

CARACTERISTIQUES DE LA METALLOPROTEASE PRODUITE PAR *ASPERGILLUS ORYZAE* SUR DECHETS D'ORANGES

Reçu le 13/04/2011– Accepté le 28/05/2012

BENKAHOUL M¹., MECHAKRA A¹., BOUKHALFA H¹.

1,2,3 Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri, Constantine, Algérie.
e-mail : malika1174@yahoo.fr

Résumé

La protéase neutre (métalloprotéase) est produite par une moisissure mésophile (*Aspergillus oryzae*) par fermentation d'un milieu à base de déchets d'oranges, enrichi par le « corn-steep liquor » et tamponné à pH 6 préalablement optimisé. Une activité protéasique de 2635 U et une biomasse de 15,42 g sont obtenues au bout de 52 heures de culture. La protéase est séparée des protéines non enzymatiques par une précipitation par le sulfate d'ammonium et une chromatographie sur Sephacryl S-200. La fraction active issue de cette dernière technique correspond à un rendement de 40% et un degré de purification de 16. Les caractéristiques de la protéase partiellement purifiée montrent qu'il s'agit d'une métalloenzyme (inhibition par l'EDTA) avec une constante d'inhibition de 25×10^{-4} M. Son pH optimal est de 7 et sa température optimale de 40°C avec un temps de demi-vie de 8 minutes à 60°C. L'enzyme est également inhibée par le fer et le mercure. Elle est activée par le cobalt, le calcium, le manganèse et le nickel.

Mots clés : Métalloprotéase, *Aspergillus oryzae*, déchets d'oranges, purification.

Abstract

The optimized medium composed by orange waste, « corn-steep liquor », pH 6, was used for the production of neutral protease by *Aspergillus oryzae*. Maximum protease production 2635U and biomass 15,42g obtained after 52h of fermentation. The partial purification of the protease by precipitation by ammonium sulphate and chromatography S-200 showed 40% yield and 16 fold purification. The active fraction was metalloprotease, this result was confirmed by the inhibition with EDTA ($K_i = 25 \times 10^{-4}$ M). The enzyme partial purified showed best activity at 40°C, pH 7 and $T_{1/2} = 8$ min at 60°C. Proteolytic activity was significantly enhanced by Co^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} and Ni^{2+} . Fe^{2+} and Hg^{2+} caused loss of proteolytic activity

Keywords : Neutral protease, *Aspergillus oryzae*, orange waste, purification.

ملخص

تم انتاج البروتياز المعتدل من طرف *Aspergillus oryzae* بتخمير وسط بيئي مكون من بقايا البرتقال ، أضيف الى هذا الوسط القاعدي الـ « corn-steep liquor » و عدل الوسط الى pH 6 سجل بعد 52 ساعة من التخمير نشاط انزيمي قدر بـ 2635 وحدة وقدّر الوزن الحيوي للميسيليوم بـ 15.42 غ . تم عزل البروتياز باستعمال الترسيب بكبريتات الأمونيوم متبوع بـ كروماتوغرافيا Sephacryl S-200 حيث تحصلنا على مردود 40% ودرجة نقاوة 16 . خصائص هذا الانزيم المنقى جزئيا يبين أنه انزيم Métalloprotéase (التثبيط بالـ EDTA) حيث تم التسجيل ثابت التثبيط 25×10^{-4} M . أحسن نشاط سجل في درجة حرارة 40°C و pH7 . يفقد الانزيم 50% من نشاطه في 60°C خلال 8 دقائق . يثبط هذا الانزيم كذلك بكل من الحديد و الزئبق وينشط بكل من الكوبالت ، الكالسيوم ، المنغنيز ، المغنسيوم و النيكل .

الكلمات المفتاحية: البروتياز المعتدل, بقايا البرتقال, *Aspergillus oryzae*

Les protéases font parti des plus importantes enzymes industrielles, elles sont utilisées depuis des centaines d'années, d'abord dans la coagulation du lait pour la fabrication du fromage, les enzymes protéolytiques catalysent les réactions dont les substrats sont des molécules protéiques en peptides et acides aminés. Ces enzymes regroupent un large groupe de protéases, différents les uns des autres par leurs propriétés : spécificité vis-à-vis du substrat, le site actif, le mécanisme catalytique, pH et température optimales et stabilité.

