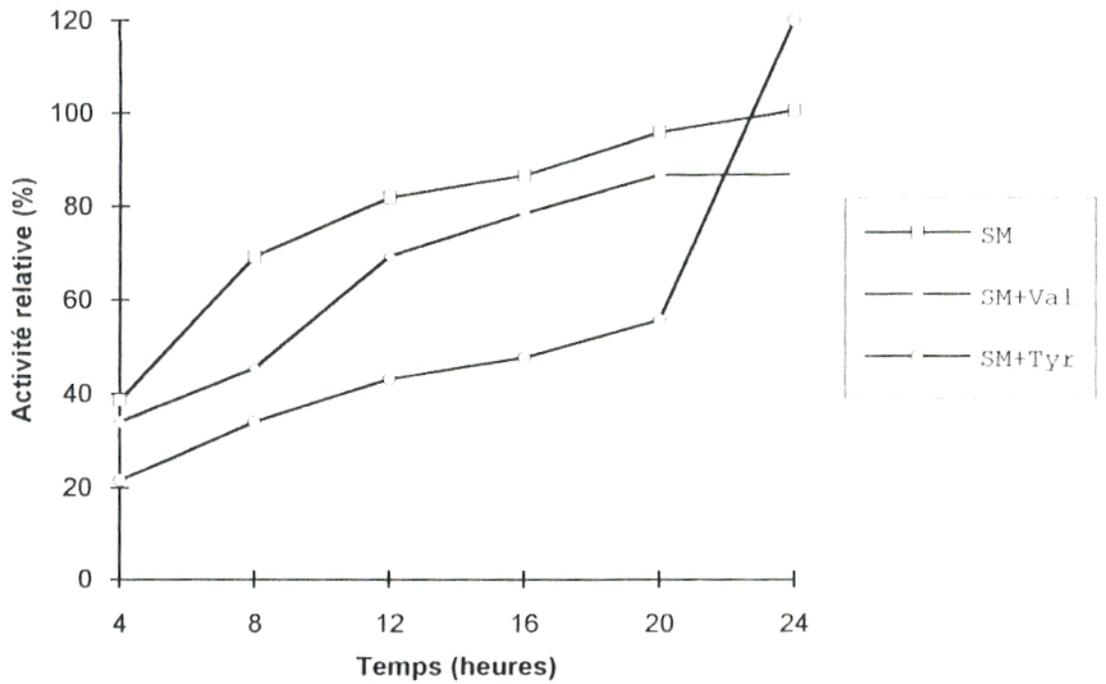


Figure 15: Production de protéase dans le milieu SM additionné des acides aminés, Val et Tyr, par la souche S70.

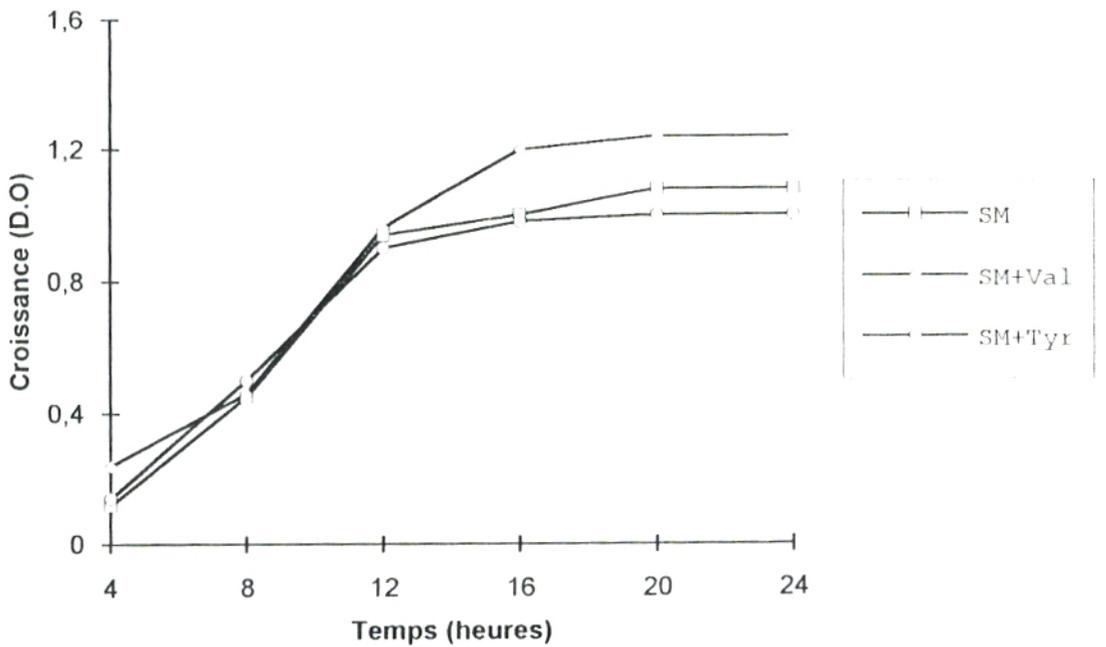


Figure 16: Croissance de la souche S70 dans le milieu SM additionné des acides aminés, Val et Tyr.

production optimales de protéases. Des accroissements importants dans les niveaux de ces deux phénomènes sont, en effet, observées quand le milieu est supplémenté en acides aminés. Ces derniers semblent agir soit sur les deux phénomènes ensemble (alanine), soit sur l'un deux: la production d'enzyme (glycine) ou la croissance (valine).

#### **IV-2-2-3. Leu, Cys**

L'examen des courbes de production de protéase en la présence respective des acides aminés Leu et Cys (figure 17) indiquent deux situations inverses. Une forte répression de la production d'enzymes, 52% en moyenne, est notée en présence de Cys. Les niveaux d'activité enzymatique sont les plus faibles qui soient obtenus jusqu'à présent sur le milieu SM additionné d'acides aminés. par ailleurs, la répression exercée par cet acide aminé est notable pendant toute la durée de la croissance. Celle-ci telle que montrée par la figure 18 se déroule de façon normale, ce qui indique bien qu'il s'agit du schéma d'une forte répression.

L'effet répresseur de cet acide aminé a déjà été rapporté par COHEN et DRUCKER (1973) mais pas par MILLET et AUBERT (1969), dans le cas de *B. megaterium*. Par contre MILLET (1968) décrit l'inhibition de l'activité enzymatique de la métalloprotéase de cette souche, par cet acide aminé. Il était important de ce fait, de vérifier si l'inhibition touchait réellement la production d'enzyme ou seulement l'activité enzymatique de la protéase déjà produite. Dans le cas de la souche S70, cet acide aminé s'est révélé inactif sur l'activité du surnageant de culture, par conséquent, il s'agit bien d'une répression de la production de protéase.

En présence de Leu, une augmentation de 26%, de l'activité enzymatique, est notée après 16 h de culture. La croissance enregistrée est également importante. Cet effet stimulant de la leucine peut sembler surprenant sachant que cet acide aminé s'est révélé incapable d'induire la production

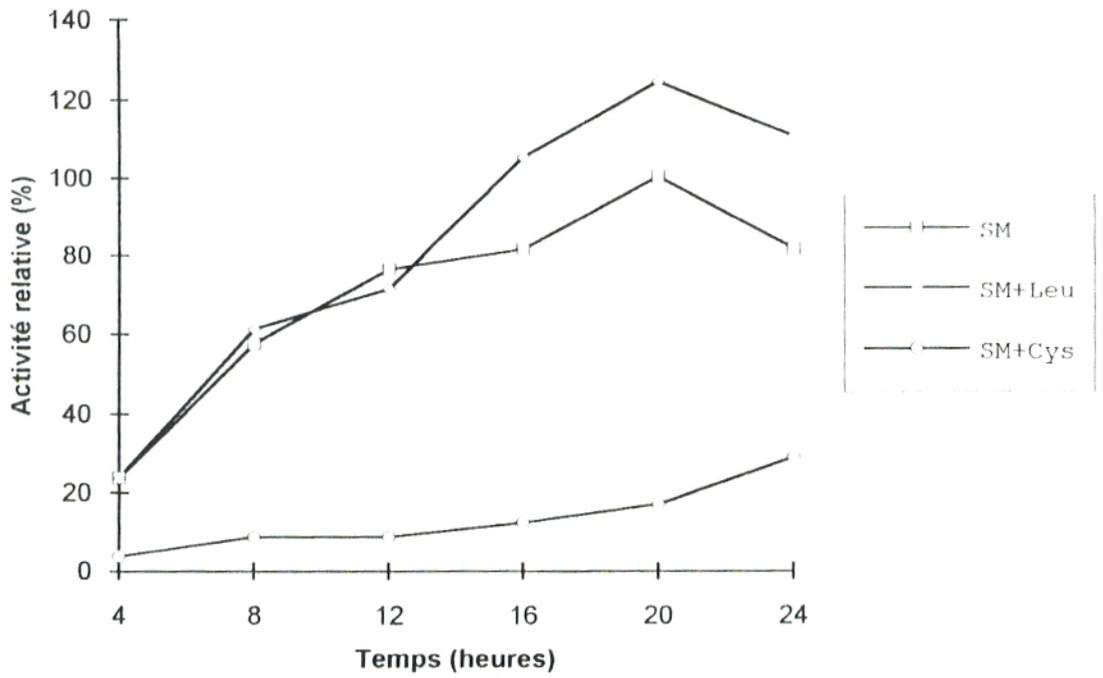


Figure 17: Production de protéase dans le milieu SM additionné des acides aminés, Leu et Cys, par la souche S70.

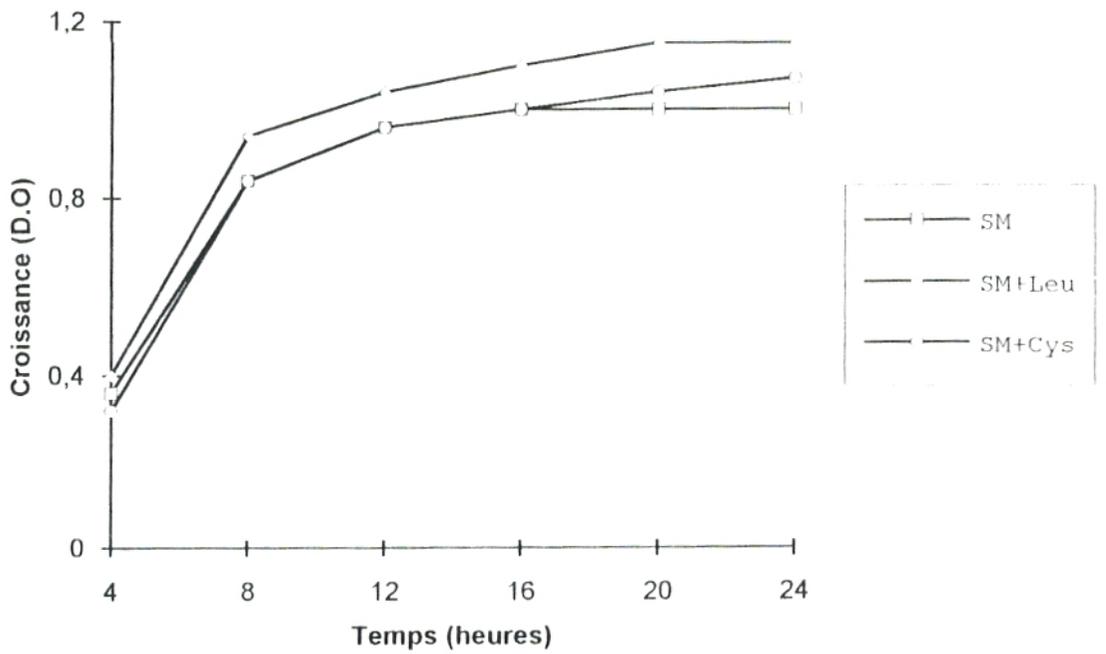


Figure18: Croissance de la souche S70 dans le milieu SM additionné des acides aminés, Leu et Cys.

de protéase ni même de permettre la croissance des bactéries quand il était testé en milieu minimal. Son effet s'est manifesté en milieu plus riche probablement parce que cet acide aminé aurait besoin d'autres éléments nutritifs pour exercer son effet.

#### **IV-2-2-4. Arg, Trp**

Ces deux acides aminés sont également à l'origine de deux comportements inverses (figure 19). Un accroissement important de l'activité enzymatique (33%) est notée en présence d'arginine. Ce même acide aminé présentait un effet négatif sur la croissance et la production d'enzyme en milieu minimal. Ainsi, il semblerait qu'on soit en présence d'une situation analogue à celle observée dans le cas de la leucine. L'effet positif de ces deux acides aminés se manifesterait plutôt en milieu nutritif plus riche.

