

Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
Eau Terre Environnement

**PRODUCTION DE PROTÉASES THERMOSTABLES PAR DES
BACTÉRIES THERMOPHILES EN UTILISANT DES BOUES
D'ÉPURATION MUNICIPALES COMME SUBSTRAT**

Par

Jean Philippe Chenel
Maîtrise en Sciences de l'eau
Baccalauréat en Microbiologie et Immunologie

Thèse présentée
Pour l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Directeur de recherche :	Dr. Rajeshwar D. Tyagi, INRS-ETE
Examineurs internes :	Dr. Simon Barnabé, UQTR, INRS-ETE Dr. Guy Mercier, INRS-ETE
Examineur externe :	Dr. Marc Beauregard, UQTR

Mars 2011

© Droits réservés de Jean Philippe Chenel

À la mémoire de mon père,
Tu me manques et j'aurais aimé
Que tu sois présent...

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, M. R. D. Tyagi pour toutes les idées originales des recherches effectuées dans son laboratoire à l'Institut national de la recherche scientifique, Eau Terre Environnement. De plus, je tiens à le remercier de m'avoir offert la chance d'effectuer mes études de doctorat dans son équipe. Je remercie également les gouvernements du Canada et du Québec, en plus de l'INRS pour le soutien financier dont j'ai profité tout au long de mes études. Sans ce soutien, cela m'aurait été impossible. Je remercie ma copine, Joannie, ma famille, ma mère, ma sœur, mon père qui, malheureusement, nous a quittés l'an dernier, tu nous manques papa... Pour tout le soutien que vous m'avez fourni, dans les moments difficiles autant que dans les bons. Vous m'avez encouragé à ne jamais lâcher et à toujours poursuivre les buts que je m'étais fixés.

Ensuite, j'aimerais remercier mes ami(e)s, vous avez toujours été là pour me supporter, m'encourager, me sortir de chez moi pour aller prendre une bière! Vous avez rendu ma vie plus joyeuse! Je remercie aussi les gens de l'INRS qui, après huit longues années, sont maintenant, eux aussi, des amis, je ne vous oublie pas. Pour terminer, je tiens à remercier M. Simon Barnabé pour ses conseils judicieux et le temps qu'il m'a accordé.

Résumé

Ce projet de doctorat a pour but d'élaborer un procédé de réutilisation des boues d'épuration municipales. La culture de microorganismes industriels dans ces boues est un bon moyen d'y arriver. L'obtention de produits à valeur ajoutée, par ces microorganismes, rend le procédé économiquement viable en offrant une alternative moins coûteuse pour leur production. Plusieurs produits à valeur ajoutée sont susceptibles d'être fabriqués par ces nouveaux procédés. Les protéases thermostables en font partie. Elles peuvent être utilisées comme détergents et dans plusieurs autres domaines industriels. Par contre, l'optimisation de leurs paramètres de production et leurs paramètres opérationnels doit être effectuée afin que le produit final devienne compétitif avec les produits déjà existants. L'isolation de nouvelles souches a permis de démontrer que des souches sauvages existent dans les boues et possèdent la capacité de produire des protéases d'intérêt commercial. Deux souches de *Bacillus aestuarii* (JP1 et JP2), une souche de *Brevibacillus borstelensis* et une souche de *Bacillus licheniformis* ont été découvertes et sont de très fortes productrices de protéases. Les séquences de ces nouvelles souches seront enregistrées dans les banques de gènes afin d'offrir à la communauté scientifique mondiale l'opportunité de les comparer. La recherche effectuée sur ces quatre souches de bacilles a permis de démontrer que la température moyenne de croissance optimale de ces souches est de 55°C et le pH de croissance est de 7.0 pour *B. aestuarii* JP1 et JP2 et pour *Bv. borstelensis* alors que pour *B. licheniformis*, le pH est de 7.5. La température de stabilité des protéases est de 60°C et pour les quatre souches, le pH de stabilité est de 8.2. Les diverses expériences effectuées ont démontré que les boues d'épuration peuvent être un excellent support pour la production de protéases et parfois, ces boues d'épuration donnent de meilleurs résultats que le milieu semi-synthétique conventionnel. De plus, certaines bactéries produisent plus de protéases selon la concentration en matières en suspension des boues. Cet effet nutritionnel, favorisant la production de protéases, est exprimé différemment d'une souche à l'autre. Il a aussi été démontré que l'oxygène dissous est un facteur important autant pour la croissance bactérienne que pour la production de protéases. Par contre, l'utilisation d'oxygène pur pour l'alimentation des bioréacteurs ne semble pas être une stratégie applicable à grande échelle puisque le coût associé à l'utilisation de l'oxygène est très élevé. L'augmentation du rendement de production de protéases ne justifie pas le coût de l'oxygène utilisé. La pressurisation du bioréacteur semble plus appropriée, car le coût y étant relié est très faible. Ces résultats ont apporté une nouvelle lumière sur plusieurs questions sans réponse, mais très importantes dans le domaine de la bioconversion des boues d'épuration en produits à valeur ajoutée.

Table des matières

Résumé.....	iv
Liste des figures	viii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des équations	xiv
Liste des abréviations.....	xv
Chapitre I	
Introduction	1
Chapitre II	
Revue de littérature	3
2.1 Milieux alternatifs	3
2.1.1 Résidus végétaux.....	3
2.1.2 Résidus alimentaires.....	4
2.1.3 Eaux usées et boues d'épuration.....	6
2.2 Enzymes	10
2.2.1 Historique.....	10
2.2.2 Classes.....	10
2.2.3 Effet du pH sur l'activité	12
2.2.4 Effet de la température sur l'activité	12
2.2.5 Thermostabilité	13
2.2.6 Protéases thermostables	13
2.3 Production	14