La spécificité des enzymes protéolytiques est gouvernée par la nature des acides aminés et des groupes fonctionnels (aromatique ; aliphatique et sulfures) se trouvant dans leurs structures [1]. On trouve les protéases chez tous les êtres vivants où elles jouent un rôle catalyseur dans les réactions métaboliques dans les différentes conditions physiologiques [2]. Depuis deux décennies, l'emploi des enzymes connaît un succès remarquable et entrouvre des perspectives nouvelles. En effet, certaines industries n'ont vu le jour que grâce à la mise sur le marché d'enzymes purifiées. En 1998, le marché mondial des enzymes industrielles dépasse 1,5 milliard de dollars et enregistre une croissance annuelle de 6,5% [3]. D'après BLAIN [4] les protéases représentent à elles seules 50% du chiffre d'affaire du marché mondial des enzymes industrielles.

Ces enzymes sont utilisées dans de nombreuses filières industrielles et analytiques; elles exigent donc une connaissance complète de leurs propriétés physico-chimiques afin de mieux cibler leurs domaines d'application. De ce fait, notre étude a été axée sur la purification et l'étude des caractéristiques de la protéase neutre d'*Aspergillus oryzae* produite sur un milieu préparé à partir d'un milieu à moindre coût, préparé à base de déchets d'oranges.

MATERIEL ET METHODES

Mesure de l'activité protéolytique

L'activité de la métalloprotéase neutre est mesurée à pH 7 sur caséine dans les conditions adoptées par LENOIR et AUBERGER [5] et MECHAKRA *et al.* [6]. L'unité d'activité protéolytique correspond à 1µg de tyrosine libérée par heure et par ml de milieu de culture.

Effet du pH optimal

L'influence du pH sur l'activité est déterminée dans l'intervalle de pH de 2 à 11 en utilisant les tampons citrate-phosphate et phosphate 0,1 M.

Effet de la température optimale

L'influence de la température (de 20°C à 80°C, à intervalles de 10°C) sur l'activité protéolytique est mesurée à pH 7 pendant 1h.

Stabilité thermique

Les essais de stabilité thermique sont réalisés à la température de 60°C à pH 7. La solution enzymatique est d'abord préchauffée pendant 2 min à 40°C puis portée au bain-marie à 60°C pendant un temps variant de 10 à 40 minutes. Après chauffage, les tubes sont immédiatement refroidis par immersion dans l'eau glacée. L'activité résiduelle est mesurée à pH 7.

Détermination du meilleur substrat

Différents substrats sont testés pour déterminer le meilleur substrat. Il s'agit de la caséine, l'hémoglobine, la sérum-albumine bovine (B.S.A.) et l'ovalbumine. L'activité est mesurée dans les mêmes conditions (voir mesure de l'activité enzymatique).

Détermination des paramètres cinétiques

L'étude cinétique de la métalloprotéase est étudiée grâce à la représentation de Lineweaver et Burck. La courbe $1/v = f(1/s)$ permet de déterminer les paramètres cinétiques, K_m et V_m .

Action des effecteurs

Les effecteurs testés sont l'EDTA et quelques ions métalliques (Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}). Ils sont ajoutés à la solution enzymatique à une ou plusieurs concentrations. Le mélange est laissé reposer pendant 2h à 20°C puis l'activité est mesurée dans les conditions décrites plus haut. Les inhibiteurs utilisés et leurs concentrations sont :

- Un agent chélateur, l'EDTA en solution aqueuse est ajouté aux concentrations finales de 2, 4, 6, 8 et 10 mM.
- Les ions métalliques (Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) sont ajoutés au mélange réactionnel à une concentration finale de 8 mM. Les activités résiduelles sont mesurées à pH 7 ; elles sont exprimées en p.100 d'un témoin conservé dans les conditions standard.