A l'inverse, le tryptophane semble être responsable d'une diminution notable, non seulement de la production d'enzyme (28%) mais aussi de la croissance bactérienne (figure 20). Toutefois, l'accroissement du niveau de production de protéase observé en fin de culture semble indiquer une dérépression progressive, suite à l'épuisement de cet acide aminé du milieu de culture. Comme pour la tyrosine, la croissance bactérienne n'est pas stimulée. Il est également important de remarquer que ces deux acides aminés, à noyaux aromatique, exercent un effet négatif sur la production de protéases avec le même effet sur la croissance. Ces résultats sont en faveur d'un mécanisme d'action qui leur serait commun.

#### **IV-2-2-5. Asp, Glu, Phe**

Les acides aminés Glu et Phe ne semblent avoir aucun effet particulier ni sur la croissance ni sur la production d'enzyme qui se déroulent de façon comparable à celle du témoin (figure 21 et 22). L'acide aspartique, par contre, semble avoir un effet positif sur les deux phénomènes. L'accroissement de la production d'enzyme en présence de cet acide aminé est de 49%.

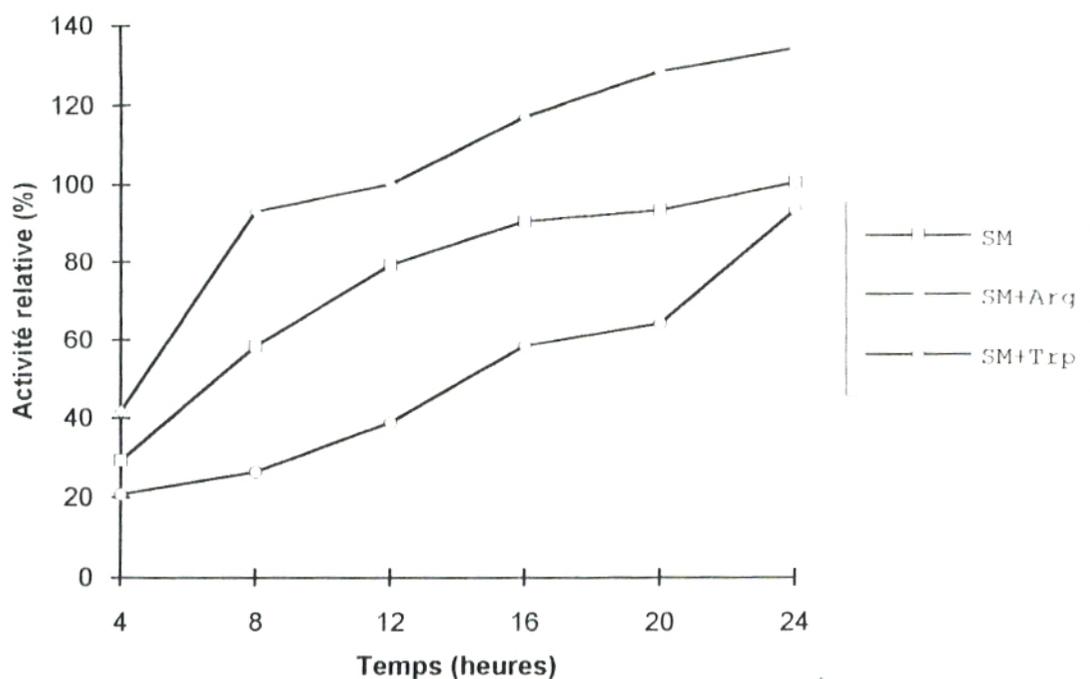


Figure 19: Production de protéase dans le milieu SM additionné des acides aminés, Arg et Trp, par la souche S70.

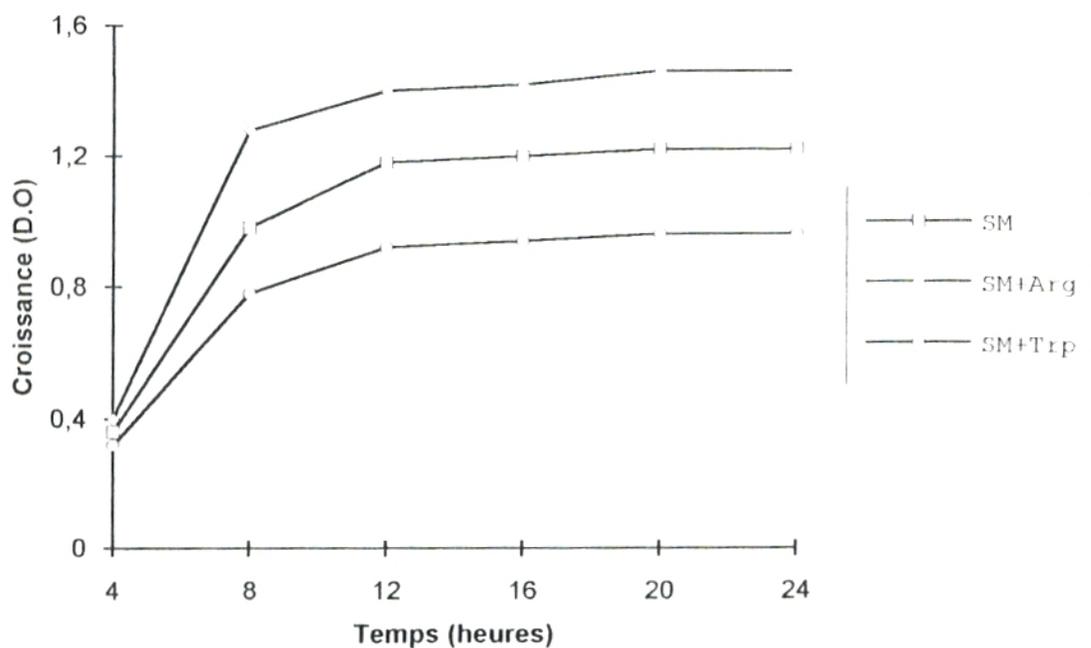


Figure 20: Croissance de la souche S70 dans le milieu SM additionné des acides aminés, Arg et Trp.

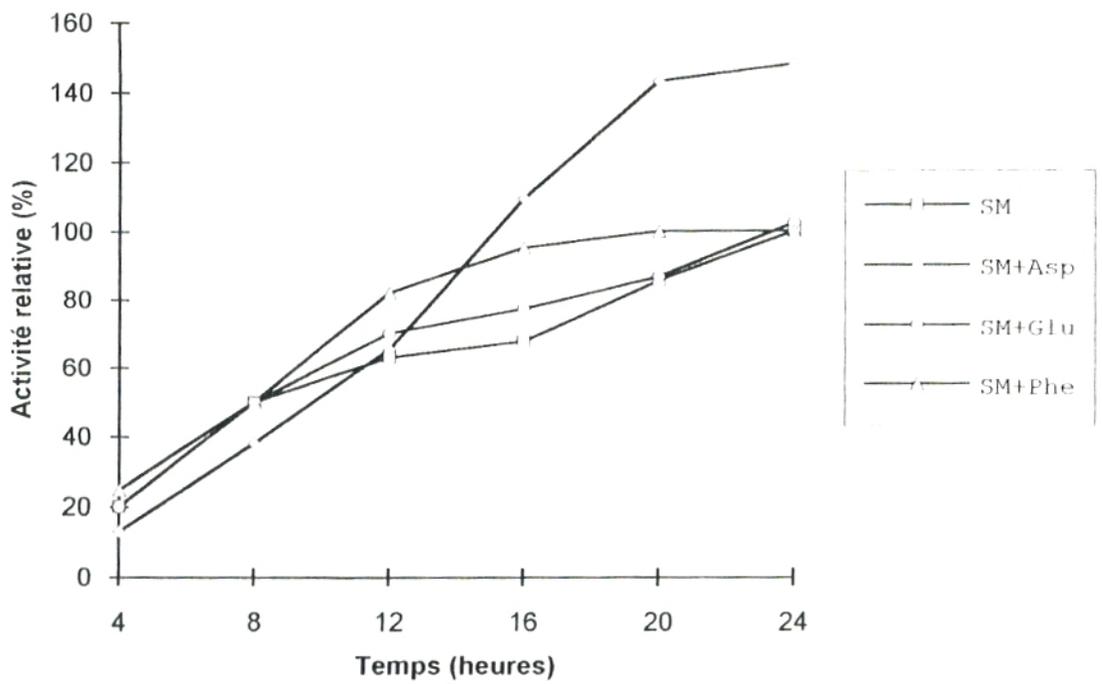


Figure 21: Production de protéase dans le milieu SM additionné des acides aminés, Asp, Glu et Phe, par la souche S70.

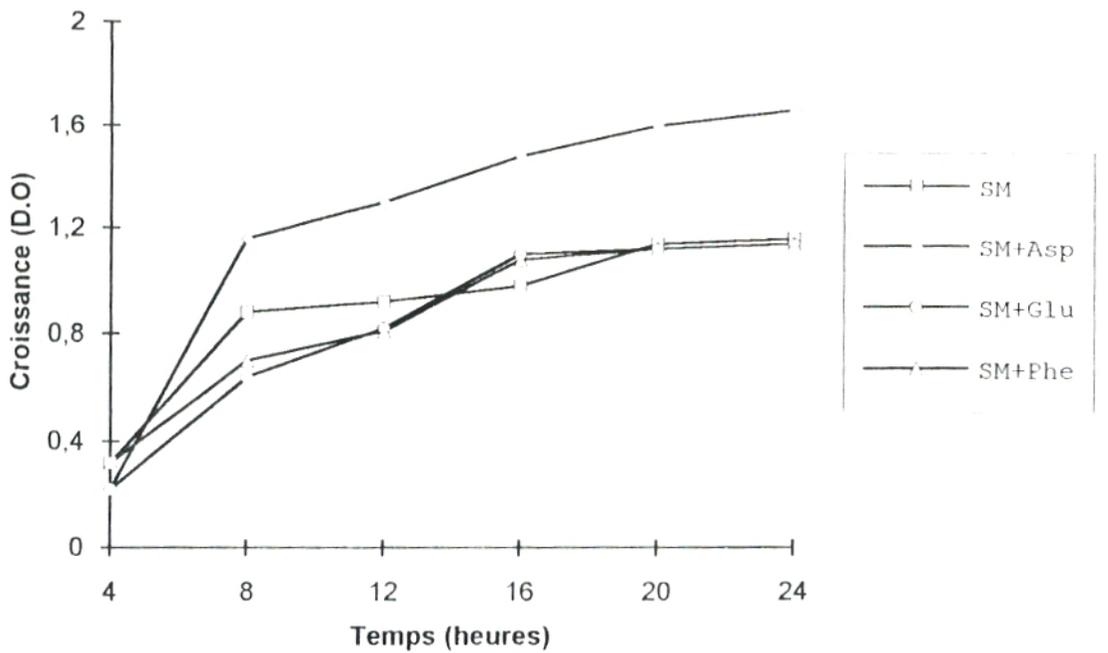


Figure 22: Croissance de la souche S70 dans le milieu SM additionné des acides aminés, Asp, Glu et Phe.

#### **IV-2-2-6. La cystéine à différentes concentrations**

La cystéine est testée à trois concentrations: 0,1%, 1% et 2%.

Comme le montre la figure 23, à 0,1% de Cys, le taux moyen de répression est de 31%. Il est nettement inférieur à celui noté pour 0,5% de Cys (52%). Cette répression est même levée à 76% en fin de culture, et la croissance n'est pas du tout modifiée (figure 24).

A 1% de cystéine, la répression enregistrée est de 57%, alors qu'à 2%, elle est totale et la croissance est également inhibée.

Dans le cas de leur souche, TSURU (1962) et TSURU et FUKOMOTO (1963) ont constaté que l'acide aminé inhibiteur (la glycine) conduit à des perturbations cytologiques graves pouvant suspendre la vie de la cellule. En effet pour 1% en glycine, un allongement anormal des bacilles est noté, la lyse cellulaire survient pour des concentrations  $\geq 2\%$ . Dans le cas de la souche S70, la morphologie cellulaire, telle que vue au microscope ordinaire, n'est pas modifiée.

#### **IV-2-2-7. Ajout de la cystéine à T7 et T13**

Après addition de la cystéine à 0,5%, au milieu de culture, à T7 (figure 25) on note une diminution de l'activité enzymatique d'abord faible (14%) puis rapide et importante (60%). La croissance ne semble pas être affectée (figure 26).

A T 13, on observe une augmentation insignifiante de l'activité enzymatique suivi d'une diminution progressive à un taux moyen de 31%. Comme pour l'hydrolysat de caséine, la répression enregistrée à ce moment de la croissance est moins sévère qu'à T7.