2.3.1	Origine des protéases industrielles.....	14
2.3.2	Production actuelle.....	15
2.3.3	Applications industrielles.....	16
2.3.4	Bactéries thermophiles.....	17
2.3.5	Influence du pH.....	19
2.3.6	Concentration en oxygène dissous.....	20
2.3.7	Moyens physiques d'augmenter l'oxygène dissous.....	22
2.3.8	Formation de mousse.....	24
2.3.9	Sporulation.....	25
2.3.10	Inhibition.....	26
Chapitre III		
	Hypothèses et objectifs.....	28
Chapitre IV		
	Originalité de la recherche.....	33
Chapitre V		
	Méthodologie.....	35
5.1	Isolation et identification des souches bactériennes thermophiles.....	36
5.2	Température optimale pour la croissance bactérienne.....	37
5.3	pH optimal pour la croissance bactérienne.....	37
5.4	Température de stabilité des protéases (Lamontagne, 2004).....	38
5.5	pH de stabilité des protéases bactériennes (Lamontagne, 2004).....	38
5.6	Croissance bactérienne et production de protéases en bioréacteurs.....	38
5.7	Comparaison entre le milieu semi-synthétique et les boues d'épuration municipales.....	43
5.8	Effet de la concentration en matières en suspensions (Drouin, 2005).....	43
5.9	Effet de l'augmentation de l'oxygène dissous (OD).....	43
5.10	Effet d'une baisse de température pour augmenter l'oxygène dissous (OD).....	44
5.11	Décompte des cellules totales et spores (APHA-AWWA-WPCF, 1995)....	44

5.12	Mesure de l'activité protéolytique (Kunitz, 1947)	45
Chapitre VI		
	Résultats et discussion	47
6.1	Isolation et identification des souches bactériennes thermophiles	47
6.2	Température de croissance optimale	57
6.3	pH optimal pour la croissance bactérienne	62
6.4	Température de stabilité des protéases	63
6.5	pH de stabilité des protéases	65
6.6	Effet du milieu de culture : semi-synthétique et boues d'épuration	67
6.7	Effet de la concentration en matières en suspensions des boues d'épuration	78
6.8	Effet des différentes stratégies d'oxygénation	89
6.9	Effet d'une baisse de température pour augmenter l'oxygène dissous	98
Chapitre VII		
	Conclusion	104
Chapitre VIII		
	Recommandations	107
	Bibliographie	108
Appendice A		
	Protocole détaillé de l'extraction d'ADN	122
Appendice B		
	Solutions pour l'extraction d'ADN	125
Appendice C		
	Solutions tampons pour la caractérisation des protéases	129
Appendice D		
	Chenel et al. 2008. Copie du texte publié dans <i>Water science and technology</i> , vol. 57, no. 5, p. 639-645	131

Liste des figures

Figure		Page
1	Schéma du système de collecte et de traitement des eaux usées municipales de la Ville de Québec (gracieuseté de Josée-Anne Majeau).....	8
2	Répartition des protéases dans les différents marchés mondiaux (Données tirées de Hunter-Cevera, 1998).....	16
3	Organigramme de la séquence des expériences et les souches utilisées.....	35
4	Schéma d'un bioréacteur en acier inoxydable de 15 litres de Biogénie.	40
5	Étapes de la méthode pour l'évaluation de l'activité protéolytique et l'élaboration des blancs correspondants.	46
6	Colonies de <i>Bacillus aestuarii</i> JP1 et JP2 sur gélose nutritive.	48
7	Arbre de phylogénie de <i>Bacillus aestuarii</i> JP1.....	49
8	Arbre de phylogénie de <i>Bacillus aestuarii</i> JP2.....	50
9	Colonies de <i>Brevibacillus borstelensis</i> sur gélose nutritive.	51
10	Arbre de phylogénie de <i>Brevibacillus borstelensis</i>	52
11	Colonies de <i>Bacillus licheniformis</i> (souche isolée et ATCC 21424) sur gélose nutritive.	53

12	Arbre de phylogénie de <i>Bacillus licheniformis</i>	54
13	Arbre de phylogénie de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21424.	56
14	Arbre de phylogénie des quatre souches et de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21424.	57
15	Profils de croissance de la souche <i>B. aestuarii</i> JP1 à différentes températures (45, 55 et 65°C) dans des fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu semi-synthétique.	58
16	Profils de croissance de la souche <i>B. aestuarii</i> JP2 à différentes températures (45, 55 et 65°C) dans des fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu semi-synthétique.	59
17	Profils de croissance de la souche <i>Bv. borstelensis</i> à différentes températures (45, 55 et 65°C) dans des fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu semi-synthétique.	60
18	Profils de croissance de la souche <i>B. licheniformis</i> à différentes températures (45, 55 et 65°C) dans des fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu semi-synthétique.	61
19	Maximums des cellules totales des quatre souches bactériennes isolées des boues d'épuration municipales à différents pH (6.5, 7.0, 7.5, 8.0 et 8.5).....	63
20	Activités protéolytiques des quatre souches bactériennes à différentes températures (40, 50, 60 et 70°C). Ce sont les échantillons de 24 heures des cultures en fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu semi-synthétique qui ont été utilisés.	64
21	Activités protéolytiques des quatre souches bactériennes à différents pH (6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 et 12.0). Ce sont les échantillons de 24 heures des cultures en fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu semi-synthétique qui ont été utilisés.	66

22	Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche <i>B. aestuarii</i> JP1, en bioréacteurs, à 55°C, en milieu semi-synthétique et en boues d'épuration à 25 g/L de MES.	69
23	Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche <i>B. aestuarii</i> JP2, en bioréacteurs, à 55°C, en milieu semi-synthétique et en boues d'épuration à 25 g/L de MES.	73
24	Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche <i>Bv. borstelensis</i> , en bioréacteurs, à 55°C, en milieu semi-synthétique et en boues d'épuration à 25 g/L de MES.	76
25	Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche <i>B. licheniformis</i> , en bioréacteurs, à 55°C, en milieu semi-synthétique et en boues d'épuration à 25 g/L de MES.	77
26	Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche <i>B. aestuarii</i> JP1 à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 15, 25 et 35 g/L de MES.....	81
27	Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche <i>B. aestuarii</i> JP2 à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 15, 25 et 35 g/L de MES.....	84
28	Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche <i>Bv. borstelensis</i> à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 15, 25 et 35 g/L de MES.....	86
29	Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche <i>B. licheniformis</i> à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 15, 25 et 35 g/L de MES.....	88
30	Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche <i>B. aestuarii</i> JP1 à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 25 g/L de MES, en modes normal, pressurisé et oxygéné.	92