RESULTATS et DISCUSSION

Effet de la température

L'analyse statistique des résultats expérimentaux par la méthode ANOVA révèle que l'activité est affectée par la température. La figure 1 montre que l'activité optimale se situe à 40°C. Ce résultat est identique à celui noté par SCHOMURG et SALZMAN [7] concernant la protéase neutre produite par la même moisissure, *Aspergillus oryzae*.

La stabilité thermique

La figure 2 montre que l'activité résiduelle de l'enzyme après 10 minutes d'incubation est proche de 20% de l'activité initiale. Un taux d'inactivation de 90% est atteint en un temps voisin de 20 minutes. Ces résultats confirment les travaux de NAKADAI *et al.* [8, 9] sur la protéase neutre

d'*Aspergillus oryzae* et de LENOIR et AUBERGER [5] sur celle de *Penicillium camemberti*. Ces derniers trouvent que le traitement de l'enzyme pendant 10 minutes à 60°C permet de garder une activité résiduelle proche de 20% et perd complètement son activité au bout de 10 minutes à 70°C. Pour déterminer avec précision le temps de demie vie (où la protéase neutre perd 50% de son activité), la linéarisation de la courbe de la stabilité thermique est réalisée en traçant la courbe log v en fonction du temps sachant que :

$$(\log v = -k t / 2,3 + \log v_0)$$

- v est la vitesse de la réaction au temps t (activité résiduelle)
- v_0 est la vitesse de la réaction au temps zéro (activité initiale de l'enzyme non dénaturée)
- k est la constante de vitesse d'inactivation de la protéase

Le temps de demie vie est égal à $\ln 2 / k$. Ce temps, calculé grâce à la représentation graphique (fig.3) est égal à 8,34 minutes.

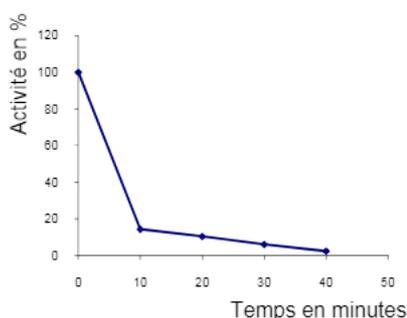


Fig.1: La stabilité thermique à 60°C

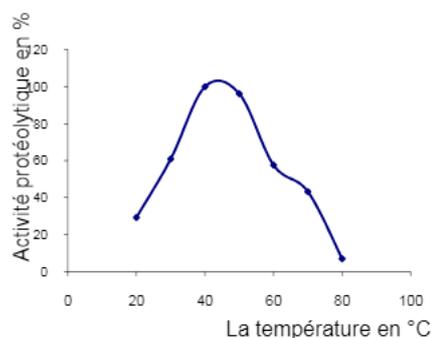


Fig.2: Effet de la température

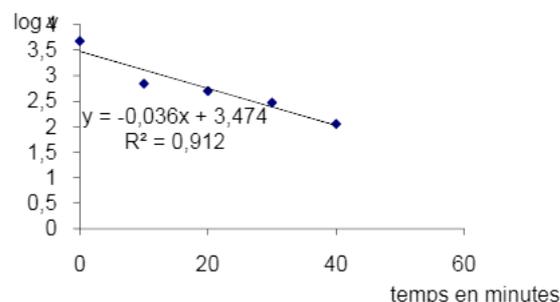


fig. 3: cinétique de la stabilité thermique

Effet du pH

La figure (4) montre que l'activité optimale de la protéase est atteinte à un pH de 7. Une étude statistique est entreprise pour tester l'effet du pH sur l'activité protéolytique. Il ressort que le pH exerce un effet significatif sur l'activité protéolytique ($F=705.41$). Ce résultat concorde avec celui noté par SCHOMBURG et SALZMAN. [7] et par NAKADAI *et al.* [8, 9] où le pH optimum de la protéase neutre d'*Aspergillus oryzae* sur la caséine lactique est de 7.