### **IV-2-3. Les combinaison d'acides aminés**

#### **IV-2-3-1. Combinaison de deux acides aminés**

La combinaison de la cystéine aux acides aminés ayant montré les effets les plus fortement positifs sur la production d'enzyme (Cys + Arg et Cys + Asp) ne provoque

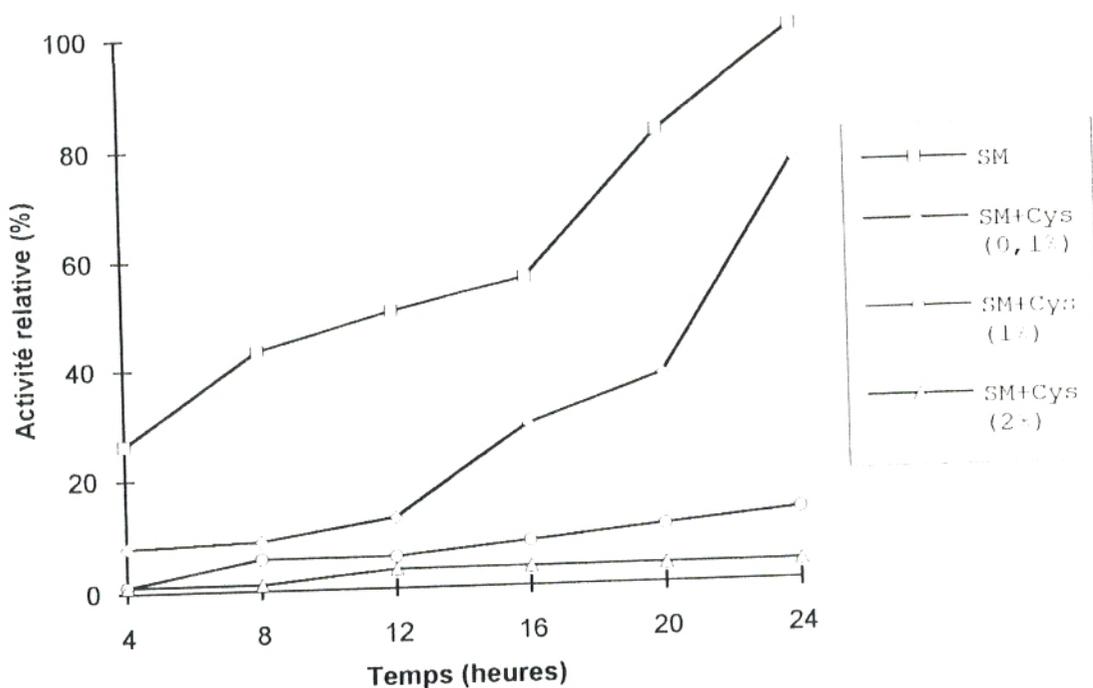


Figure 23: Production de protéase dans le milieu SM additionné de cystéine, à différentes concentrations, par la souche S70.

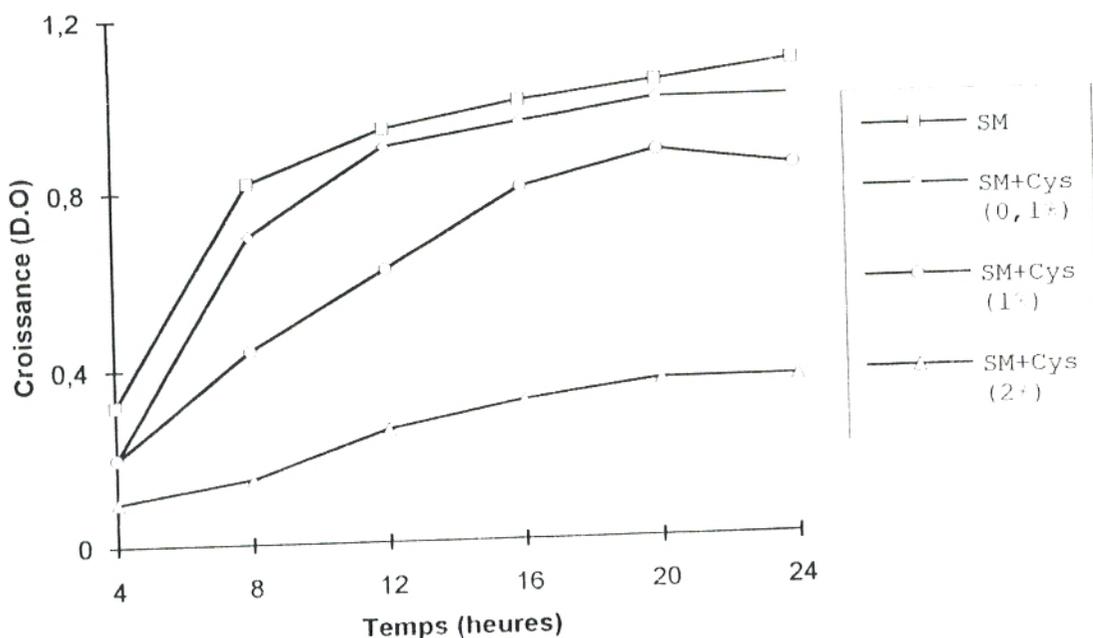


Figure 24: Croissance de la souche S70 dans le milieu SM additionné de cystéine à différentes concentrations.

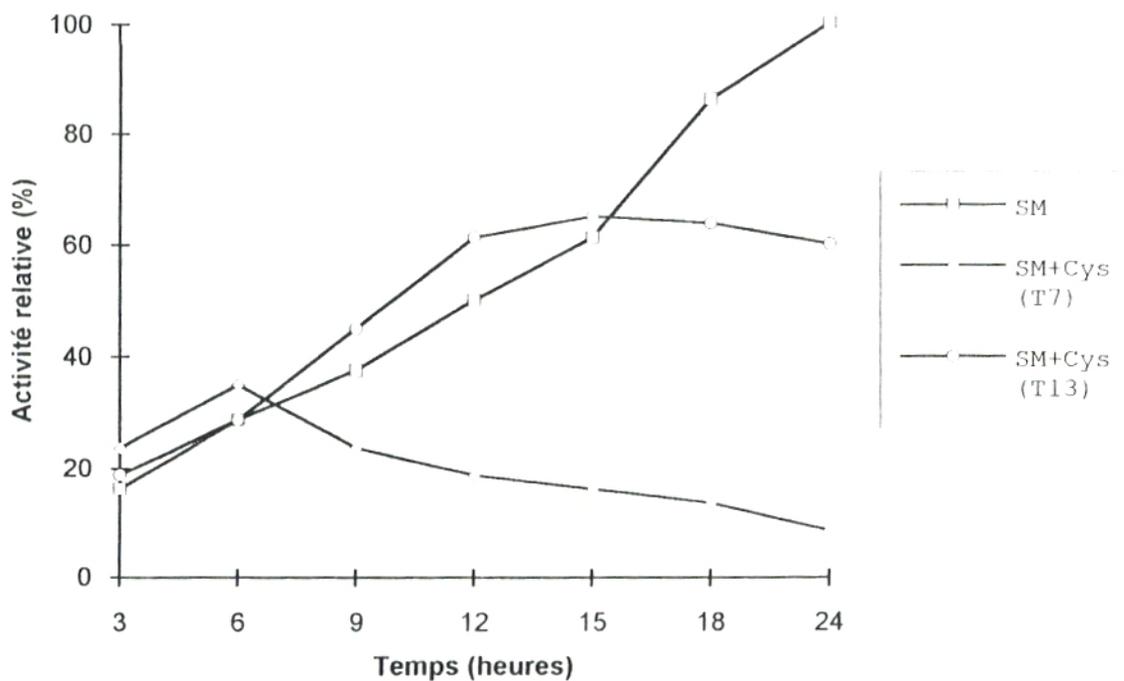


Figure 25: Production de protéase dans le milieu SM auquel la cystéine est ajoutée à T7 et T13, par la souche S70.

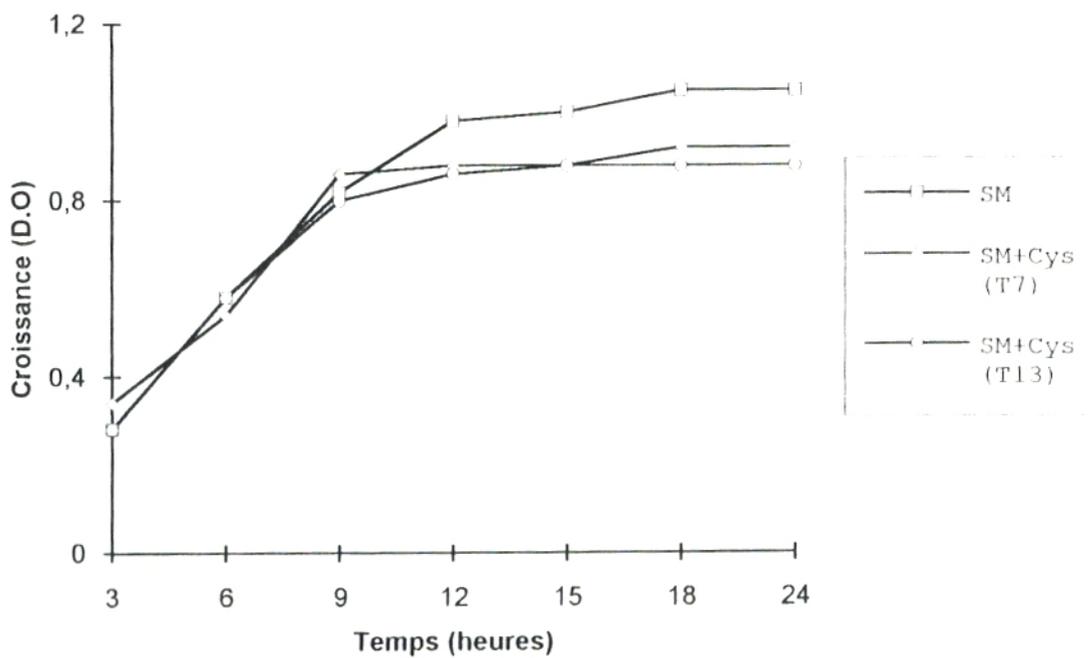


Figure 26: Croissance de la souche S70 dans le milieu SM auquel la cystéine est ajoutée à T7 et T13.

aucune augmentation du taux de production. En fait, elle ne permet même pas de lever l'inhibition exercée par la cystéine ainsi que le montre la figure 27. Ce résultat semble logique puisque l'induction ne pourrait être opérationnelle sous un régime de répression. Les croissances bactériennes ne sont pas modifiées non plus (figure 28).

#### **IV-2-3-2. Combinaison de trois acides aminés**

- (Arg+Asp+Leu) = C<sub>1</sub>

la combinaison des trois acides aminés, à effet positif sur la production de protéase, est testée (figure 29 et 30). Elle conduit à une augmentation de la production d'enzyme de 33% (les taux d'augmentation individuels respectifs étant de 49%, 33% et 26%).

La présence de ces trois acides aminés ensembles ne semble pas avoir un effet synergique sur la production de protéases. Ce qui suggère, d'après HELLIO et al (1993) que ces composés agissent sur une même cible, eu égard à la régulation de la production de ces enzymes, ou alors que plusieurs protéases différentes sont produites.

- (Tyr+Trp+Val) = C<sub>2</sub>

La combinaison des acides aminés à effet négatif provoque une diminution de la production d'enzyme de 33% en moyenne. Les taux de répression individuels respectifs sont: 34%, 28% et 11%. Il apparaît donc que la répression exhibée par cette association est égale à celle de l'acide aminé le plus fortement répresseur (34%).

- C<sub>3</sub> = (C<sub>1</sub> + C<sub>2</sub>)

Les acides aminés à effet positif et ceux exerçant un effet négatif sur la production de protéase sont ajoutés ensemble. Cette combinaison semble avoir un effet intermédiaire sur la production d'enzyme, le taux de répression étant de 13% seulement. Ainsi la répression est levée à 23% environ en présence des acides aminés à effet positif.

