

**PRODUCTION ET ISOLEMENT DU COMPLEXE PROTEOLYTIQUE DE
STREPTOMYCES spp., SON APPLICATION A L'EPILAGE
ET AU CONFITAGE SIMULTANES DES PEAUX**

J.-M. GHUYSEN, G. LEGER et L. DIERICKX

Université de Liège, Laboratoires de Microbiologie générale et médicale ;
C.N.P.E.M. ; Société des Laboratoires Labaz et Centre de Recherches des
industries de transformation du cuir.

Nous proposons un procédé nouveau qui, moyennant un minimum d'opérations, d'une durée totale inférieure à 24 heures, permet d'effectuer l'épilage et le confitage des peaux en poil, destinées à être transformées en cuir.

Ce procédé est basé sur l'emploi d'enzymes appropriés, isolés de filtrats de cultures de streptomycètes et concentrés sous la forme d'une poudre d'activité stable.

La valeur du procédé est estimée en comparant entre elles les principales propriétés physiques des cuirs obtenus en soumettant simultanément aux mêmes traitements ultérieurs, deux séries de demi-peaux de taureaux épilées et confitées, d'une part, par les procédés habituels à la chaux, et d'autre part, par le procédé enzymatique proposé.

La transformation des peaux en cuir nécessite un premier ensemble d'opérations désignées par « travail de rivière ». La peau, d'abord reverdie en eau courante, est épilée par immersion dans des bains saturés en chaux et fréquemment additionnés de sulfure, puis débarassée des restes de tissus sous-cutanés par un écharnage mécanique. Elle est ensuite rendue apte à l'absorption des substances tannantes en modifiant de façon adéquate la structure chimique et physique du derme. Ces modifications, déjà entamées lors du traitement à la chaux, sont complétées, lors du confitage, au moyen d'enzymes appropriés, après avoir neutralisé l'excès de chaux libre au moyen d'acides faibles (déchauxage).

Ce travail de rivière nécessite l'immobilisation d'un matériel important pendant un minimum de trois à quatre jours. Il peut être l'occasion d'une pullulation microbienne exagérée déclenchant des phénomènes de putréfaction. Le séjour prolongé en solution très alcaline endommage les poils au point de les rendre irrécupérables et peut provoquer la dissolution de quantités importantes de collagène en même temps qu'un affaiblissement exagéré des fibres.

On a tenté (19) de substituer à ces diverses opérations un traitement enzymatique dont on pourrait contrôler l'action harmonieuse au niveau des diverses structures de la peau en poil. Aucun des procédés proposés n'a été adopté industriellement.

En effet, le coût de ces préparations est élevé, les résultats manquent de reproductibilité, la digestion du tissu dermique est souvent exagérée et inégale, le phénomène est lent. Aussi, avons-nous cherché à mettre au point une préparation enzymatique nouvelle dont l'application en tannerie serait dépourvue de ces graves inconvénients. (12)

Activités protéolytiques des filtrats de cultures de streptomycètes.

Les propriétés protéolytiques des streptomycètes sont connues depuis longtemps. La spécificité des enzymes responsables n'a toutefois été mise en évidence que récemment (5, 15, 20, 22, 24, 26). D'une part, la chromatographie sur amberlite XE-64 permet de séparer deux groupes d'enzymes actifs sur des substrats protéiniques de structures respectivement fibreu-