31	Profils d'oxygène dissous (OD) de la souche <i>B. aestuarii</i> JP1 à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 25 g/L de MES.....	93
32	Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche <i>B. aestuarii</i> JP2 à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 25 g/L de MES, en modes normal, pressurisé et oxygéné.	95
33	Profils d'oxygène dissous (OD) de la souche <i>B. aestuarii</i> JP2 à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 25 g/L de MES.....	96
34	Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche <i>B. aestuarii</i> JP1 à 40 et 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de milieu semi-synthétique.....	100
35	Profils d'oxygène dissous (OD) de la souche <i>B. aestuarii</i> JP1 à 40 et 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de milieu semi-synthétique.	101
36	Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche <i>B. aestuarii</i> JP2 à 40 et 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de milieu semi-synthétique.....	102
37	Profils d'oxygène dissous (OD) de la souche <i>B. aestuarii</i> JP2 à 40 et 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de milieu semi-synthétique.	103

Liste des tableaux

Tableau		Page
1	Données brutes sur la composition des boues d'épuration secondaires de la Station Est de la Ville de Québec (gracieuseté de Simon Barnabé et Satinder K. Brar).....	9
2	Résultats maximaux des cellules totales (ufc/mL), des spores (ufc/ml), de l'activité protéolytique (UI/mL) et les μ_{\max} avec les temps correspondants, pour les quatre souches bactériennes lors des expériences en bioréacteurs de 15 L (volume de travail de 10 L) en milieu semi-synthétique et en boues d'épuration (25 g/L).	68
3	Résultats maximaux des cellules totales (ufc/mL), des spores (ufc/ml), du pourcentage de spores (%), de l'activité protéolytique (UI/mL) et les μ_{\max} avec les temps correspondants, pour les quatre souches bactériennes lors des expériences en bioréacteurs de 15 L (volume de travail de 10 L) en boues d'épuration à 15, 25 et 35 g/L de MES.....	80
4	Résultats maximaux des cellules totales (ufc/mL), des spores (ufc/ml), du pourcentage de spores (%), de l'activité protéolytique (UI/mL) et les μ_{\max} avec les temps correspondants, pour <i>B. aestuarii</i> JP1 et JP2 lors des expériences en bioréacteurs de 15 L (volume de travail de 10 L) en boues d'épuration à 25 g/L et selon trois stratégies d'oxygénation : normal, pressurisé et oxygéné.	91
5	Résultats maximaux des cellules totales (ufc/mL), des spores (ufc/ml), du pourcentage de spores (%), de l'activité protéolytique (UI/mL) et les μ_{\max} avec les temps correspondants, pour <i>B. aestuarii</i> JP1 et JP2 lors des expériences en bioréacteurs de 15 L (volume de	

	travail de 10 L) en milieu semi-synthétique et à deux températures différentes : 40 et 55°C.	99
6	Composition des solutions de tampons TAE	127

Liste des équations

Équation	Page
1	Mesure de l'activité protéolytique 46

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP	Activité protéolytique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine Triphosphate
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BE	Boues d'épuration
BES	Boues d'épuration secondaires
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bv.</i>	<i>Brevibacillus</i>
°C	Degrés Celsius
cm	Centimètres
C-C	Carbone-Carbone
C-N	Carbone-Azote
C:N	Ratio carbone / azote
C-O	Carbone-Oxygène
CT	Cellules Totales (Total Cell Count)
DBO	Demande Biologique en Oxygène
DCO	Demande Chimique en Oxygène
E	Enzyme
E.C.	Enzyme Commission
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
g/L	Gramme par litre
K	Constante de réaction
kPa	Kilopascal
L	Litres

L/min	Litres par minute
M	Molaire
MES	Matières en suspensions
mg/mL	Milligrammes par millilitres
mL	Millilitres
MLB	Milieu Luria-Bertani
mmole/mL	Millimole par millilitres
MPa	Megapascal
MS	Milieu semi-synthétique
m ³	Mètre cube
N	Normale
O	Oxygène
OD	Oxygène dissous
P	Pression, produit
psi	Pound per square inch (livre par pouce carré)
p/p	Poids/Poids
rpm	Rotation par minutes
S	Substrat
SP	Spores
ST	Solides totaux
STEUM	Station de traitement des eaux usées municipales
ufc/mL	Unité Formatrice de Colonie par millilitres
UI/mL	Unité Internationale par millilitres
UV	Ultraviolet
(v/v)	Volume/Volume
\$/L	Dollars (CAD) par litre
\$/US	Dollars Américain
%	Pourcentage
% de SP	Pourcentage de spores
μL	Microlitres
v, V	Vitesses

Chapitre I

Introduction

Le développement des sociétés, la mondialisation et les avancées technologiques ont grandement favorisés l'augmentation de la démographie, ce qui génère des quantités de plus en plus grandes de déchets. Une certaine quantité de ces déchets peut être réutilisée par recyclage ou par compostage. L'autre partie est cependant détruite ou enfouie. Comme les populations sont en croissance, les sites d'enfouissement ne suffisent plus. D'ailleurs, l'enfouissement n'est pas une méthode très adaptée aux types de déchets qui sont maintenant produits et les risques de pollutions s'y rattachant sont importants. De plus en plus, les déchets domestiques et les boues d'épuration des stations de traitement des eaux usées municipales sont envoyés dans des incinérateurs pour être réduits en cendres qui sont ensuite enfouies. Ces méthodes d'élimination produisent, elles aussi, beaucoup de pollution, par les gaz d'échappement des incinérateurs et par la concentration des métaux lourds et de différents produits toxiques dans les cendres.

Pour ce qui est des boues d'épuration municipales, il est dorénavant possible de les valoriser en les utilisant comme milieux de culture pour différents microorganismes industriels. En effet, certains microorganismes, lors de leur croissance, produisent des composés qu'il est possible d'utiliser. Ces composés sont appelés « produits à valeur ajoutée ». On y retrouve des biopesticides, des biofertilisants, des bioplastiques, des biocatalyseurs et de nombreuses autres substances.

Ce projet de doctorat a pour but de trouver une façon rentable et écologique de réutiliser les boues d'épuration municipales. Le choix s'est arrêté sur la production de

protéases thermostables à partir de nouvelles souches bactériennes thermophiles isolées de boues d'épuration municipales. Les boues secondaires de la Communauté urbaine de Québec (CUQ) sont utilisées pour la croissance des microorganismes isolés. La production de protéases est faite dans le but de les utiliser comme additifs à des détergents. En raison de leur pouvoir hydrolytique sur différentes substances organiques, les protéases sont d'excellentes alternatives pour accroître la compatibilité avec l'environnement des détergents conventionnels.