D'après la figure (4) la protéase manifeste une activité importante dans un intervalle de pH allant de 6 à 8. Ce résultat a déjà été observé chez la métalloprotéase produite par *Aspergillus oryzae* (NAKADAI *et al.*, [8, 9] et chez la métalloprotéase de *Bacillus thuringiensis* [10]. Ce même résultat est proche de celui observé chez les protéases de *streptomyces sp* qui présentent une activité significative (plus de 50%) entre pH5 et pH8 [11].

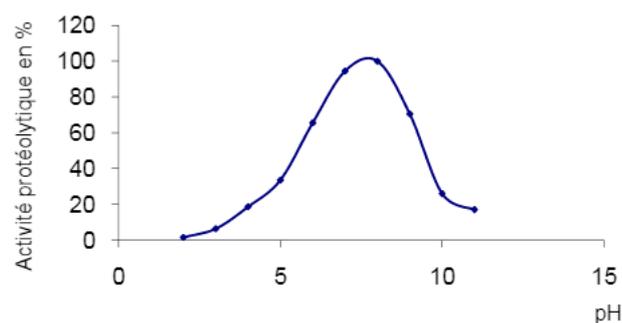


Fig 4: Effet du pH sur l'activité protéolytique

Effet de la nature du substrat sur l'activité protéolytique

Différents substrats (caséine, hémoglobine, sérumalbumine bovine et ovalbumine) sont utilisés pour l'étude de leur effet sur l'activité protéolytique. D'après la figure 5 le meilleur substrat est la caséine. La vitesse d'hydrolyse des substrats protéiques est très différente d'un substrat à l'autre, la caséine est attaquée à une vitesse

beaucoup plus grande que l'hémoglobine qui à son tour est attaquée à une vitesse supérieure à celle de la B.S.A et de l'ovalbumine. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par LENOIR et AUBERGER [5], GRIPON *et al.* [12] et CERNING *et al.* [13] pour la protéase neutre de *Penicillium camemberti* et *P. roqueforti*.

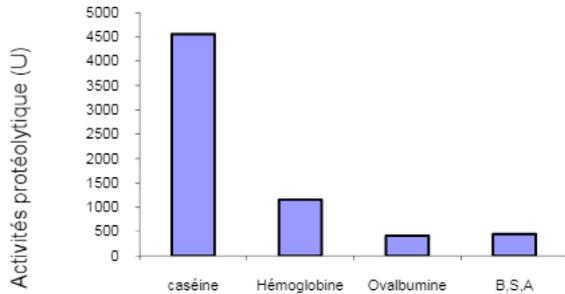


fig.17 Effet des substrats sur l'activité protéolytique

Détermination des paramètres cinétiques

Des concentrations différentes de caséine (de 0,5 à 5,5%) sont utilisées pour l'étude de l'effet de la concentration du substrat sur l'activité protéolytique. La **figure 6** fait apparaître une cinétique Michaelienne. L'activité maximale est obtenue avec une concentration en caséine égale à 35 g/l. Grâce à la représentation de Lineweaver et Burk (**fig.7**), la constante de Michaëlis mesurée est de l'ordre de 7,13 g/l et la vitesse maximale de 93,16 $\mu\text{g/ml/min}$.

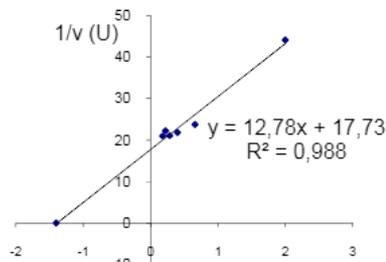


fig. 7 : cinétique (Représentation selon lineweaver et Burk)

Action des inhibiteurs

Les résultats obtenus après action de l'E.D.T.A (agent chélateur), Hg^{2+} et le Fe^{2+} sont regroupés dans le **tableau 1**. La protéase partiellement purifiée est inhibée par l'E.D.T.A, donc il s'agit bien d'une métalloprotéase. Une inhibition par 10 mM de l'E.D.T.A entraîne une inhibition de 87,5%, soit une activité protéolytique résiduelle de 12,46%, cette valeur est proche de celle notée par NAKADAI *et al.*, [8, 9] qui est de 11,8%. Elle est aussi proche aux résultats de la métalloprotéase de *streptomyces sp* qui présente une inhibition de 74% par la même concentration d'EDTA (10mM) [11]. Une inhibition complète de la métalloprotéase d'*Agkistrodon acutus* par l'EDTA a été noté par WEN-JENG WANG [15].