se et globulaire (13). D'autre part, l'adsorption sur certains sables montre que chacun de ces groupes est à son tour constitué d'enzymes distincts (9, 10). Dans un premier groupe, on distingue un principe kératinolytique actif sur la kératine et la fibrine rétractée et un principe épiderminolytique actif sur certaines fractions d'épidermine (18, 21). De même, le second groupe renferme un principe mucasique (3), actif sur la mucine sous-maxillaire de bœuf, et un principe caséinolytique, actif sur la caséine, le fibrinogène et la fibrine non rétractée. Les filtrats de culture de streptomycètes manifestent également une activité épilante (9, 11), en fait attribuable au principe épiderminolytique qui, par digestion de certains constituants des couches prékératiniques de l'épiderme, provoque le clivage de la peau au niveau dermo-épidermique (9). Quoique d'autres mécanismes de l'épilage enzymatique aient été proposés (4, 8, 14), notre interprétation, limitée au cas des enzymes de streptomycètes, est confirmée par les observations de Castermans (6) qui, traitant des lambeaux cutanés prélevés chez le lapin au moyen de préparations fortement épiderminolytiques, obtint des feuillets purement épidermiques susceptibles d'être greffés.

Devant la diversité structurale des substrats protéiniques attaqués par les enzymes de streptomycètes, nous nous sommes demandé si un choix judicieux de la souche et des conditions de culture ne pouvait fournir un complexe enzymatique dont l'action, au niveau des divers composants de la peau, assurerait l'épilage et le confitage simultanés de celle-ci.

Production du complexe enzymatique.

1) **Choix de la souche.** La répartition des activités protéolytiques des streptomycètes a été recherchée dans les filtrats de culture d'une centaine de souches isolées du sol ou d'autres substrats naturels (2). Fréquemment associées, quoiqu'il n'existe pas de corrélation étroite entre elles, ces activités s'exercent avec une fréquence décroissante sur la mucine (89%), la kératine (85%), « l'épiderme » (74%) et la caséine (66%).

Parmi ces souches, deux ont été retenues. Dénommées M I et M II, elles sont été isolées à partir d'une peau de mouton soumise à l'épilage dans une station d'échauffe.

2) **Milieu de culture.** 250 grs de plumes blanches de poule sont dissoutes dans 2,5 litres d'eau contenant 40 grs de KOH en chauffant pendant 60 minutes à 100° C. On y ajoute 500 grs de caséine alimentaire préalablement délayée dans 2,5 litres d'eau contenant 10 grs de KOH. On chauffe à 70° C jusqu'à dissolution de la caséine. On ajoute 5 l. d'eau contenant 200 grs de NaNO₃, 100 grs de K₂HPO₄ et 100 grs de MgSO₄. 7H₂O puis 1 l. d'eau contenant de 3 à 4 grs (voir plus loin) de Co (NO₃)₂. 6H₂O. On complète à un volume final de 100 l. au moyen d'eau adoucie et l'on stérilise à 120° C pendant 30 minutes.

D'autres milieux peuvent être utilisés, quoique moins aisés à préparer ou d'un prix de revient plus élevé, dans lesquels l'association hydrolysate de plumes plus caséine est remplacée par 1 % de peptone Wilson, ou 1 à 2 % de farine de soja, ou 0,5 % de kératine préparée à partir de plumes selon le procédé de Lundgren (16). Convient également, les kératoses, obtenues par précipitation à pH 4 d'une solution de kératine hydrolysée par la soude, et éventuellement associées à de la caséine. Par ailleurs, la caséine seule, de même que les extraits de levure, la farine de coton et le mycélium hydrolysé de streptomycètes, sont incapables d'assurer la production des divers enzymes recherchés.

3) **Contrôle de la souche.** Les streptomycètes sont susceptibles de variations (13, 17, 23), particulièrement s'ils sont entretenus sur milieux artificiels. Il convient, par conséquent, de tester périodiquement les activités protéolytiques d'un certain nombre de colonies en les cultivant dans le milieu liquide décrit, sur machine à agiter (26), à une vitesse de rotation de 120 tours/minute et à une température de 28° C. Lors de

TABLEAU I.

Influence du nitrate de cobalt sur la production des principes protéolytiques par *Streptomyces M I* (culture de 72 heures).