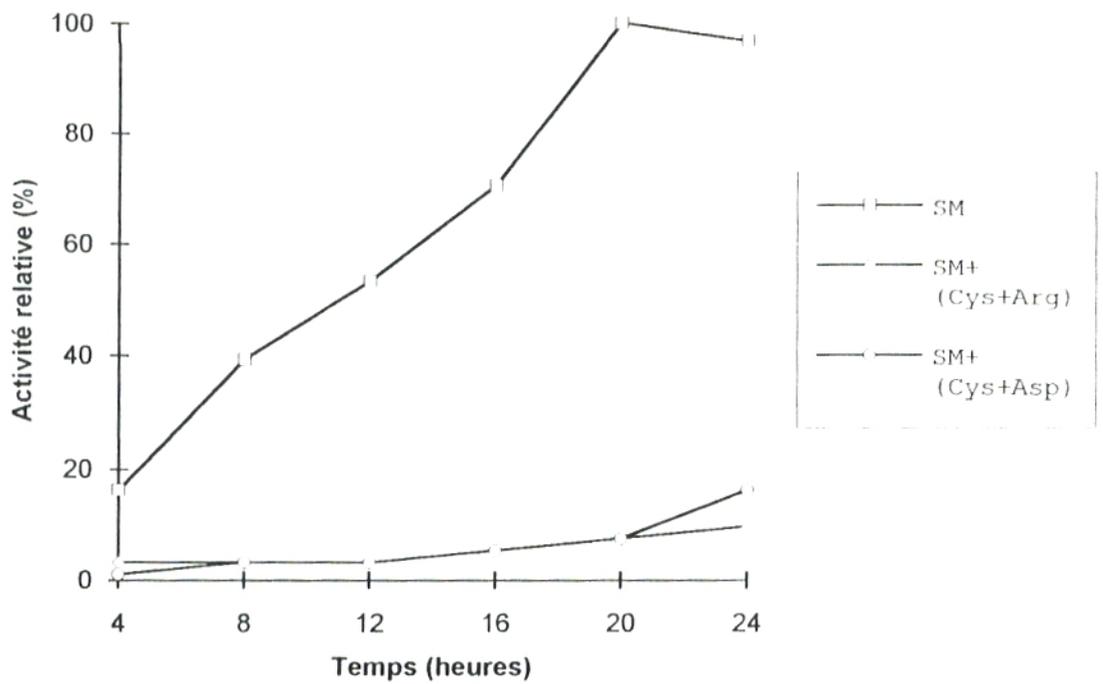


Figure 27: Production de protéase dans le milieu SM additionné des combinaisons de deux acides aminés, par la souche S70.

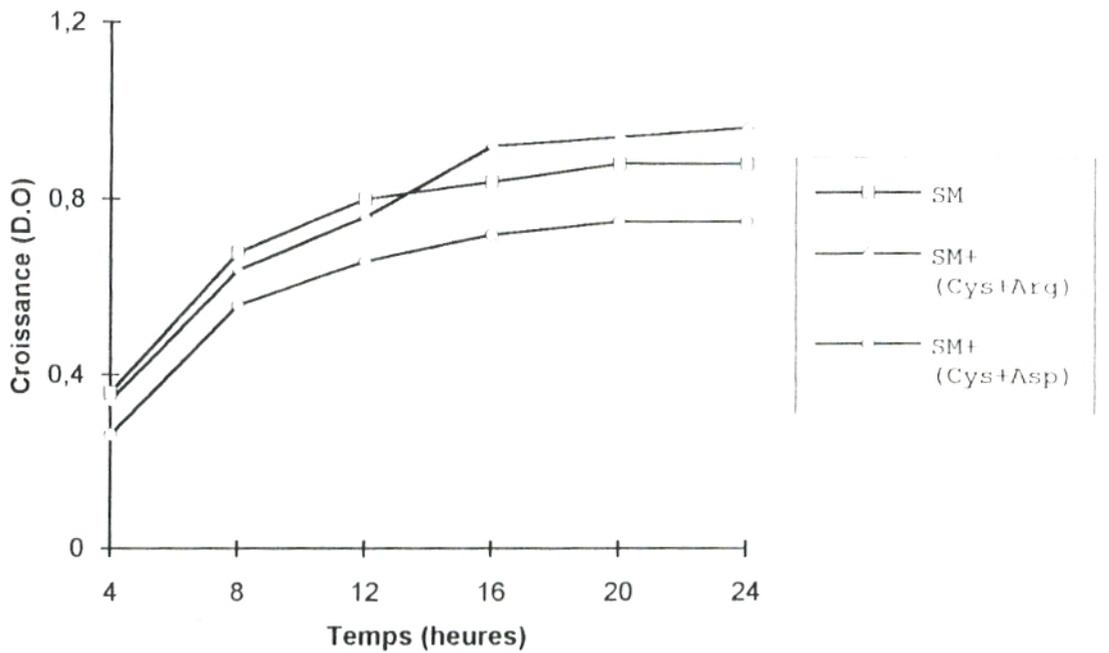


Figure 28: Croissance de la souche S70 dans le milieu SM additionné des combinaisons de deux acides aminés.

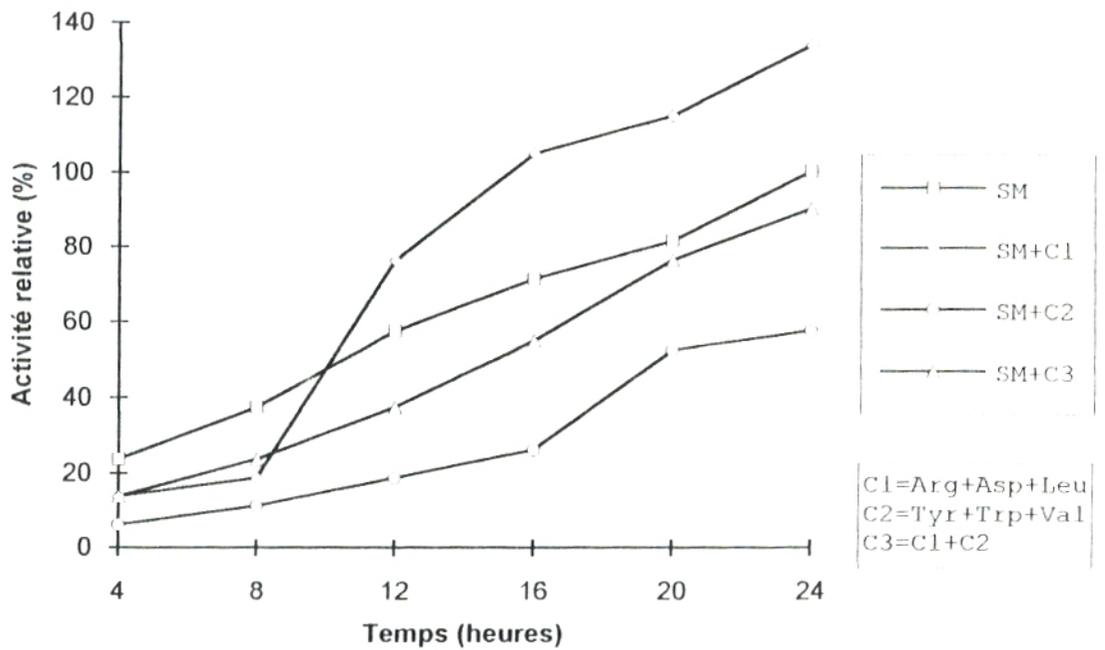


Figure 29: Production de protéases dans le milieu SM additionné des combinaisons de trois acides aminés, par la souche S70.

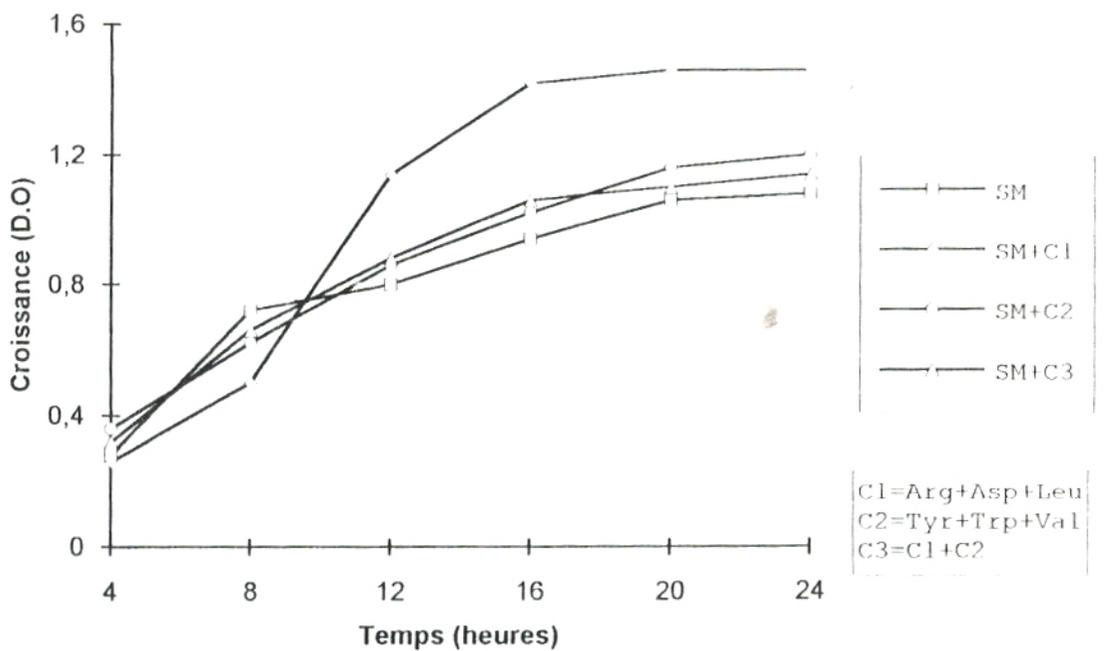


Figure 30: Croissance de la souche S70 dans le milieu SM additionné des combinaisons de trois acides aminés.

MILLET et AUBERT (1969) ont également étudié plusieurs combinaisons d'acides aminés sans qu'il leur soit possible de définir aucune spécificité nette. Contrairement à ce que nous avons noté, pour ces auteurs, la répression augmente quand le nombre d'acide aminés augmente, qu'elle que soit leur action individuelle.

En guise de conclusion à ce chapitre, il est important de souligner que le comportement des acides aminés testés ne peut être rapporté à aucun schéma général de régulation de la synthèse des protéases chez *Bacillus*. D'ailleurs un tel schéma n'existe pas. Il est établi (PRIEST, 1977) que les acides aminés ne répriment pas tous avec une efficacité égale, le même acide aminé ne causant pas, non plus, une répression effective chez les divers *Bacillus*.

Par ailleurs, la littérature scientifique (DOI, 1991; HE et al, 1991) considère que le phénomène de répression de la production de protéase chez ce genre est inconciliable avec l'existence d'un mécanisme de régulation simple et central. Cette situation est compliquée par la méconnaissance des processus métaboliques qui lui sont associés principalement la nature des inducteurs et répresseurs.

## **V. Propriétés générales des protéases de la souche S70**

### **V-1. Températures optimales**

Le mélange réactionnel tamponné à pH 8 est incubé aux différentes températures (30, 40, 50, 60 et 70 °C) pendant la durée habituelle (20 min).

L'évolution de l'activité enzymatique en fonction de la température d'incubation du mélange réactionnel est donnée par la figure 31. Le maximum d'activité est obtenu à 50 °C. Au delà de cette température, l'activité enzymatique diminue rapidement pour disparaître presque totalement à 70 °C. Les

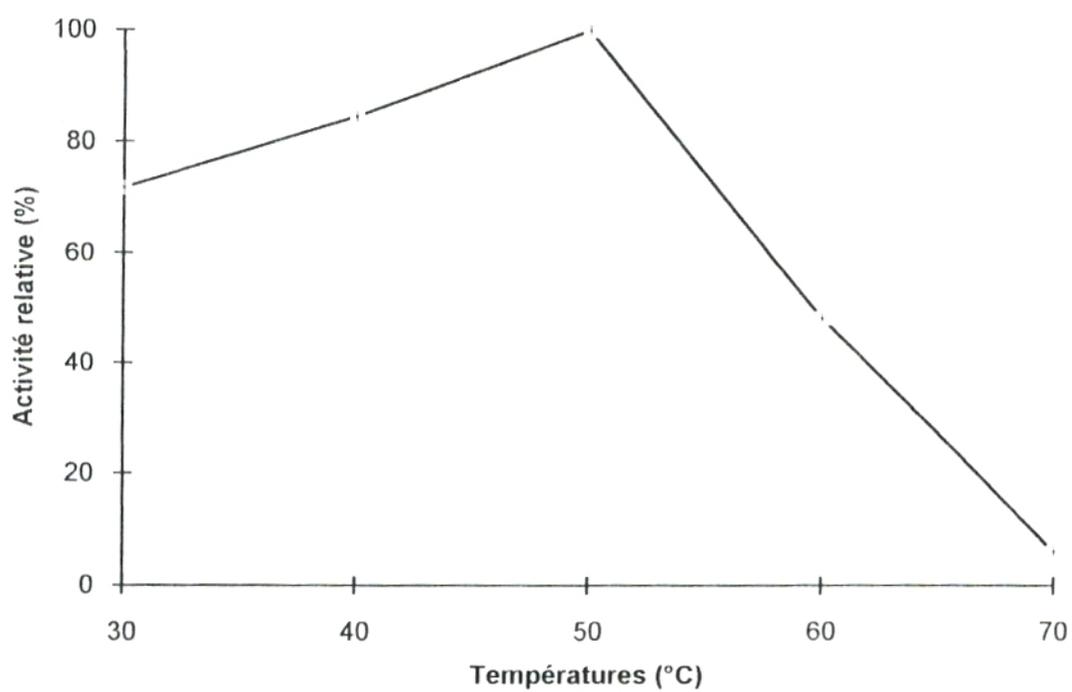


Figure 31: Effet de la température d'incubation du mélange réactionnel sur l'activité des protéases de la souche s70

protéases alcalines de *Bacillus* sont connues pour conserver une activité importante à 50 °C mais s'inactivent rapidement à 60-65 °C (FOGARTY et al, 1974). FUJIWARA et YAMAMOTO (1987) décrivent une protéase alcaline dont la température optimale d'activité est 60 °C mais la plupart de son activité est perdue à 65 °C. Toutefois, les protéases alcalines isolées des *Bacillus* alcalophiles montrent une thermostabilité importante. Ces enzymes conservent des activités notables à 70 et 80 °C (KUNITATE et al, 1989; SHIMOGAKI et al, 1991).