La production de protéases par des bactéries nécessite l'élaboration et la détermination des paramètres optimaux afin d'obtenir une production maximale du produit. Différents paramètres ont été étudiés et optimisés, comme les températures et les pH optimaux de croissance et de stabilité des protéases (ces expériences sont produites en fioles Erlenmeyer), ou l'oxygénation du milieu, la composition du milieu ainsi que la concentration en solides en suspension (ces expériences sont produites en bioréacteurs). La majorité de ces paramètres ont été optimisés pour différentes souches bactériennes, *Bacillus aestuarii* JP1 et JP2, *Brevibacillus borstelensis* et *Bacillus licheniformis*, quatre souches thermophiles isolées des boues d'épuration.

Cette thèse présente et discute ces résultats en plus d'une revue de littérature sur les différents sujets s'y rattachant, la méthodologie retenue ainsi qu'une conclusion.

Chapitre II

Revue de littérature

Ce chapitre a pour but de résumer les connaissances actuelles sur les procédés de réutilisation des biosolides comme milieux de culture, sur les bactéries produisant des protéases et sur ces dernières.

2.1 Milieux alternatifs

Conventionnellement, la production de produits à valeur ajoutée (enzymes, biopesticides, bioplastiques, biofertilisants, éthanol) se fait dans des milieux semi-synthétiques (soja, amidon, extraits de levures, glucose), et ces milieux sont très dispendieux (Kumar and Takagi, 1999). Environ 60 à 80% du coût de production d'un produit à valeur ajoutée correspond au milieu de culture. C'est dans une perspective de réduction des coûts de production que l'utilisation de milieux alternatifs devient intéressante. Selon Barnabé et al. (2003), les matières résiduelles (boues d'épuration, eaux usées, rejets agro-alimentaires, résidus végétaux) peuvent servir de matière première pour le support de la croissance de divers microorganismes. Il existe de nombreuses sortes de matières résiduelles.

2.1.1 Résidus végétaux

La catégorie des résidus végétaux est actuellement l'une des plus étudiée en raison de son fort potentiel pour la production d'énergie, surtout pour le bioéthanol (Champagne, 2007). Elle regroupe tous les résidus de cultures agricoles et de l'industrie des produits forestiers. Au Canada seulement, 27% de la demande énergétique du pays pourrait être comblée par la bioconversion de ces matières

résiduelles végétales (Christie and Mitchell, 2009). Que ce soit des résidus de culture laissés dans les champs ou des boues d'épuration d'usines de pâtes et papiers, tous ces rejets sont de grandes sources de carbone. D'un côté environnemental, il faut voir ces résidus comme une source renouvelable, contrairement aux produits pétroliers. Il suffit de quelques années pour remplacer la matière végétale (Klass, 2004).

Ces résidus végétaux sont majoritairement composés de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine. Le groupe des hémicelluloses compte pour 20-30% du poids sec des plantes (Saha, 2003). Ces hémicelluloses sont principalement composés d'hétéropolymères de pentoses (xyloses, arabinoses), d'hexoses (mannose, galactose, glucose) et d'acides uroniques. Cette grande concentration de polymères fait des plantes et de leurs résidus de grands fournisseurs de carbone.

Les résidus végétaux sont donc de bonnes sources de carbone pour la production de bioéthanol (Champagne, 2007) par la saccharification des polymères. La production de certaines enzymes comme la xylanase par *Aspergillus niger* BO3 est aussi possible (Dobrev et al., 2006). Cette enzyme est très utile dans l'industrie alimentaire, dans la fabrication des jus et la clarification du vin (Colins et al., 2005). Aussi, comme le démontre Gessesse (1997), un milieu de résidus végétaux (« nug meal », résidus d'*abyssinica*) peut suffire pour la croissance de bactéries du genre *Bacillus* (AR-009) et ainsi permettre la production d'une protéase alcaline. Comme ces résidus se retrouvent dans plusieurs pays, leur utilisation pourrait permettre la réduction du coût de production et donner aux pays pauvres une façon de produire des protéases à moindre coût (Gessesse, 1997).

2.1.2 Résidus alimentaires

Ces résidus regroupent surtout les rejets venant des industries de production des biens de consommation alimentaire, comme les abattoirs (résidus de bœufs, poulets, porcs),

l'industrie laitière (lactosérum, lait rejeté), l'industrie de préparation de légumes (pommes de terre, cornichons, légumes en cannes), en plus des industries brassicoles et vinicoles. Tout comme les résidus végétaux, une grande partie de ces rejets contient une forte concentration de celluloses, d'hémicelluloses et de lignines. L'autre partie contient de la matière organique d'origine animale, comme le lactosérum et les rejets d'abattoirs.

Il est possible de convertir le lactosérum (petit lait) en une base alimentaire de haute gamme (Corporation HET, 2009). Le lactosérum est un sous produit de la production du fromage. Dans l'industrie laitière, il n'existe aucune utilisation du lactosérum, celui-ci est rejeté dans des bassins de rétention jusqu'à son extraction par la municipalité (ou une autre entité). Par la culture d'un consortium de microorganismes, la matière organique du lactosérum est transformée en suppléments alimentaires pour les animaux.

Il est aussi possible de récupérer les résidus de brassins (orge, houblon, levures) lors de la fermentation de la bière pour produire certains oligosaccharides (Khan et al., 2007). Les oligosaccharides ainsi produits peuvent servir d'émulsifiants en créant de la mousse dans la photopolymérisation et sont utilisés dans l'extraction des métaux par solvants dans les mines.

Pour la production d'enzymes, comme les α -amylases, des résidus à base d'orange sont étudiés comme milieu de production (Djekrif-Dakhmouche et al., 2006). *Aspergillus niger* ATCC 16404 est utilisé pour produire cette α -amylase. Les résidus d'oranges sont en voie de devenir un problème environnemental en Algérie. Ces résidus contiennent de grandes quantités d'hydrates de carbone soluble dans l'eau comme le sucrose et le glucose ou non soluble comme la pectine et la cellulose. Il a déjà été démontré que ce milieu est propice à la production d'autres enzymes comme la pectinase (Fonseca and Said, 1994) ou la polygalacturonase (Hart et al., 1991).

2.1.3 Eaux usées et boues d'épuration

Cette catégorie est diversifiée. Il y a les eaux usées et les boues d'épuration, municipales ou industrielles, primaires ou secondaires, biologiques ou chimiques et bien d'autres. Pour faire de la bioconversion, il est essentiel que le rejet soit biologique et qu'il contienne une certaine quantité de matière organique (minimum de 5 g/L de matières en suspensions (MES) pour éviter la gestion de trop grands volumes.