La métalloprotéase est complètement inhibée par la présence de 8 mM de Hg^{2+} , résultat similaire à celui rapporté dans le travail de YANG *et al.*, [16]. Le Fe^{2+} (8 mM) provoque une inhibition de près de 75%. Ces résultats confirment ceux de SCHOMBURG et SALZMAN. [7] et de FUKU et MATSUOKA [17].

Le type d'inhibition provoqué par l'EDTA est déterminé à l'aide de la représentation de Lineweaver et Burk (**fig. 8**). Celle-ci montre qu'il s'agit d'une inhibition compétitive, l'EDTA forme un complexe avec le zinc qui se trouve dans le site actif et empêche donc la fixation du substrat. Il se forme alors un complexe enzyme-inhibiteur avec une constante d'inhibition $K_i = 25 \times 10^{-4} \text{ M}$.

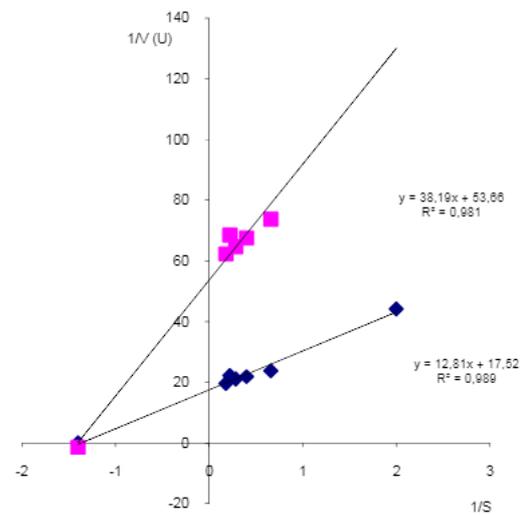


Fig. 8 : Cinétique de l'activité enzymatique en absence et en présence d'EDTA

Effet de quelques métaux activateurs

Les résultats de l'action de quelques cations sur l'activité de la protéase sont regroupés dans le **tableau 2**. On note que le cation le plus activateur est le Mn^{2+} (145%), comme déjà été noté par SCHOMBURG et SALZMAN [7] où l'activité de la métalloprotéase d'*Aspergillus oryzae* est nettement stimulée par le Mn^{2+} , aussi pour la protéase de l'extrait enzymatique brut de *streptomyces sp* qui présente une stimulation au-delà de 125% en présence de 10mM de Mn^{2+} [11].

Ce même résultat est également constaté par ALLISON *et al.*, [18] chez la protéase neutre de *Clostridium sporogenes* mise en solution avec de 8 Mm de Mn^{2+} .

Le Co^{2+} présent avec une concentration de 8 mM exerce lui aussi un effet stimulateur sur l'activité protéolytique (121,06%). Ce même résultat a été observé par LENOIR et AUBERGER [5] où une concentration de 10 mM de cobalt

active la protéase neutre de *Penicillium camemberti* de 152%. ALLISON *et al.*, [18] trouvent que l'addition de 8 mM de cobalt stimule la protéase de *Clostridium sporogenes*.

Le magnésium, le calcium et le nickel exercent également un effet stimulateur sur l'activité de la protéase neutre. Mais cette stimulation est faible, en comparaison avec celle obtenue par le cobalt et le manganèse. D'après les résultats observés, le Mn^{2+} active la métalloprotéase beaucoup plus que le Co^{2+} , ce dernier stimule cette même enzyme beaucoup plus que le Ca^{2+} , le Mg^{2+} et le Ni^{2+} . Ces mêmes constatations ont été noté par ALLISON *et al.*, [18]