Concentration en Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	Activité(*), exprimée sous forme log $\frac{a_0}{a_t}$ (**)	sur les substrats suivants		
		Caséine	Epidermine	Kératine
0		0,230	0,218	0,340
0,03 %		0,450	0,290	0,400
0,04 %		0,710	0,400	0,550

ces essais, on vérifie le rôle effecteur joué par le cobalt et on détermine la concentration la plus effective qui sera conservée lors de la prochaine culture en cuve. A cet effet, des prélèvements sont effectués à intervalles réguliers et les activités caséinolytique, épiderminolytique (ou épilante) et kératinolytique sont dosées selon des techniques décrites ailleurs (9, 10).

4. **Conditions de culture.** Des cultures ont été réalisées en cuves de 10, 100 et 500 litres (27), à la température de 28° C, avec une aération de 1/25 volume d'air/volume de culture/minute, sous une surpression constante de 0,5 kg par cm². Le rendement est maximum après 56 à 72 heures de culture.

Isolement et concentration du complexe enzymatique.

Nous avons adapté le procédé proposé par Wallerstein et Alba (25) et Alba (1). A 500 l. de culture non filtrée, on

(*) L'activité est déterminée en incubant à 37° C une suspension ou une solution (caséine) du substrat, en présence de 20 % de filtrat de culture. La quantité de substrat détruite est déterminée par une méthode néphélométrique appropriée (9).

(**) a_0 = concentration initiale en substrat; a_t = concentration en substrat après un temps de réaction de 5' pour la caséine et l'épidermine, de 30' pour la kératine.

ajoute, en 15 minutes, 500 grs d'induline A (28, 29) préalablement dissous dans 5 l. d'eau contenant 50 grs de NaOH. Le pH est amené à 4,5 en ajoutant, en 30 minutes, 10 à 12 litres d'acide sulfurique 2 N. Le complexe protéine-induline et le mycélium sont recueillis dans une Sharpless industrielle, malaxés avec un mélange d'acide borique (1550 grs) et de bicarbonate de soude (2100 grs), étendus en couche mince et séchés 48 heures sous vide. La poudre sèche (environ 4700 grs) est broyée et homogénéisée dans un broyeur à boulets et enfin conditionnée. Aucune altération n'a été observée après deux ans de conservation à température ambiante.

Procédé d'épilage-confitage.

1) **Description.** 100 kgs de peaux, nettoyées et éventuellement débarassées du sel répandu sur leur côté chair en vue de leur stockage, sont foulonnées pendant 4 à 5 heures, à 37° C, à une vitesse de 7 tours/minute, dans 1500 l. d'une solution renfermant de 1000 à 1500 grs de NaOH. Les peaux, gonflées, rincées en eau courante et écharnées, sont à nouveau foulonnées dans les mêmes conditions de vitesse et de température pendant 10 à 15 heures, dans 100 l. d'une solution obtenue en diluant, par un tampon 0,05 M. en acide borique et en borax, une solution aqueuse à 9,4 pour 1000 de la préparation enzymatique. Cette dernière solution équivaut à la culture originale et est elle-même 0,05 M. en acide borique. On utilise cette solution, dite équivalente, diluée de 3 à 6 fois par le tampon boraté.

2) **Discussion.** a) Le procédé décrit est applicable à tout type de peau — veau, brouillard, génisse, vache, taureau — dont la valeur est représentée par le cuir à obtenir plutôt que par le poil que l'on récupère intact mais fortement emmêlé.

b) Le pré-traitement alcalin provoque la turgescence de la peau, permettant ainsi son écharnage qu'il convient d'effectuer avant de lui appliquer le traitement enzymatique. Il a aussi pour but de standardiser la sensibilité des divers types de peau, voire des diverses régions d'une peau donnée, à la préparation enzymatique, régularisant ainsi la durée du traitement et la concentration nécessaire en enzymes. La proportion de 0,36 môle de soude par kg de peau a été choisie comme étant la limite supérieure pour laquelle la quantité de soude fixée par la peau est toujours directement proportionnelle à la quantité totale de soude mise en œuvre et égale à 80 % de celle-ci. Pour des proportions en soude plus élevées, la proportionnalité n'est plus vérifiée et la quantité de soude restant libre en solution augmente de plus en plus. Enfin, la durée du pré-traitement a été dictée par la cinétique de la fixation de la soude par la peau. Ainsi, un kg de peau de brouillard foulonnée à 37° C en présence de 0,36 môle de soude, fixe après une 1/2, 1, 2, 3, 4 et 5 heures, respectivement 0,20, 0,23, 0,268, 0,276, 0,280 et 0,280 môle de soude. Après 4 à 5 heures de contact, la fixation de la soude par le collagène est maximale et a provoqué, par voie de conséquence, une intense absorption d'eau qui distend les fibres de réticuline et d'élastine, avec, par ailleurs, une dégradation aussi faible que possible de la substance dermique.