Les boues d'épuration secondaires municipales, venant d'un traitement biologique, sont très appropriées pour la bioconversion. Elles contiennent une bonne quantité de matière organique, des sources de carbone et d'azote sous une multitude de formes. Les stations de traitement des eaux usées municipales (STEUM) possédant le meilleur potentiel pour la bioconversion sont celles qui utilisent un traitement secondaires par biofiltre, en raison de plusieurs facteurs. Ces boues sont générées à partir d'un traitement secondaire, donc les grosses particules, comme les grains de sables, sont retirées dans le traitement primaire. Ces particules de matières souvent non biodégradables peuvent gravement endommager les bioréacteurs. De plus, étant un traitement biologique, les biofiltres font une première transformation de la matière organique brute des eaux usées. La boue récupérée de ces biofiltres est donc constituée, en partie, de particules de matière organique non traitée et de microorganismes morts ou vivants. Cette boue favorise alors la croissance microbienne par sa composition en nutriments simples et encourage la production d'enzymes ou autres bioproduits par sa teneur en matière organiques plus complexes.

Il existe deux grands modèles de biofiltres (Jaillet et al., 2003), ceux à flux ascendant (Biofor®) et à flux descendant (Biodrof®). Les deux systèmes fonctionnent sur le même principe mais les flux d'eaux usées sont de directions contraires. La figure 1 montre la chaîne de traitement des eaux usées à l'usine Est de Québec qui utilise le

système biologique Biodrof®. L'eau usée passe à travers un lit de particules poreuses (le plus souvent de la biolite) où une communauté microbienne se développera en consommant la matière organique. Il y a aussi certains protozoaires, algues et petits insectes qui s'y développent. L'eau qui s'écoule du biofiltre est traitée et rejetée dans un cours d'eau après avoir ou non subi un traitement tertiaire comme l'ozonation ou le rayonnement UV (inutile l'hiver). Après un certains temps, un biofilm est formé dans le lit de particules et le filtre se colmate jusqu'à ce que la filtration ne soit plus efficace et que le lavage soit nécessaire. Par un flux ascendant d'eau traitée, le lit se soulève et les morceaux du biofilm sont détachés des particules poreuses. Ces dernières restent dans le biofiltre mais le reste est évacué par une goulotte et l'eau s'y écoulant se dirige vers un décanteur pour y devenir la boue secondaire municipale.

Cette boue secondaire est riche en matière organique et peut être utilisée pour la croissance de microorganismes. Le tableau 1 indique la composition de ces boues sur une période de deux ans. Les rejets municipaux peuvent être utilisés pour plusieurs types de production de produits à valeur ajoutée, car ils possèdent une certaine quantité de matière organique que peuvent réutiliser certains microorganismes (Mtui and Nakamura, 2005; Cheung and Anderson, 1997). Ces milieux contiennent une partie de matière organique facilement biodégradable permettant une bonne croissance des microorganismes. Ils possèdent aussi une grande partie de matières organiques peu ou difficilement biodégradables, ce qui permet l'activation de la production d'enzymes (protéases, laccases, amylases) pour dégrader ces matières (Beg et al., 2003).

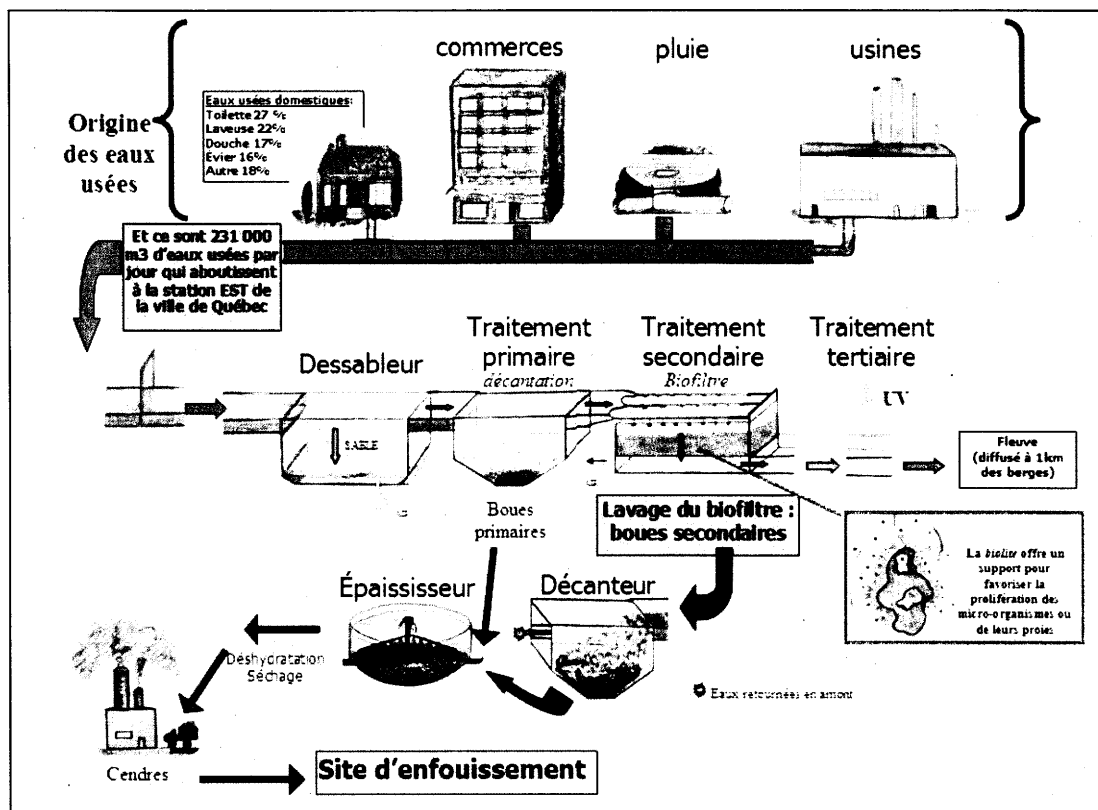


Figure 1 Schéma du système de collecte et de traitement des eaux usées municipales de la Ville de Québec (gracieuseté de Josée-Anne Majeau).