### V-2. pH optimaux

Les surnageants de culture amenés aux différents pH (de pH 6 à pH 12) sont testés à deux températures: 30 et 50 °C. L'évolution de l'activité enzymatique en fonction du pH est donné par la figure 32.

L'examen des courbes montre que l'activité enzymatique observée à 50 °C est de loin la plus importante, le maximum d'activité étant obtenu pour un pH égal à 9. Une autre activité optimale est notée à 30 °C pH 8. Dans les deux cas l'activité croit rapidement jusqu'à l'optimum de pH puis décroît, pour reprendre légèrement à pH 12.

Ces résultats tendraient à prouver l'existence d'au moins deux enzymes différentes dans le surnageant de culture de la souche S70. Une enzyme à tendance neutre active dans la zone de pH de 6 à 9 avec une activité maximale à pH 8. Au delà de ce pH, l'enzyme perd rapidement son activité. Cette incompatibilité apparente avec les conditions fortement alcalines, associée à une température optimale modérée (30 °C) suggèrent que l'enzyme en question pourrait être une protéase neutre, ces caractéristiques correspondent à celles cités dans la bibliographie dans le cas des métalloprotéases neutres (FOGARTY et al, 1974).

Le deuxième type d'enzyme semble être une protéase alcaline. Celle-ci montre une affinité prononcée pour les conditions nettement alcaline (pH8... pH12) et sa température optimale est élevée (50 °C).

Le regain d'activité relevé à pH 12, pour les deux températures, semble indiquer l'existence éventuelle d'un troisième type d'enzyme, probablement une protéase alcaline distincte de celle active à pH 9.

Ces résultats sont conformes aux données de la littérature (FOGARTY et al, 1974; PRIEST, 1977) où les deux types de protéases (neutre et alcaline) sont produits en mélange par certaines espèces de *Bacillus* notamment l'espèce *B. subtilis*.

### V-3. Identification des sites actifs

la figure 33 montre l'effet des deux inhibiteurs (le PMSF et l'EDTA) sur l'activité enzymatique des protéases de la souche S70. Les résultats précédents ont montré l'existence de deux zones d'activité optimale au double plan du pH et de température. Pour cela l'action des inhibiteurs a été examinée dans ces différentes conditions optimales (30 °C pH 8 et 50 °C, pH 9).

L'inhibition par l'EDTA, à pH 8 est importante, qu'elle que soit la concentration en inhibiteur. 39,2% et 21% sont les activités résiduelles notées pour des concentrations en EDTA égales à  $10^{-4}$  ET  $10^{-3}$  M respectivement. L'inhibition par ce réactif permet de conclure à la présence d'une metalloprotéase neutre dans le surnageant de culture de la souche S70. Toujours à pH 8, l'inhibition par le PMSF est moins importante, 57% et 41% d'activité résiduelle sont notées pour des concentrations respectives, en PMSF de  $10^{-4}$  M et  $10^{-3}$  M. Ce qui indique que l'activité enzymatique exhibée dans ces conditions est principalement l'oeuvre d'une metalloprotéase neutre inhibée par l'EDTA et dans une moindre mesure, celle d'une protéase à sérine sensible à l'action du PMSF.

A  $T^{\circ}= 50$  °C et pH 9, l'inhibition par l'EDTA est presque nulle, l'activité résiduelle étant de 98% et 97% aux différentes concentrations en cet inhibiteur. par contre seulement 12% et 8% d'activité résiduelle sont notés en

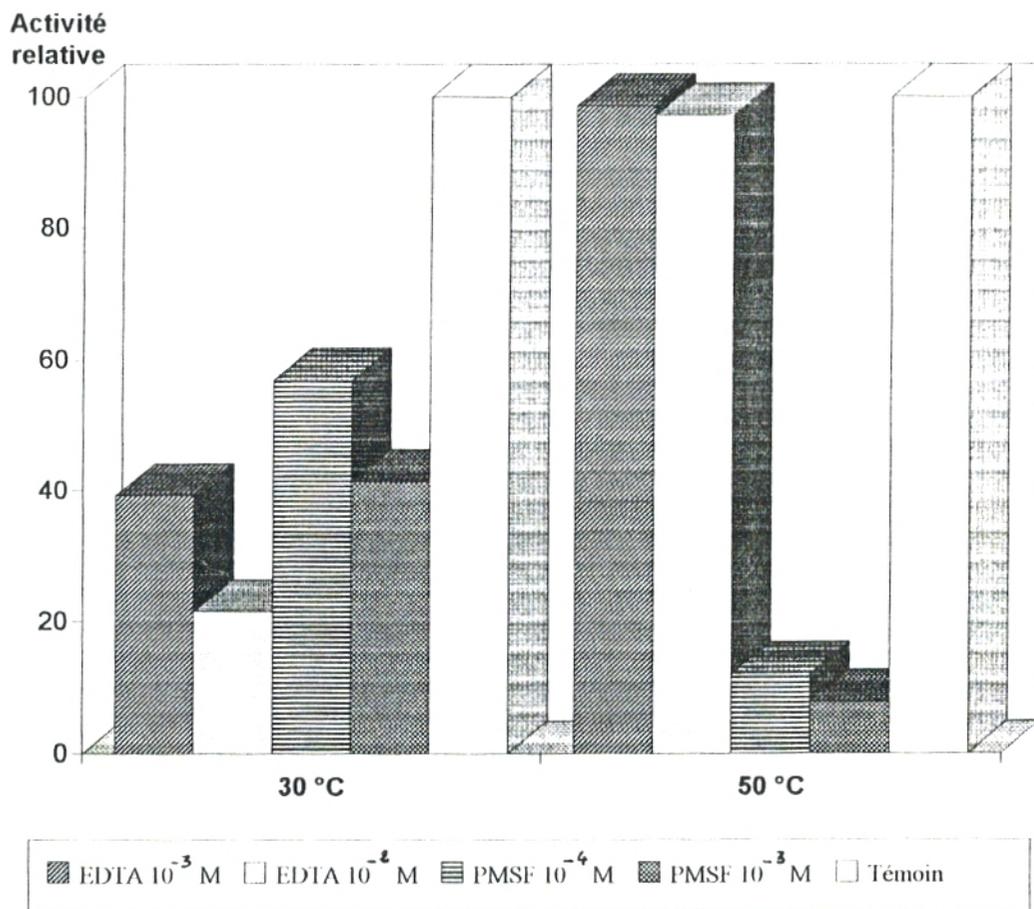


Figure 33: Effet des inhibiteurs sur l'activité des protéases de la souche S70.

présence de  $10^{-4}$  et  $10^{-3}$  M de PMSF respectivement. Ce qui indique clairement qu'on est en présence d'une protéase du type protéase à sérine.

En conclusion, il est intéressant de remarquer que les taux d'inhibition dans les différentes conditions de pH et de température montrent que l'activité qui domine est de type alcalin. ce qui semble indiquer que la souche S70 produit la protéase alcaline en quantités beaucoup plus importantes que la protéase neutre ou alors plusieurs types de protéases alcalines ensemble. Cette souche pourrait appartenir à l'une des espèces de *Bacillus* qui produisent plusieurs protéases extracellulaire ensemble. L'identification de la souche en faveur de l'appartenance à l'espèce *B. subtilis* approuve un tel résultat.

## CONCLUSION GENERALE

la technique de diffusion sur plaque adoptée dans la première partie de cette étude a permis une évaluation efficace du pouvoir protéolytique d'un ensemble de souches de *Bacillus* isolées du sol et de substrats alimentaires et la sélection de la meilleure souche productrice de protéases extracellulaires.

x x L'étude de l'aptitude de cette souche à produire des protéases a été examinée dans diverses conditions nutritionnelles et a montré que ces enzymes sont soumises à une régulation par les phénomènes d'induction et de répression exercées par divers acides aminés et combinaisons d'acides aminés.

x La connaissance des acides aminés inducteurs et répresseurs permettra la formulation de milieux synthétiques pour une production de protéases meilleure que celle obtenue sur milieu de SCHLEGEL modifié et surtout pour une étude plus précise des mécanismes de régulation de la production de ces enzymes.

L'influence de la température, du pH et des inhibiteurs sur l'activité des protéases produites par cette souche a permis de préciser certaines des caractéristiques de ces enzymes. Les deux premiers paramètres ont permis, à eux seuls, de déceler la présence d'au moins deux enzymes dans le surnageant de culture. Les inhibiteurs ont permis d'identifier ces enzymes respectivement aux seryl protéases alcalines et métalloprotéases neutres généralement produites par des *Bacillus*.

Il serait intéressant de compléter cette étude sur les aspects suivants:

- La régulation de la production de ces enzymes devra être complétée par l'analyse des acides aminés restants et des autres conditions de culture notamment les paramètres physiochimiques. Des essais d'optimisation du processus de production sont également d'un grand intérêt.

- L'identification des gènes régulateurs permettra d'apprécier les potentialités particulières de production de protéase chez cette souche.

- La purification de ces enzymes permettra une détermination plus rigoureuse de la composition du mélange d'enzymes protéolytiques présent dans le surnageant de culture de cette souche et une caractérisation plus convenable de ces enzymes.

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1°. ALEXANDER, B. et F.G. PRIEST, 1990. Numerical classification and identification of *Bacillus sphaericus* including some strains pathogenic for mosquito larvae. *Journal of general microbiology*, 136, 367-376.
- 2°. ARBIGE, M.V.; B.A. BULTHUIS; J. SCHULTZ et D. GRABB, 1993. Fermentation of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetic (SONENSHEIN, A.L.; J.A. HOCH et R. LOSICK), 871-895. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- 3°. ARONSON, A.I., 1973. The function of various proteases in bacterial sporulations. *Colloques internationaux C.N.R.S.*, 227. Régulation de la sporulation microbienne, 33-37.
- 4°. ARVIDSON, S., 1973. Hydrolysis of casein by three extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus* strain V<sub>8</sub>. *Acta. path. microbiol. scand. section B* 81, 538-544.
- 5°. AUNSTRUP, K., 1979. Microorganisms as producers of industrial enzymes. in *Proceedings of the international congress of Microbiology and Food Industry*. Tr. Apria.
- 6°. BARFORD, H.C., 1981. Production of enzymes by fermentation. *Essays in applied microbiology*, 2-25.
- 7°. BARTHOMEUF, C.; H. POURRAT et A. POURRAT, 1989. Properties of a new alkaline proteinase from *Aspergillus niger*. *Chem. Pharm. Bull.* 37(5), 1333-1336.