c) Le pH (8,5 à 9), la concentration et la nature des électrolytes tampons et la température (37° C) du bain enzymatique sont des conditions optimales choisies après avoir fait varier systématiquement chacun de ces facteurs. En particulier, un abaissement de la température de 10° C doit être compensé par une quantité double d'enzymes.

Valeur du procédé enzymatique.

Deux lots de dix demi-peaux de taureau ont été épilés et confités suivant le procédé décrit : pré-traitement de 5 heures avec respectivement 10 grs (lot E 10) et 15 grs (lot E 15) de NaOH par kg de peau ; traitement enzymatique de 15 heures dans une solution « équivalente » diluée au 1/3.

Les vingt demi-peaux correspondantes, également divisées en deux lots de dix (lots C 10 et C 15), ont été épilées et confitées selon un procédé habituel : trempé en eau courante de 24 heures ; immersion de 24 heures dans un pelain de chaux à saturation et de Na₂S à 1/1000 ; écharnage ; déchau-

lage et confitage à 37° C dans une solution de Confilase à 1/1000.

Les quarante demi-peaux ont ensuite été réunies et simultanément pickelées et tannées de façon identique. Enfin, les principales propriétés physiques, de rupture (charge en kgs/cm² requise pour provoquer la rupture de l'échantillon), d'allongement de rupture (allongement en % de la longueur initiale au moment de la rupture), de déchirure (force, en kgs, nécessaire pour propager la déchirure de l'échantillon lorsque celle-ci a été amorcée) et de piqûre (force, en kgs/cm, requise pour arracher d'un échantillon une cheville de métal qui y est enfoncée perpendiculairement) ont été examinées pour chacun des cuirs, selon les normes internationales (7).

le refendage des peaux par exemple, et exige, durant toute son application, une température constante de 37° C.

Remerciements.

L'IRSIA a bien voulu subsidier largement ces recherches. MM. Schurmans et Faber de la Tannerie St Michel, anciens établissements Versé, Anderlecht, nous ont prodigué leurs encouragements et conseils précieux et ont accepté de traiter nos peaux dans leurs établissements. Le Dr. F. van Tornhout de la Station d'Essais physiques du C.R.C., a bien voulu examiner les propriétés physiques de nos cuirs.

TABLEAU II.

Propriétés physiques de cuirs obtenus après un épilage-confitage enzymatique (lots E10 et E15) et après un épilage à la chaux et confitage à la confilase (lots C10 et C15).

Echantillon	Charge de rupture Kg/cm ²			Allongement de rupture (%)			Force de déchirure (Kg)			Arrachement à la piqûre (Kg/cm)		
	M(*)	ES(**)	t(***)	M	ES	t	M	ES	t	M	ES	t
E10	326	10,65		61	2,16		57,5	4,22		140,5	7,2	
C10			6,6			1,51			3,47			2,56
	236	11,3		65,8	1,81		46,4	3,65		117,3	5,65	
E15	317	18,60		59,6	3		51	1,65		138	4,8	
C15			5,52			1,21			4,2			4,27
	226	10,50		64,6	2,1		44	1,4		116	1,5	

(*) Moyenne.
 (**) Erreur Standard.
 (***) Valeur du test en t.