CONCLUSION

La protéase neutre produite par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets d'oranges enrichi par le corn-steep liquor se caractérise par un pH optimal de 7, une température optimale de 40°C et un temps de demi-vie à 60°C de 8 minutes et 34 secondes. Parmi les quatre substrats naturels testés sur l'enzyme : BSA, ovalbumine, hémoglobine et caséine, le meilleur est la caséine. L'étude cinétique de la protéase montre qu'elle est de type michaelien, avec les paramètres suivants : $K_m = 7,13$ g/l et $V_m = 93,16$ µg/ml/mn. L'action de plusieurs effecteurs sur l'activité enzymatique montre que l'EDTA inhibe la protéase neutre d'*Aspergillus oryzae*. Il s'agit donc d'une métalloenzyme. Cette inhibition est compétitive ; l'EDTA empêche la fixation du substrat sur le site actif. Une inhibition est aussi constatée par le fer et le mercure. Par ailleurs, le manganèse, le cobalt, le calcium, le magnésium et le nickel sont des activateurs.

REFERENCES

- SUMANTHA A, LARROCHE C and PANDEY A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2). (2006); 211–220.
- SANDHYA C, SUMANTHA A, PANDEY A. Proteases. In *Enzyme Technology*, A. Pandey, C. Webb, C.R. Soccol, C. Larroche (Eds.), Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India (2004) pp. 312–325.
- DANSON M, HOUGH D. Les enzymes de l'extrême. *Biofutur.* (1998).
- BLAIN J.A. Industrial enzyme production. *The filamentous fungi*. V(1), ed. J.E. SMITH and D.R.BERRY, LONDON. (1975). pp. 193-211.
- LENOIR J, AUBERGER B. Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. II- Caractérisation d'une protéase neutre. *Lait*, 568. (1977). Pp.471-491.
- MECHAKRA A, AUBERGER B, REMEUF F, LENOIR J. (1999). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sc. Aliments*, 19. (1999). pp. 663-675.
- SCHOMBURG M et SALZMAN. (Eds.) GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung. *Enzyme Hand book* 5. (1991).
- NAKADAI T, NASUNO S and IGUCHI N. Purification and properties of neutral proteinase I from *Aspergillus oryzae*. *Agr.Biol.Chem*, 37(12), (1973). pp. 2695-2701.
- NAKADAI T, NASUNO S and IGUCHI N. Purification and properties of neutral proteinase II from *Aspergillus oryzae*. *Agr. Biol.Chem*, 37(12). (1973). pp. 2703-2708.
- ZOUARI N, JAOUA S. Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with gamma-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp- *Kurstaki* strain grown on gruel-based media. *Enzymes Microbial Technol.* 25, (1999). pp. 364-371.
- De AZERDO L.A.I, FREIRE D.M.G, SOARES R.M.A., LEITE S.G.F, COELHO R.R.R. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology* 34. (2004). pp. 354–358.
- GRIPON J. C, AUBERGER B, LENOIR J. Metalloproteases from *Penicillium caseicolum* and *Penicillium roqueforti*. Comparison of specificity and chemical characterization. *Int. Biochem.*, 12. (1980) pp.451-455.
- CERNING J, GRIPON J.C, LAMBERT G, LENOIR J (1987). Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. *Lait*. 67(1). (1987). pp. 3-39.
- WEN-JENG WANG. Purification and functional characterization of AAV1, a novel P-III metalloproteinase, from Formosan *Agkistrodon acutus* venom. *Biochimie* 89 (1). (2007). pp.105-115
- YANG JEN-KNO, SHIH ING-LUNG, TZENGE YEW-MIN, WANG SAN-LANG. Production and purification of protéase from *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzymes Microbial Technol.* 26. (2000).pp. 406-413.
- FUKE Y et MATSVOKA H. The purification and characterization of prolyl amino peptidase from *Penicillium camemberti*. *J. Dairy Sc.*, 76. (1993). pp. 2478-2484.
- ALLISON C and McFARLANE GT. Physiological and nutritional determinants of protease secretion by *Clostridium sporogenes*: characterization of six extracellular proteases. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 37. (1992). pp. 152-156.