- 8°. **BERGEY'S Manual of systematic bacteriology, 1986.** Endospore forming Gram-positive rods and cocci. Section 13. Vol 2. 9<sup>ième</sup> ed. Williams and Wilkins Co Baltimore.
- 9°. **BERKELEY, R.C.W.; N.A. LOGAN; A. SHUTE et A.G. CAPEY, 1984.** Identification of *Bacillus* species. In *Methods in Microbiology*, vol. 16 (T. Bergan, ed). London, Academic, Press, 292-328
- 10°. **BRUCKNER, R.; O. SHOSEYOV et R.H. DOI, 1990.** Multiple active forms of a novel serine protease from *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, 221, 486-490.
- 11°. **BULTHUIS, B.A., J. FRANKENA; G.M. KONINGSTEIN; H.W. VAN VERSEVELD et A.H. STOUTHAMER, 1988.** Instability of protease production in a  $rel^+/rel^-$  pair of *Bacillus licheniformis* and associated morphological and physiological characteristic. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 54, 95-111.
- 12°. **CARTER, D.V. et G. SYKES, 1961.** The assay of enzyme activity by the plate diffusion technique. *Journal of pharm. and pharm. ecology*, Vol. 13, 195-199.
- 13°. **CHAMBLISS, G.H., 1993.** Carbone source-mediated catabolite repression. In *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: (SONENSHEIN, A.L.; J.A. HOCH et R. LOSICK), 213-219.
- 14°. **CHANDRASEKARAN, L. et S.C. DHAR, 1982.** A rapid method to determine the ability of different bacterial culture for the production of extracellular protease. *Leather science*, vol. 29(9), 430-435.

- 15°. CHANDRASEKARAN, L. et S.C. DHAR, 1983. A low-cost method for the production of extracellular alkaline proteinase using tapioca starch. *J. Ferment. Technol.*, vol. 61, 5, 511-514.
- 16°. CHEESEMAN, G.C., 1963. Action of rennet and proteolytic enzymes on casein in casein-agar gels. *J. Dairy Res.*, 30, 17-23.
- 17°. CHENG, Y.S.E. et A. ARONSON, 1977. Characterization and function of intracellular proteases in sporulating *Bacillus cereus*. *Arch. Microbiol.*, 115, 61-66.
- 18°. CHEUNG, A.L., P. YING et V.A. FISCHETTI, 1991. A method to detect proteinase activity using unprocessed X-ray films. *Analytical Biochemistry* 193, 20-23.
- 19°. CLIFFE, A.J. et B.A. LAW, 1982. A new method for the detection of microbial proteolytic enzymes in milk. *Jour. of Dairy Research*, 49, 209-219.
- 20°. COHEN, B.L. et H. DRUCKER, 1977. Regulation of extracellular protease in *Neurospora crassa*: induction and repression under conditions of nitrogen starvation.
- 21°. DESMAZEAUD, M.J. et J. HERMIER, 1968. Facteurs intervenant dans la production du système protéolytique chez *Micrococcus caséolyticus*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 3(3), 419-429.
- 22°. DESMAZEAUD, M.J. et J. HERMIER, 1971. Spécificité de la protéase neutre de *Micrococcus caséolyticus*. *Eur. J. Biochem.* 19, 51-55.

- 23°. DOI, R.H., 1991. Proteolytic activities in *Bacillus*.  
Current opinion in Biotechnology, 2, 682-684.
- 24°. DOI, R.H.; X.S. HE, P. Mc CREADY et N. BAKHEIT, 1991.  
*Bacillus subtilis*: A model system for heterologous gene  
expression. Annals of the New York Academy of Sciences,  
vol. 646.
- 25°. DRUCKER, H., 1972. Regulation of exocellular proteases in  
*Neurospora crassa*: induction and repression of enzym  
synthesis. Journal of Bacteriology, June, 1041-1049.
- 26°. DRUCKER, H., 1973. Regulation of exocellular proteases in  
*Neurospora crassa*: role of *Neurospora* proteases in  
induction. Journal of Bacteriology, Nov., 593-599.
- 27°. ELMAYDA, E., D. PAQUET ET J.P. RAMET, 1985. Enzymatic  
proteolysis of milk proteins in a sal environment with a  
*Bacillus subtilis* neutral protease preparation. Journal of  
food science, volume 50, 1745-1746.
- 28°. ELMAYDA, E., D. PAQUET, J.P. RAMET et G. LINDEN, 1986.  
Proteolytic activity of a *Bacillus subtilis* neutral  
protease preparation up on casiens and whey proteins of  
cow's milk. J. Dairy, SCI., 69, 305-310.
- 29°. FEDER, J.; N. AUFDERHEIDE et B.S. WILDT, 1976. Studies  
on the inhibition of thermolysin. Symposium on enzyme and  
proteins from thermophilic microorganisms. Zürich.
- 30°. FOGARTY, W.M., F.P. GRIFFIN et A.M. JOYCE, 1974. Enzyms  
of *Bacillus* species. Part 2. Process. Biochem. Sep., 27-  
35.

- 31°. FONTANA, A., E. BOCCU et F. M. VERONESSE, 1976. Effect of EDTA on the conformational stability of thermolysin, enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. proceeding of the internat. symposium Zurich.
- 32°. FRANKENA, J., H. W. VANVERSEVELD et A. H. STOUTHAMER, 1988. Substrate and energy costs of the production of exocellular enzymes by *Bacillus licheniformis*. Biotechnology and Bioengineering, vol., 32, 803-812.
- 33°. FUJIWARA, N. et K. YAMAMOTO, 1987. Production of alkaline protease in a low cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzym. Journal of fermentation technology, vol. 65, 3, 345-348.
- 34°. FUJIWARA, N., T. TSUMIYA, T. KADATA, T. HOSOBUCHI et K. YAMAMOTO, 1989. Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzym. Process. Biochem. 24, 155-156.
- 35°. FUJIWARA, N., K. YAMAMOTO et A. MASUI, 1991. Utilisation of a thermostable alkaline protease from an alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray film. Journal of Fermentation and Bioengineering. vol. 72,4, 306-308.
- 36°. GRIPON, J. C. et J. L. BERGERE, 1972. Le système protéolytique de *penicillium roqueforti*: I. conditions de production et nature du système protéolytique. Le lait tome II n° 518, 497-514.
- 37°. HANSON, M. A. et G. A. MARZLUF, 1973 Regulation of a sulfur-controlled protease in *Neurospora-crassa*. Journal of bacteriology, Nov., 788-789.

- 38°. HE, X. S.; R. BRÜCKNER et R. H. DOI, 1991 a. The protease genes of bacillus. Res. Microbiol., 142, 797-803.
- 39°. HE, X. S.; Y. T. SHYU; S. NATHOO; S. L. WONG, et R. H. DOI, 1991b. Construction and use of *Bacillus subtilis* mutant deficient in multiple protease gene for the expression of encaryotic genes. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 646, 69-77.
- 40°. HEGGAZI, F.Z., 1990. Extracellular proteinase of *Enterococcus faecalis subsp liquefaciens*: Production, milk-clotting and proteolytic activities. Microbiol.-Aliments- Nutrition, vol. 8, 341-348.
- 41°. HELLIO, F. C., N. ORANGE et J. F. GUESPIN-MICHEL, 1993. Growth temperature controls the production of a single extracellular protease by *Pseudomonas fluorescens* MFO in the presence of various inducers. Res. Microbiol., 144, 617-625.
- 42°. HENNER, D.; M. YANG; L. BAND et J. A. WELLS, 1985. Expression of cloned protease genes in *Bacillus subtilis*. Molecular Biology of Microbial Differentiation.
- 43°. HOLZER, H. et P. C. HEINRICH, 1980. Control of proteolysis. Ann. Rev. Biochem., 49, 63-91.
- 44°. KLIER, A.; T. MSADEK et G. RAPOPORT, 1992. Positive regulation in the Gram-positive bacterium: *Bacillus subtilis*. Ann. Rev. Microbiol., 46, 429-459.
- 45°. KOBAYASHI, T., A. OGASAWARA, S. ITO et M. SAITOH, 1985. Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*. Agric. Biol. Chem., 49 (3), 693-698.

- 46°. KOLEV D., 1978. Biosynthesis of extracellular proteolytic enzymes of *Bacillus mesentericus* strain 90. Acta Microbiologia, Bulgarica, 2, 13-20.
- 47°. KUNITATE, A., M. OKAMOTO et I. OHMORI, 1989. Purification and characterization of a thermostable serine protease from *Bacillus thurigiensis*. Agric. Biol. Chem., 53 (12), 3251-3256.
- 48°. KUNST, F., T. MSADEK, J. BIGNON et G. RAPOPORT, 1994. The Deg S/Deg U and Com P/Com A two-component systems are part of a network controlling degradative enzyme synthesis and competence in bacillus subtilis. 12<sup>th</sup> Forum in Microbiology.
- 49°. KUPPUSAMY, M. et K. BALARAHAN, 1990. Extracellular hydrolytic enzyme secretion in *Bacillus thurigiensis* H14 and *B. sphaericus* and their significance in media design. Indian J. Med. Res., 91, march, 149-150.
- 50°. LAME, H., 1976. Activité protéolytique de quelques bactéries isolées de saucissons. Revue Med. Vet., 127, 1, 91-100.
- 51°. LAWRENCE, R. C. et W. B. SANDERSON, 1969. A micromethod for the quantitative estimation of rennets and other proteolytic enzymes. J. Dairy Res., 36, 21-30.
- 52°. LENOIR, J., A. GLENZA, J. L. BERGERE, O. CERF, C. CHOISY, M. DESMAZEAUD et J. HERMIER, 1973. Les facteurs de production du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. Le Lait, Tome LIII, n° 525-526, 246-279.

- 53°. LEVISOHN, S. et A. I. ARONSON, 1967. Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cerus*. Journal of Bacteriology, March, 1023-1030.
- 54°. LOPEZ-FRANDINO, R., M. RAMOS, E. FERNANDEZ-GARCIA et A. OLANO, 1991. Proteolytic activity of two commercial proteinase from *Aspergillus oryzae* and *Bacillus subtilis* on ovine and bovine caseins. Journal of dairy Research, 58, 461-467.
- 55°. MARTLEY, F. G., S. R. JAYASHANKAR et R. C. LAWRENCE, 1970. An improved agar medium for the detection of proteolytic organisms in total bacterial counts. J. appl. Bact. 33, 363-370.
- 56°. McCONN, J. D., D. TSURU et K. T. YASUNOBU, 1964. *Bacillus subtilis* neutral proteinase. I a zinc enzyme of high specific activity. The journal of Biol. Chem., vol. 239, n° 11 November.
- 57°. Mc KELLAR, R.C et D. NICHOLS-NELSON, 1984. Acid-coagulation of evaporated milk by a coculture of *Enterococcus faecium* and *B. subtilis*. Journal of food protection, vol. 47 (11), 853-855.
- 58°. MILLET, J., 1969. Etude de la mégatéropeptidase, protéase exocellulaire de *Bacillus mégatérium*. I. Purification et propriétés générales. Bull. Soc. Chim. Biol., 51, (1), 61-67.
- 59°. MILLET, J. et R. ACHER, 1969. Specificité de la mégatéropeptidase: une aminoendopeptidase à caractère hydrophobe. European J. Biochem., 9, 456-462.

- 60°. MILLET, J. et J.P. AUBERT, 1969. Etude de la mégatéropeptidase, protéase exocellulaire de *B. Mégatérium*. III Biosynthèse et rôle physiologique. Annales de l'Institut Pasteur. T. 117, 461-473.
- 61°. MILLET, J., M. LARRIBE et J. P. AUBERT, 1976. Mutant thermosensible de *B. subtilis* affecté dans la sporulation et la seryl protéase extracellulaire. Biochimie, Tome 58 n° 1-2, 109-117.
- 62°. MILLET, J. et J. GREGOIRE, 1979. Characterization of an inhibitor of the intracellular protease from *Bacillus subtilis*. Biochimie, 61, 385-391.
- 63°. MONTVILLE, T. J., 1983. Dual-substrate plate diffusion assay for proteases. Applied and environmental microbiology, Jan., 200-204.
- 64°. MSADEK, T., F. KUNST, D. HENNER, A. KLIER, G. RAPOPORT et R. DEDONDER, 1990. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: Expression of the regulatory genes and analysis of mutations in deg S and deg U. Journal of Bacteriol. vol. 172 (2) Feb, 824-834.
- 65°. MSADEK, T., F. KUNST, A. KLIER et G. RAPOPORT, 1991. Deg S-deg U and Com P-Com A modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene deg Q. Journal of Bacteriol. vol. 173 n° 7, Apr, 2366-2377.
- 66°. MSADEK, T., F. KUNST et G. RAPOPORT, 1993. Two-component regulatory system in *B. subtilis* and other Gram-positive bacteria: (SONENSHEIN, A. L., J. A. HOCH, and R. LOSICK) 729-745.