Les résultats (tableau II) sont exprimés par la valeur moyenne et l'erreur standard correspondante, obtenues lors de l'application de chacun des quatre tests au quatre lots de cuir. De plus, le niveau de signification des différences observées entre les moyennes des lots E 10 et C 10, d'une part, et entre les moyennes des lots E 15 et C 15, d'autre part, a été évalué par le calcul de la valeur de t obtenue en divisant la différence des deux moyennes considérées par l'erreur standard correspondante (test en t). Rappelons que pour un degré de liberté égal à 9, une valeur de t égale à 1,83, 2,26 et 3,25 indique respectivement qu'il y a 90%, 95 % et 99 % de chances pour que la différence des traitements subits par chacun des deux lots de cuir considérés, engendre une propriété physique significativement différente.

Comparé au procédé classique d'épilage-confitage, le procédé enzymatique augmente donc de façon très significative la résistance du cuir finalement obtenu, à la déchirure (15 à 20 %), à la piqûre (15 à 20 %) et à la rupture (30 %) avec, dans ce dernier cas, un pourcentage d'allongement inchangé (niveau de probabilité supérieur à 10 %). Enfin, aucune différence ne peut être observée selon la quantité de soude, 10 ou 15 grs par kg de peau, utilisée lors du pré-traitement.

Conclusions.

L'épilage-confitage simultané des peaux par les enzymes protéolytiques des streptomycètes permet de réduire considérablement le « travail de rivière ». Dans le cas des peaux de taureau tout au moins, il améliore les qualités physiques des cuirs obtenus. Lors de l'exemple d'application donné ci-haut (traitement par une solution « équivalente » diluée au 1/3), le prix de revient de la préparation enzymatique, compte tenu uniquement des matières premières intervenant dans sa fabrication, est de 20 centimes par kg de peaux à traiter. Ce procédé suscite cependant certains problèmes d'ordre technique,

BIBLIOGRAPHIE.

- (1) Alba R.T., Isolation of enzymes from aqueous solution with lignin and gelatin and product obtained thereby. United States Patent Office, October 19, 1948, n° 2,452.000.
- (2) Bergamini L., Ghuysen J.-M. et Welsch M., L'activité antibiotique du type actinomycétine chez les *Streptomyces*. C.R. Soc. Biol., 1954, 148, 733-736.
- (3) Bergamini L., Recherches sur les mucases des *Streptomyces*. Rev. belge Path. Méd. exp., 1954, 23, 370-383.
- (4) Billingham M.A. and Reynolds J., Transplantation Studies on Sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspensions. Brit. J. of Plastic Surgery, 1952, 5, 25-36.
- (5) Born G.V.R., The extracellular bacteriolytic enzymes of species of *Streptomyces*. J. gen. Microbiol., 1952, 6, 344-351.
- (6) Castermans A., Obtention de greffons purement épidermiques par traitement de lambeaux cutanés avec l'actinomycétine. C.R. Soc. Biol., 1956, 150, 224-226.
- (7) Centre de Recherches du Cuir, 13, rue de Hollande, Bruxelles. Bulletin Technique n° 17, 1er février 1955.
- (8) Crewther W.G. and Lennox F.G., Enzymes of *Aspergillus oryzae*. Australian J. biol. Sci., 1953, 6, 410-427.
- (9) Ghuysen J.-M. et Léger G., Activités protéolytiques et épilante de l'actinomycétine. C.R. Soc. Biol., 1954, 148, 1694-1697.
- (10) Ghuysen J.-M., Action de l'actinomycétine sur le fibrinogène et la fibrine. C.R. Soc. Biol., 1954, 148, 1694-1697.
- (11) Ghuysen J.-M., Épilage enzymatique par des filtrats de cultures de *Streptomyces* spp. XXVIIe Congrès Intern. Chim. ind., Bruxelles, sept. 1954. C. R. 3, 760-762.
- (12) Ghuysen J.-M., Procédé d'épilage et de confitage de peaux. Brevet belge, 11 mai 1954, n° 528.781.
- (13) Ghuysen J.-M., Activités bactériolytiques de l'actino-