Comme la production est activée par le milieu dans lequel se trouve le microorganisme, différentes enzymes seront produites en fonction des différentes substances du milieu (Kulkarni et al., 1999; Subramanyan et Prema, 2002). D'ailleurs, Yezza et al. (2006) ont démontré que les boues d'épuration peuvent supporter la croissance de divers microorganismes. En effet, *Bacillus thuringiensis* est une bactérie normalement utilisée comme biopesticides, mais peut aussi servir comme organisme producteur de protéases. Il a été démontré que la concentration en matières en suspension dans le milieu a un certain impact sur la production par l'augmentation des matières peu biodégradables qui vont inciter la bactérie à produire des protéases pour dégrader ces substances complexes (Zouari and Jaoua, 1999). Il est donc

important de considérer les boues d'épuration comme un milieu efficace et peu coûteux pour la production de protéases.

Tableau 1 Données brutes sur la composition des boues d'épuration secondaires de la Station Est de la Ville de Québec (gracieuseté de Simon Barnabé et Satinder K. Brar).

Caractéristiques ¹	Boues secondaires							
	BES1	BES2	BES3	BES4	BES5 ³	BES6	BES7	BES8 ²
ST (g/l)	30,7	51,1	31,6	31,7	7,1	37	33,5	20,4
SVT (g/l)	27	nd	23,4	27,8	5,6	nd	25,2	15
MES (g/l)	24,1	45,8	30,8	23,9	5,1	32,1	26,5	17,5
MVES (g/l)	18,1	nd	22	17,8	4	nd	19,2	13,5
C _t (mg C/kg)	386300	416300	391200	404900	375500	405600	368900	298402
N _t (mg N/kg)	60600	52500	60000	75900	66900	73300	50900	41780
Ratio C:N	6,37	7,93	6,52	5,33	5,61	5,53	7,25	7,14
COT (mg C/kg)	70834	51742	93766	243226	130312	50973	60675	nd
N-NH ₄ ⁺ (mg N/kg)	7535	26002	6351	31974	6351	8582	8380	979
N-org. (mg N/kg)	53065	26498	53649	43926	60549	64718	42520	40801
Al (mg/kg)	21002	nd	38556	16203	20010	4234	29956	5749
Ca (mg/kg)	15786	nd	25477	12688	13996	3461	24326	14762
Cd (mg/kg)	1,5	nd	2,38	1,18	1,3	0,21	2,51	0,39
Cr (mg/kg)	46	nd	128	38,3	71,7	12,3	70,3	24
Cu (mg/kg)	304	nd	442	220	244	44	296	189
Fe (mg/kg)	10445	nd	22377	10425	12135	635	17646	12001
K (mg/kg)	5600	nd	10092	4463	4816	1396	7147	9084
Mg (mg/kg)	3233	nd	5208	2632	2915	416	5735	nd
Mn (mg/kg)	156	nd	236	115	128	57	188	nd
Mo (mg/kg)	5,47	nd	8,28	3,77	4,67	1,39	6,28	nd
Na (mg/kg)	23309	nd	96083	37147	35235	12126	15117	1289
Ni (mg/kg)	10,3	nd	17,2	8,8	9,73	2,69	29,5	20,3
P (mg/kg)	8885	nd	17964	8357	9422	6000	8314	7975
Pb (mg/kg)	28,5	nd	46,6	18,6	29,1	3,52	111,1	27,6
S (mg/kg)	6543	nd	20701	14404	5281	488	3379	4779
Zn (mg/kg)	668	nd	1108	480	555	90	1184	301
Période d'échantillonnage (mois-année)	juil-01	sept-01	avr-02	mai-02	juin-02	sept-02	avr-03	juin-03

¹ Les teneurs sont présentées sur une base de boue sèche (g de boues sèches / l ou mg / kg de boues sèches).

² Ces données sont celles de Brar (2004).

³ Toutes les boues ont été concentrées sauf BES 5.

2.2 Enzymes

2.2.1 Historique

Les enzymes sont des protéines complexes que l'on retrouve partout autour de nous. Sans connaître leur existence, les humains ont longtemps utilisé leur pouvoir catalytique et continuent toujours de le faire. Les enzymes permettent de transformer différentes substances en de nouveaux produits. Sans enzymes, ces réactions pourraient éventuellement se produire, mais les paramètres des réactions (pH, température, pression, temps) devraient être extrêmes. Les enzymes permettent donc de diminuer l'énergie d'activation de la réaction ainsi que d'assouplir les conditions requises.

Depuis longtemps, l'humain utilise les enzymes dans un but de consommation. En effet, 3000 ans avant Jésus-Christ, certaines civilisations orientales étaient capables de produire différents alcools et bières en fermentant des fruits et des graines. Un chercheur du nom d'Eduard Buchner publia le premier article sur la fermentation alcoolique effectuée sans ajout de cellules vivantes (Buchner, 1897). Pour ses recherches sur les enzymes, il remporta le prix Nobel de Chimie en 1907 (Nobel Prize, 2009). Ses découvertes ont ouvert la porte menant aux grandes possibilités que peuvent offrir les enzymes et ont lancé les nombreuses recherches faites à leur sujet.

2.2.2 Classes

Selon le Comité sur la nomenclature des enzymes de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (Moss, 2009; Aehle, 2007), il est recommandé de regrouper les enzymes en six classes selon le type de réaction qu'elles catalysent.

- Les oxydoréductases font les réactions d'oxydo-réduction. Ces enzymes sont normalement appelées *déshydrogénases* mais le terme *réductases* peut aussi être utilisé. Il est possible d'utiliser *oxydases* lorsque l'oxygène est l'accepteur

pour la réduction. Il faut nommer l'enzyme selon le modèle suivant :

donneur/accepteur oxydoréductase.

- Les transférases font les réactions de transfert de groupements comme les méthyles, acyles, glycosyles ou phosphates. Les coenzymes sont souvent essentielles pour ces réactions. Il faut nommer l'enzyme en fonction du groupe transféré, de la façon suivante : *donneur/accepteur groupetransférase.*
- Les hydrolases font les réactions d'hydrolyse en clivant les liens C-O, C-N, C-C et quelques autres. Elles ressemblent aux transférases en raison de leur fonction, mais l'eau est l'accepteur du groupe transféré. Il faut nommer l'enzyme en fonction de son substrat et ajouter *-ase.*
- Les lyases font des réactions non hydrolytiques ou non oxydantes à l'intérieur du substrat par élimination en clivant les liens C-O, C-N, C-C et d'autres liens. Il faut nommer l'enzyme selon le groupe éliminé en ajoutant *-ase* à la fin et quelques fois *de-* au début (ex. : déshydratase lorsque de l'eau est enlevé).
- Les isomérases catalysent des réactions de réarrangements géométriques ou structuraux dans une molécule. Ces réactions simples n'impliquent qu'un substrat transformé en un produit. Il faut nommer l'enzyme en fonction des différents types d'isomérisations (ex. : épimérase, mutase, tautomérase).
- Les ligases font des réactions de ligation entre deux molécules en hydrolysant un lien pyrophosphate de l'ATP ou d'un autre nucléoside triphosphate. Il faut nommer l'enzyme en fonction des deux molécules, comme suit : *X-Y ligase.*

Toujours selon le Comité sur la nomenclature des enzymes, ces dernières doivent posséder un code numérique commençant par E.C. et suivi de quatre chiffres.