- 67°. MUKAI, K., M. KAWATA et T. TANAKA, 1990. Isolation and phosphorylation of the *B. subtilis* deg S and deg U genes products. J. Biol. Chem. vol. 265 (32), Nov, 2000-2006.
- 68°. MUKAI, K., M. KAWATA et T. TANAKA, 1992. stabilization of phosphorylated *B. subtilis* Deg U by Deg R. Journal of Bacteriol. Dec., vol. 174 (24), 7954-7962.
- 69°. MURAO, S., K. OHKUNI, M. NAGAO, K. ODA et T. SHIN, 1988. A novel thermostable, S.PI (pepstatin Ac)-insensitive acid proteinase from thermophilic *Bacillus* novosp strain MN-32. Agric. Biol. Chem., 52 (6) 1629-1631.
- 70°. NAKADAI, T. et S. NASUNO, 1977. The action of acid proteinase from *Aspergillus oryzae* on soybean proteins. Agric. Biol. Chem., 41 (2), 409-410.
- 71°. NAGAMI, Y. et T. TANAKA, 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of DNA-fragment from *Bacillus natto* that enhances production of extracellular proteases and Levansucrase in *B. subtilis*. J. Bacteriol. vol., 166, (1), Apr, 20-28.
- 72°. PERO, J. et A. SLOMA, 1993. Proteases. In *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: (SONENSHEIN, A. L., J. A. HOCH and R. LOSICK), 729-745.
- 73°. PRIEST, F. G., 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol. Rev. vol. 41, (3), Sept., 711-753.
- 74°. PRIEST, F. G. et GRIGOROVA, 1990. Method for studying the ecology of endospore-forming bacteria. Methods in Microbiology vol. 22, 565-591.

- 75°. PROTH, J., A. MOUREY et G. KILBERTUS, 1976. Milieux à base de poudre de muscle pour la numération des microorganismes protéolytiques. *Separatum experientia* 32, 1524-1525.
- 76°. ROWE, M.T et A. GILMOUR, 1983. Nutritional factors affecting extracellular enzym production by *Pseudomonas fluorescens* B52. In temperature controls the production of a single extracellular protease by *P. fluorescens* MFO in the presence of various inducers. *Res. Microbiol.*, 1993, 144, 617-625.
- 77°. SANCHEZ-SALAS, J. L. et P. SETLOW, 1993. Proteolytic processing of the protease which initiates degradation of small acid soluble proteins during germination of *B. subtilis* spores. *J. Bacteriol.* vol. 175, May, 2568-2577.
- 78°. SCHILL, W. B. et G. F. B. SCHUMACHER, 1972. Radial diffusion in gel for microdetermination of enzymes. *Anal. Biochem.* vol., 46 (2) apr., 502-532.
- 79°. SCHIMOGAKI, H., K. TAKEUCHI, T. NISHINO, M. OHDERA, T. KUDO, K. OHBA, M. IWAMA et M. IRIE, 1991. Purification and properties of a novel surface-active agent and alkaline-resistant protease from *Bacillus* sp. *y. Agric. Biol. Chem.*, 55 (9), 2251-2258.
- 80°. SHISHKOVA, E. A., T. Y. RAFALOVSKAYA, L. A. KRUTOVA, N. B. POPOVA et L. I. ORESHEHENKO, 1975. Separation and characterization of proteolytic enzymes of *Bacillus subtilis*. *Mikrobiologiya*, vol. 11, (5), 711-716.

- 81°. SLAPIKOFF, S., J. L. SPITZER et D. VACCARO, 1971. Sporulation in *Bacillus birevis*: Studies on protease and protein turnover. J. Bacteriol. vol. 106, (3) June, 739-744.
- 82°. SLOMA, A., C.E. RUDOLPH, G. A. RUFO, B. J. SULLIVAN, K. A. THERIAULT, D. ALLY et J. PERO, 1990a. Gene encoding a novel extracellular metalloprotease in *B subtilis*. J. Bacteriol. vol. 172 (2), Feb., 1024-1029.
- 83°. SLOMA, A., G. A. RUFO, C. F. RUDOLPH, B. J. SULLIVAN, K. A. THERIAULT et J. PERO, 1990b. Bacillopeptidase F of *B. subtilis*: purification of the protein and cloning of the gene. J. Bacteriol. vol. 172, March, 1470-1477.
- 84°. SLOMA, A., G. A. RUFO, K. A. THERIAULT, M. DWYER, S. A. WILSON and J. PERO, 1991. Cloning and characterization of the gene for an additional extracellular serine protease of *B. subtilis*. J. bacteriol. vol. 173, (21) Nov., 6889-6895.
- 85°. SOKOL, P. A., D. E. OHMAN et B. H. IGLEWSKI, 1979. A more sensitive plate assay for detection of protease production par *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. vol. 6, apr, 538-540.
- 86°. STACKEBRANDT, E., W. LUDWING; M. WEIZENEGGER; S. DORN ; T. H. MCGILL; G. E. FOX; C. R. WOESE; W. SHUBERT et K. H. SCHLEIFFER, 1987. Comparative 16SrRNA oligonucleotide analysis and muerin types of round-spore forming bacilli and non-spore-forming relatives in ALEXANDER, B. et F. G. PRIEST, (1990) (1).

- 87°. STOEVA, S. et T. KLEINSCHMIDT, 1989. Proteolytic specificity of the neutral zinc proteinase from *Bacillus mesentericus* strain 76 determined by digestion of an  $\alpha$ -globin chain. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, vol. 370, 1139-1143.
- 88°. STRAUCH, M. A. et J. A. HOCH, 1992. Control of post-exponential gene expression by transition state regulators in biology of bacilli: applications to industry (R. H. DOI and M. GLOUGHLIN) pp, 105-121.
- 89°. SUNG, M. H., K. TANIWAZA; Y. MASU; H. TANAKA et K. SODA, 1988. Bacterial aspartate aminotransferase: its occurrence on thermophilic bacteria and the isolation and identification of new thermophiles.
- 90°. TANAKA, T., M. KAWATA, Y. NAGAMI et H. UCHIYAMA, 1987. Prt R enhances the mRNA level of the *B. subtilis* extracellular protease. *J. Bacteriol.* vol. 169 (7), July, 3044-3050.
- 91°. TANAKA, T. et M. KAWATA, 1988. Cloning and characterization of *B. subtilis* iep which has positive and negative effects on production of extracellular protease. *J. Bacteriol.* vol., 170 (8), Aug. 3593-3600.
- 92°. TANAKA, T., M. KAWATA et K. MUKAI, 1991. Altered phosphorylation of *B. subtilis* Deg U caused by single aminoacid changes in Deg S. *J. Bacteriol.* vol. 173, (17) Sept., 5507-5517.
- 93°. THANH, N.T., 1978. Untersuchungen zur regulation der amylase bildung durch *penicillium citrium* and der proteasebildung durch *Bacillus cereus* var *mycoides*. Dissertation.

- 94°. TSUGHIYA, K. et T. KUMURA, 1984. Decrease of protease activity by the addition of glucose to the culture of cephalosporium sp. J. Ferment. Technol., vol. 62 (1), 35-39.
- 95°. TSURU, D., 1962a. Inhibitor effect of glycine on the production of amylase and proteinase by *B. subtilis*. Part I: Effect of glycine and glycine derivatives on the enzym production by the washed cells. Agric. Biol. Chem. vol. 26 (5), 288-294.
- 96°. TSURU, D., 1962b. Inhibitory effect of glycine on the production of amylase and proteinase by *B. subtilis*. Part II. Effect of glycine on the enzyme secretion. Agr. Biol. Chem. vol. 26, (5), 295-300.
- 97°. TSURU, D., 1962c. Inhibitory effect of glycine on the production of amylase and proteinase by *B. subtilis*. Part III. Glycine-induced cell lysis and inhibition of enzyme production. Agr. Biol. Chem. vol. 26 (5), 301-308.
- 98°. TSURU, D. et J. FUKOMOTO, 1963a. Inhibitory effect of glycine on the production of amylase and proteinase by *B. subtilis*. Part IV. Comparison in cytological effect of glycine on glycine sensitive and resistant strains. Agr. Biol. Chem. vol. 27 (4), 279-285.
- 99°. TSURU, D. et J. FUKOMOTO, 1963b. Inhibitory effect of glycine on the production of amylase and proteinase by *B. subtilis*. Part V. Further investigation on the mecanisme of glycine inhibition. Agr. Biol. Chem. vol. 27 (4), 286-290.

- 100°. TSURU, D., J. D. McCONN et K. T. YASUNOBU, 1964. *B. subtilis* neutral protease, a zinc enzym of high activity. Bioch. Biophys. Res. Com. vol. 15, (4), 367-371.
- 101°. TSURU, D., H. KIRA, T. YAMAMOTO et J. FUKOMOTO, 1966. Studies on bacterial protease. Part XIV. Zinc as an essential metal component of neutral protease of *B. subtilis* var *amylosacchariticus*. Agr. Biol. Chem. vol. 30 (9), 856-862.
- 102°. TSURU, D., H. KIRA, T. YAMAMOTO et J. FUKOMOTO, 1967. Studies on bacterial protease. Part XVIII. Proteolytic specificity of neutral protease of *B. subtilis* var *amylosacchariticus*. Agr. Biol. Chem. vol. 31 (6), 718-723.
- 103°. TURGEON, S. L., C. BARD et S. F. GAUTHIER, 1991. Comparaison de trois méthodes pour la mesure du degré d'hydrolyse de protéines laitières modifiées enzymatiquement. Can. inst. Sci. Technol. J. vol. 24 (1/2), 14-18.
- 104°. VAN DER BURG, B., H. G. ENEQUIST, M. VAN DER HAAR, V. G. H. EIJSINK, B. K. STULP et G. VENEMA, 1991. A highly thermostable neutral protease from *Bacillus caldolyticus*: cloning and expression of the gene in *B. subtilis* and characterization of the gene product. J. Bacteriol. vol. 173, (13), July, 4107-4115.
- 105°. VUILLEMARD, J. C., J. AMIOT et S. GAUTHIER, 1985. Evaluation de l'activité protéolytique de bactéries par une technique de diffusion sur plaque. Microbiol. Ali. Nut. vol. 3, 327-332.

- 106°. VUILLEMARD, J. C., J. GOULET, J. AMIOT, M. A. VIJAYALAKSHMI et S. TERRE, 1988. Continuous production of small peptides from milk proteins by extracellular protease of free and immobilized *Serratia marcescens* cells. *Enzym. Microbiol. Technol.* vol. 10, 2-8.
- 107°. WANG, H. L., J. B. VESPA et C. W. HESSELTINE, 1974. Acid protease production by fungi used in soybean food fermentation. *App. Microbiol.* vol. 27 (5), May, 906-911.
- 108°. WANG, L. F., R. BRÜCKNER et R. H. DOI, 1989. Construction of a *B. subtilis* mutant-deficient in three extracellular protease. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 35, 487-492.
- 109°. WANG, L. F. et R. H. DOI, 1990. Complex character of *prfA*, a novel gene regulating expression of extracellular protein gene of *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* vol. 172 (4), Apr., 1939-1947.
- 110°. WEAVER, L. H., W. R. KESTER, L. F. TENNEYCK et B. W. MATTHEWS, 1976. The structure and stability of thermolysin. Symposium of enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. Zürich.
- 111°. WIKSTROM, M. B., 1983. Detection of microbial proteolytic activity by a cultivation plate assay in which different proteins adsorbed to a hydrophobic surface are used as substrates. *Appl. Env. Microbiol.* vol. 45 (2), Feb, 393-400.
- 112°. WISEMAN, A., 1993. Designer enzyme and cell application in industry and in environmental monitoring. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 56, 3-13.

- 113°. WONG, S. L., L. F. WANG et R. H. DOI, 1988. Cloning and nucleotide sequence of sen N, a novel *Bacillus natto* (*B. subtilis*) gene that regulates expression of extracellular protein genes. J. Gen. Microbiol. 134, 3269-3276.
- 114°. YAN, L. B. E. LANGLOIS, J. O. LEARY et C. L. HICKS, 1985. Purification and characterization of four extracellular proteases isolated from raw milk psychrotrophs. J. Dairy, Sci. 68, 1323-1336.
- 115°. YANG, M. Y., E. FERRARI et D. J. HENNER, 1984. Cloning of the neutral protease gene of *B. subtilis* and the use of the cloned gene to create an in vitro-derived deletion-mutation. J. Bacteriol. vol. 160, (1), Oct., 15-21.

ANNEXE

Inventaire des souches selon leur comportement  
sur milieu SM.