- mycétine de *Streptomyces albus* G. Arch. int. Physiol. Bioch., 1957, 65, 173-305.
- (14) Gillette J.M., The depilation of sheepskins with enzymes. J. Soc. Leather Trades Chem., 1953, 37, 344-353.
- (15) Jones A.S., Swallow A.J. et Webb M., The exocellular bacteriolytic system of soil *Actinomyces*. Biochim. Biophys. Acta, 1948, 2, 167-183.
- (16) Lundgren H.P., Stein A.M., Koorn V.M. and O'Connell R.A., Stability of synthetic keratin fibres in alcohol-water mixtures. J. Phys. Coll. Chem., 1948, 52, 180-206.
- (17) McCarty M., The lysis of group A hemolytic streptococci by extracellular enzymes of *Streptomyces albus*. J. exp. Med., 1952, 96, 555-568.
- (18) Mercer E.H. and Olofsson B., Sedimentation of an extract of the prekeratinous layers of skin. J. Polymer Sci., 1951, 6, 261-270.
- (19) Möllering I. und Möllering H., Verfahren der Gerbereichemie Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. M.B.H. Stuttgart, 1954, p. 43-52.
- (20) Muggleton P.W. and Webb M., The exocellular bacteriolytic system of soil *Actinomyces* Biochim. Biophys. Acta, 1952, 8, 431-440; 526-536.
- (21) Rudall K.M., The proteins of the mammalian epidermis. Adv. Protein Chem., 1952, 7, 253-290.
- (22) Tai Ty and Van Heiningen W.E., Bacteriolysis by a species of *Streptomyces*. J. gen. Microbiol. 1951, 5, 110-120.
- (23) Waksman S.A., Principles of soil microbiology, Baltimore, Williams and Wilkins Co, 1927, p. 304.
- (24) Waksman S.A., Microbial antagonisms and antibiotic substances. 2d Ed., New York. The Commonwealth Fund., 1947.
- (25) Wallerstein J.S. and Alba R.T., Process for the recovery of enzymes from aqueous solutions and product obtained thereby, United States Patent Office, Oct. 19, 1948, n° 2.452.000.
- (26) Welsch M., Phénomènes d'antibiose chez les actinomycètes. Rev. belge Pathol Méd. expérim., 1947, 28, suppl. 2, 1-315.
- (27) Welsch M. et Delcambe L., Installation pilote pour recherches microbiologiques. XXVIIe Congr. int. Chim. ind., Bruxelles, sept. 1954, 3, 803-805.
- (28) West Virginia Pulp and Paper Company, Charleston A. South Carolina. Technical Bulletin n° 108 A. The ABC Indulin.
- (29) West Virginia Pulp and Paper Company, Charleston A. South Carolina. Technical Bulletin n° 103 A. Removal and Recovery of Proteins Enzymes.

* * *

Cette communication a donné lieu aux interventions suivantes :

Questions posées par Mr. BOIDIN.

- 1) Les essais de fermentation ont-ils dépassé les 500 l.?
- 2) La culture se fait donc immergée ?

Réponses de l'auteur.

- 1) Non.
- 2) Oui.

Questions posées par Mr. VAN LAER.

- 1) L'aspect des cuirs obtenus par le procédé enzymatique est-il identique à l'aspect des cuirs obtenus par le procédé conventionnel ?
- 2) Le comportement à la teinture est-il satisfaisant ?

Réponses de l'auteur.

- 1) Dans sa forme actuelle, c'est-à-dire avec le prétraitement en foulon, le procédé permet de fabriquer des cuirs qu'on ne peut distinguer des cuirs classiques. Il appartient au maître-tanneur de choisir la basicité optimum des solutions de complexes de chrome pour éviter le creux.
- 2) A la teinture, les deux sortes de peaux se comportent identiquement.