- Le premier chiffre indique à laquelle des six classes l'enzyme appartient.
- Le deuxième chiffre indique la sous-classe.
- Le troisième chiffre indique la sous-sous-classe.
- Et le quatrième chiffre est le numéro de série de l'enzyme.

Les protéases font partie des hydrolases et sont désignées par E.C. 3.4.x.x.

2.2.3 Effet du pH sur l'activité

Les enzymes sont des polymères polyioniques, c'est-à-dire qu'ils possèdent différents ions (Illanes, 2008). Les variations de pH vont donc changer certaines propriétés des enzymes. Les réactions enzymatiques ont tendance à diminuer lorsqu'elles surviennent dans des milieux où le pH est dans les extrêmes. Avec le pH, la distribution des charges dans le site actif et à la surface de la molécule va varier. L'intérieur du site actif peut contenir des résidus d'acides aminés polaires dont les charges sont dépendantes du pH. L'activité de l'enzyme est donc dépendante, entre autre, du pH et des charges que celui-ci génère.

2.2.4 Effet de la température sur l'activité

La température est l'un des facteurs les plus importants dans les systèmes biologiques. Contrairement au pH, la température provoque des effets opposés sur l'activité et la stabilité des enzymes. Plus la température monte, plus l'activité est élevée mais plus les enzymes sont instables (Illanes, 2008). Selon Beadle et al. (1999), à basses températures (moins de 30°C), les enzymes ont un taux d'inactivation presque nul et la vitesse de réaction est faible. À plus hautes températures, le taux d'inactivation augmente de même que la vitesse de réaction. Pour les enzymes mésophiles, des températures plus hautes que 60°C provoquent une inactivation presque immédiate des enzymes. Les enzymes sont inactivées par la chaleur en raison de l'affaiblissement des forces intermoléculaires responsables de la structure tridimensionnelle des enzymes. L'inactivation peut venir de la soudaine agrégation moléculaire ou d'une mauvaise conformation de l'enzyme (Bommarius and Broering, 2005; Misset, 1993). Il est donc important de choisir la température permettant un bon compromis entre la stabilité et l'activité de l'enzyme.

2.2.5 Thermostabilité

Selon Vieille et Zeikus (2001), les enzymes thermostables sont plus rigides que les enzymes non thermostables. En effet, cette caractéristique a été démontrée par des expériences de décomposition anisotropique (Manco et al., 2000), d'échanges hydrogène-deutérium (Zavodszky et al., 1998) ou de phosphorescence au tryptophane (Gershenson et al., 2000). De plus, ces mêmes auteurs supposent que la rigidité de ces enzymes serait la cause de leur faible activité à de plus basses températures. Les enzymes thermostables possèdent plusieurs caractéristiques qui les rendent thermostables. Leurs composition en acides aminés, la présence de ponts bisulfures et hydrogènes, d'interactions hydrophobiques et aromatiques, du pairage d'ions, des prolines et de la diminution de l'entropie, des interactions des sous-unités, l'empaquetage et la réduction des surfaces accessibles aux solvants ou bien la protection des extrémités N et C. Tous ces facteurs peuvent survenir et permettre aux enzymes de conserver la stabilité à de plus hautes températures. Selon Li et al. (1998), l'inactivation des enzymes peut survenir avec une légère baisse de température. Il y a alors une perte des structures tertiaires et même secondaires. La présence de solvants peut aussi être la cause de l'inactivation des enzymes de même que la présence d'ions métalliques qui peuvent provoquer l'oxydation des cystéines. Les ponts bisulfures, quant à eux, sont amenés à disparaître lorsque le milieu devient plus alcalin.

2.2.6 Protéases thermostables

Les connaissances sur les protéases thermostables sont très peu approfondies et leurs modes de fonctionnements peu connus en comparaison des protéases alcalines conventionnelles (ex. : Subtilisine Carlsberg). Ferrero et son équipe (1996), ont démontré que les protéases alcalines de *Bacillus licheniformis* MIR 29, une souche thermophile (45°C), conservent 100% de leur activité lorsqu'utilisées à 60°C pendant 30 minutes. Par contre, la Subtilisine Carlsberg, qui n'est pas une protéase

thermostable, possède une demi-vie de seulement 2.5 minutes à 60°C (Durham et al., 1987). Les protéases thermostables (et les enzymes thermostables en général) trouvent facilement leur place dans le monde industriel des enzymes en raison de leur grande activité et stabilité (Demirijan et al., 2001). Depuis quelques années, la découverte de nouvelles protéases thermostables s'est produite par l'isolation de microorganismes étant eux-mêmes résistants à de hautes températures (Bharat and Hoondal, 1998; Bauer et al., 1999; Kohilu et al., 2001). Ces microorganismes thermophiles préfèrent les températures plus élevées pour leur croissance et ont donc besoin d'enzymes thermostables pour effectuer les réactions nécessaires.

2.3 Production

2.3.1 Origine des protéases industrielles

La production de protéases industrielles peut se faire par divers types de cellules. Les cellules végétales et animales supportent la production de protéases mais elle est limitée par différents paramètres difficilement contrôlables. La synthèse de protéases par la flore microbienne devient le meilleur choix en raison des paramètres facilement contrôlables et de la constance des résultats (Meunier, 1999). De plus, les principaux avantages de l'utilisation de microbes plutôt que de cellules eucaryotes (biomasse animale ou végétale) sont que ce type de production de protéases n'est pas influencé par les saisons ou la géographie. La matière première est relativement peu coûteuse et les rendements de production peuvent être augmentés par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des paramètres de production (Arnaud et Galzy, 1999).