Origine	Sol	Lait	Viande
Souche ne donnant pas de culture	S2; S6; S7; S8; S17; S18; S19; S20; S21; S34; S40; S41; S42; S44; S45; S48; S49; S50; S56; S57; S60; S62; S66; S67	L4; L5; L6; L7; L10; L11; L12; L13; L14; L15; L20; L21; L25; L30; L31; L37; L41; L43; L44; L45; L49; L51	V60; V66; V67; V69; V73; V90; V92; V93; V97; V99
Souches protéolytiques	S1; S3; S4; S5; S10; S11; S12; S14; S15; S16; S22; S23; S24; S25; S27; S29; S31; S32; S33; S36; S38; S43; S47; S51; S52; S54; S55; S58; S59; S61; S63; S64; S65; S68; S69; S70	L1; L2; L8; L16; L17; L23; L24; L26; L27; L28; L29; L36; L38; L39; L42; L46; L47; L48; L52; L54; L58	V60; V61; V63; V68; V70; V76; V89; V101; V102
Souches non protéolytiques	S9; S13; S26; S28; S30; S35; S37; S39; S46; S53	L3; L9; L18; L19; L32; L33; L34; L35; L40; L50; L53; L55; L56; L57	V59; V64; V65; V71; V72; V74; V75; V77; V78; V79; V80; V81; V82; V83; V84; V85; V86; V87; V88; V90; V94; V95; V96; V98; V100; V103; V104; V105; V106; V107; V108

Pouvoir protéolytique des souches: selection globale et selection finale.

Selection globale			
Souches	a/b	Souches	a/b
S1	15	S69	4,25
S3	13,5	S70	25
S4	9,25	L1	2,66
S5	15	L2	5
S10	4,88	L8	3
S11	7,33	L16	12,5
S12	16,66	L17	15
S14	9,25	L23	12
S15	7,75	L24	5,5
S16	9,29	L26	5
S22	8	L27	9,66
S23	4,75	L28	8,33
S24	5,73	L29	12,5
S25	9,58	L36	4,15
S27	11	L38	11
S29	7,33	L39	9
S31	13,61	L42	10
S32	11,46	L46	3,33
S33	20	L47	20
S36	20,08	L48	24
S43	3,5	L52	2
S47	15	L54	18,5
S51	2	L58	4,66
S52	10	V59	7,5
S54	5	V61	17
S55	10	V63	13
S58	10,66	V68	2,6
S59	13	V70	3,5
S61	8,02	V76	3,12
S63	4,66	V89	2,75
S64	11,24	V101	3,2
S65	16	V102	20
S68	7,5		

Selection finale		
Souches	a/b	$\bar{a/b}$
S70	24	24,5
L48	21	22,5
S33	21	20,5
L47	21	20,5
V102	18	19
S38	17,5	18,75
L54	18	18,25
S12	16,66	16,66
V61	15,5	16,25
S5	17	16
S65	16	16
S1	15	15
L17	14,25	14,25
S47	14,25	14,25
S31	13,82	13,82
V63	13,5	13,5
S59	13,5	13,25
L29	13	13
S3	12,75	12,75
L16	12,75	12,75
L23	12,5	12,5
L38	11,75	11,75
S32	11,73	11,73
S27	10,75	10,75
S64	10,62	10,62

Production de protéase sur milieu SM par les souches  
S70, S33, L48, L47.

Souches Temps (heures)	S70		S33		L48		L47	
	UA/ml	AR (%)						
4	0,043	46,73	0,015	16,30	0,000	0,00	0,000	0,00
8	0,048	52,17	0,038	41,30	0,000	0,00	0,007	7,60
12	0,061	66,30	0,044	47,82	0,000	0,00	0,005	5,43
16	0,086	93,47	0,052	56,52	0,005	5,43	0,009	9,78
20	0,092	100	0,060	65,21	0,009	9,78	0,013	14,13
24	0,088	95,65	0,055	59,78	0,005	5,43	0,009	9,78

Production de protéase de la souche S70 dans le milieu  
minimal à base d'hydrolysate de caséine et de peptone.

Souches Temps (heures)	SM		M (HC)		M (P)	
	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)
4	0,015	15,62	0,011	11,45	0,034	35,41
8	0,023	23,95	0,017	17,70	0,059	61,45
12	0,034	35,41	0,019	19,79	0,061	63,54
16	0,060	62,50	0,021	21,87	0,069	71,87
20	0,080	83,33	0,026	27,08	0,072	75,00
24	0,096	100	0,030	31,25	0,080	83,33

Production de protéase dans le milieu minimal à base des acides aminés par la souche S70.

Temps (heures)	SM		M(Ala)		M(Gly)		M(Arg)		M(Leu)		M(Glu)	
	UA/ml	AR(%)	UA/ml	AR(%)	UA/ml	AR(%)	UA/ml	AR(%)	UA/ml	AR(%)	UA/ml	AR(%)
4	0,023	30,36	0,055	72,36	0,038	50	0,002	2,63	0,003	3,94	0,001	1,31
8	0,032	42,10	0,080	105,26	0,044	57,89	0,002	2,63	0,01	13,15	0,001	1,31
12	0,044	57,89	0,070	94,73	0,084	110,52	0,007	9,21	0,021	27,63	0,001	1,31
16	0,066	85,52	0,065	85,52	0,072	94,73	0,021	27,63	0,023	30,26	0,001	1,31
20	0,076	100	0,057	75	0,061	80,26	0,061	80,26	0,023	30,26	0,04	5,26
24	0,069	90,78	0,071	93,42	0,063	82,89	0,065	85,52	0,019	25,00	0,013	17,10

Production de protéase dans le milieu SM à deux concentrations en lait et dans le même milieu additionné d'hydrolysats de caséine par la souche S70.

Temps (heures)	SM(0,5% lait)		SM(1% lait)		SM + HC	
	UA/ml	AR(%)	UA/ml	AR(%)	UA/ml	AR(%)
4	0,017	20,73	0,017	20,73	0,013	15,85
8	0,028	34,14	0,026	31,70	0,017	20,73
12	0,059	71,95	0,053	64,63	0,024	29,26
16	0,071	86,50	0,072	87,80	0,032	39,02
20	0,082	100	0,092	112,19	0,038	46,34
24	0,080	97,56	0,094	114,63	0,049	59,75

Production de protéase dans le milieu SM auquel l'hydrolysate de caséine est ajouté à T7 et T13 par la souche S70.

Milieux Temps (heures)	SM		SM + HC (T7)		SM+HC (T13)	
	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)
3	0,015	18,75	0,019	23,75	0,015	18,75
6	0,023	28,75	0,034	42,50	0,023	28,75
9	0,057	71,25	0,021	26,25	0,049	61,25
12	0,065	81,25	0,023	28,75	0,061	76,25
15	0,069	86,25	0,028	35,00	0,061	76,25
18	0,072	90,00	0,036	45,00	0,064	80,00
24	0,080	100	0,038	47,50	0,064	80,00

Production de protéase dans le milieu SM additionné du mélange de onze acides aminés par la souche S70.

Milieux Temps (heures)	SM		SM + M1		SM + M2	
	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)
4	0,009	10,22	0,005	5,68	0,003	3,40
8	0,026	29,54	0,011	12,50	0,005	5,68
12	0,049	55,58	0,032	36,36	0,011	12,54
16	0,057	64,77	0,034	38,63	0,015	17,04
20	0,064	72,72	0,038	43,18	0,021	23,86
24	0,088	100	0,080	90,90	0,038	43,18

Production de protéase dans le milieu SM additionné des acides aminés (Ala et Gly) par la souche S70.

Milieux Temps (heures)	SM		SM + Ala		SM + Gly	
	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)
4	0,005	5,95	0,015	17,85	0,019	22,61
8	0,015	17,85	0,053	63,09	0,040	47,61
12	0,038	45,23	0,069	82,14	0,055	65,47
16	0,059	70,23	0,084	100	0,080	95,23
20	0,069	82,12	0,088	104,76	0,084	100
24	0,084	100	0,084	100	0,084	100

Production de protéase dans le milieu SM additionné des acides aminés (Val et Tyr) par la souche S70.

Milieux Temps (heures)	SM		SM + Val		SM + Tyr	
	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)
4	0,034	38,63	0,030	34,09	0,019	21,59
8	0,061	69,31	0,040	45,45	0,030	34,09
12	0,072	81,81	0,061	69,31	0,038	43,18
16	0,076	86,36	0,069	78,40	0,042	47,72
20	0,084	95,45	0,076	86,36	0,049	55,68
24	0,088	100	0,076	86,36	0,105	119,31

Production de protéase dans le milieu SM additionné des acides aminés (Leu et Cys) par la souche S70.

Milieux Temps (heures)	SM		SM + Leu		SM + Cys	
	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)
4	0,019	23,75	0,019	23,75	0,003	3,75
8	0,046	57,52	0,049	61,25	0,007	8,75
12	0,061	76,25	0,057	71,25	0,007	8,75
16	0,065	81,25	0,084	105	0,011	12,50
20	0,080	100	0,099	123,75	0,015	17,04
24	0,065	81,25	0,088	110	0,023	28,75

Production de protéase dans le milieu SM additionné des acides aminés (Arg et Trp) par la souche S70.

Milieux Temps (heures)	SM		SM + Arg		SM + Trp	
	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)
4	0,021	29,16	0,030	41,66	0,015	20,83
8	0,042	58,33	0,067	93,05	0,019	26,38
12	0,057	79,16	0,072	100	0,028	38,88
16	0,065	90,27	0,084	116,66	0,042	58,33
20	0,067	93,05	0,092	127,77	0,046	63,88
24	0,072	100	0,095	133,33	0,067	93,05

Production de protéase dans le milieu SM additionné des acides aminés (Asp, Glu et Phe) par la souche S70.

Milieux Temps (heures)	SM		SM + Asp		SM + Glu		SM + Phe	
	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)
4	0,017	20,23	0,011	13,09	0,017	20,23	0,021	25,00
8	0,042	50,00	0,032	38,09	0,042	50,00	0,042	50,00
12	0,053	63,09	0,055	65,47	0,059	70,23	0,069	82,14
16	0,057	67,85	0,92	109,52	0,065	77,38	0,080	95,23
20	0,072	85,71	0,120	142,85	0,072	86,71	0,084	100
24	0,084	100	0,124	147,61	0,086	102,38	0,080	100

Production de protéase dans le milieu SM additionné de cystéine à différentes concentrations, par la souche S70.

Milieux Temps (heures)	SM		SM+Cys (0,1%)		SM+Cys (1%)		SM+Cys (2%)	
	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)
4	0,023	26,13	0,007	7,95	0,001	1,13	0,001	1,13
8	0,038	43,18	0,007	8,75	0,005	5,68	0,001	1,13
12	0,044	50,00	0,011	12,50	0,005	5,68	0,003	3,40
16	0,049	55,68	0,023	28,75	0,007	7,95	0,003	3,40
20	0,072	81,81	0,030	37,50	0,009	10,22	0,003	3,40
24	0,088	100	0,061	76,25	0,011	12,50	0,003	3,40

Production de protéase dans le milieu SM auquel la cystéine est ajoutée à T7 et T13, par la souche S70.

Milieux Temps (heures)	SM		SM+Cys (T7)		SM+Cys (T13)	
	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)
3	0,013	16,25	0,019	23,75	0,015	18,75
6	0,023	28,75	0,028	35,00	0,023	28,75
9	0,030	37,50	0,019	23,75	0,036	45,00
12	0,040	50,00	0,015	18,75	0,049	61,25
15	0,049	61,25	0,013	16,25	0,052	65,00
18	0,069	86,25	0,011	13,75	0,051	63,75
24	0,080	100	0,007	8,75	0,048	60,00

Production de protéase dans le milieu SM additionné des combinaisons de deux acides aminés, par la souche S70.

Milieux Temps (heures)	SM		SM+(gs+Arg)		SM+(cys+Asp)	
	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)
4	0,015	16,30	0,003	3,26	0,001	1,08
8	0,036	39,30	0,003	3,26	0,003	3,26
12	0,049	53,26	0,003	3,26	0,003	3,26
16	0,065	70,65	0,005	5,43	0,005	5,43
20	0,092	100	0,007	7,60	0,007	7,60
24	0,089	96,73	0,009	9,76	0,015	16,30

Production de protéase dans le milieu SM additionné des  
 Combinaisons de trois acides aminés, par la souche S70.

Milieux Temps (heures)	SM		SM + C <sub>1</sub>		SM + C <sub>2</sub>		SM + C <sub>3</sub>	
	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)	UA/ml	AR (%)
4	0,019	23,75	0,011	13,75	0,006	6,25	0,011	13,75
8	0,030	37,50	0,015	18,75	0,009	11,25	0,019	23,75
12	0,046	57,50	0,061	76,25	0,015	18,75	0,030	37,50
16	0,057	71,25	0,084	105	0,021	26,25	0,044	55,00
20	0,065	81,25	0,192	115	0,042	52,50	0,061	76,25
24	0,080	100	0,107	133,75	0,046	57,50	0,072	90,00