Parmi les nombreuses souches microbiennes (autant les bactéries que les champignons ou les levures) qui, normalement, ont la capacité de sécréter des protéases, seulement une petite fraction de ces dernières est utilisée pour la production industrielle. Plusieurs caractéristiques de ces microorganismes sont

nécessaires afin de caractériser une souche pour la production de protéases industrielles. Leur culture doit être facile, abondante et la croissance rapide, les souches doivent être stables dans le temps et les quantités d'enzymes produites doivent aussi être abondantes et performantes en plus d'être faciles à isoler (Arnaud et Galzy, 1999).

Traditionnellement, les protéases étaient produites par des cultures en surface de couches minces de milieu liquide ou semi-solide. Cela suffisait pour certaines formulations fongiques comme *Penicillium* ou *Aspergillus* mais le contrôle de la température, de l'aération et de l'humidité posait problème. Depuis, les cultures submergées sont préférées aux cultures de surfaces (Aviron-Violet et al., 1982).

2.3.2 Production actuelle

La protéase bactérienne la plus connue est la Subtilisine Carlsberg, produite par *Bacillus licheniformis* (Saeki et al., 2007). Elle a été grandement utilisée dans les formules de détergents à partir des années 1960 grâce à sa grande compatibilité avec les matrices des détergents et aussi pour son fort potentiel à nettoyer les taches de matière organique sur les textiles. Depuis les années 1980, les industries subissent des pressions pour réduire la quantité de polluants déchargés dans l'environnement. Les quantités de phosphate dans les détergents ont beaucoup diminué aux profits de nouvelles matrices comme la zéolite et les silicates. Au Canada, les quantités de phosphore ont été réduites à des valeurs maximales de 5% p/p de phosphore anhydre et 2.2% p/p de phosphore élémentaire selon les recommandations de la Loi DORS/89-501 (gouvernement du Canada, 2009). De nouvelles protéases plus efficaces ont donc été recherchées et de nouvelles variantes de la protéase à haut pH alcalin no.221 (Horikoshi, 1971) ont été découvertes, comme la Savinase (Betz et al., 1992), la Maxacal (Zuidweg et al., 1972), la NKS-21 (Tsuchida et al., 1986) ou la protéase-M (Kobayashi et al., 1995).

Ces protéases sont produites par des microorganismes a des conditions optimales pouvant être différentes des conditions de stabilité des enzymes. Il est important de faire la distinction entre les caractéristiques optimales de croissance d'une bactérie et les caractéristiques de stabilité des réactions protéolytiques.

2.3.3 Applications industrielles

Les protéases sont utilisées dans divers domaines. La figure 2 montre la répartition des protéases dans les différents marchés mondiaux. Les protéases sont principalement utilisées dans l'industrie des détergents. Elles servent à dégrader les taches protéiques comme le sang, le lait, les œufs, les sauces et autres taches organiques.

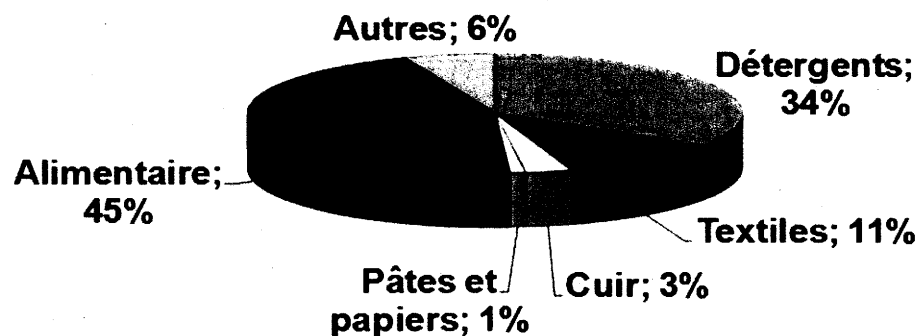


Figure 2 Répartition des protéases dans les différents marchés mondiaux (Données tirées de Hunter-Cevera, 1998).

Selon Hunter-Cevera (1998), en 1998, le marché des protéases représentait 1.5 milliard \$US et tous les produits dérivés reliés à ce marché représentaient entre 80 et 130 milliard \$US. Dans les détergents actuels, moins de 15 sortes d'enzymes sont utilisées et elles proviennent principalement de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. claussi*, *B. lentus*, *B. alkalophilus* et *B. halodurans* (Egmont, 1997).

Par contre, aucune enzyme nouvellement découverte ne surpasse la Subtilisine de *Bacillus licheniformis* (Maurer, 2004). Dans l'industrie du cuir, les protéases sont utilisées pour le tannage. Conventionnellement, la chaux et beaucoup de sulfures sont utilisés pour le tannage du cuir. Les effluents ainsi créés comptent pour 50-60% de la charge polluante due aux tanneries, en termes de demande biologique en oxygène (DBO), de demande chimique en oxygène (DCO), de solides totaux (ST) et de matières en suspension (MES), le tout dans un effluent total très alcalin (Sivasubramanian et al., 2008). L'utilisation des protéases permettrait le retrait de la chaux et des sulfures des processus de traitement, réduisant ainsi la charge polluante. Les protéases permettent de retirer les poils et la chair du cuir sans dénaturer le collagène. Cette étape est critique pour la production d'un cuir de qualité. Dans l'industrie alimentaire, les protéases sont utilisées pour transformer les aliments. Les substances sucrées, comme les sirops de glucose ou de fructose sont produits par des enzymes hydrolytiques, comme les protéases, à partir d'amidon de maïs (Olempska-Beer et al., 2006). Comme la liquéfaction de l'amidon se produit à de hautes températures, 105°C, il est important d'utiliser des protéases et autres enzymes pouvant résister et être actives à ces hautes températures. Les bactéries thermophiles sont reconnues pour produire ces enzymes thermostables.

2.3.4 Bactéries thermophiles

Les bactéries possèdent des caractéristiques de croissance bien à elles. D'une bactérie à l'autre, les températures optimales peuvent varier, allant de -5°C à 20°C pour les psychrophiles, de 20°C à 45°C pour les mésophiles et de 45°C à plus de 100°C pour les thermophiles. Ces températures, même extrêmes, doivent être optimales pour obtenir la meilleure concentration de cellules.

Selon Alagappan et Cowan (2004), la croissance et le métabolisme des microorganismes (incluant l'activité des enzymes) sont dépendants des enzymes

produites à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. Certaines enzymes (exemple : pour la construction des matériaux des parois), chez certaines bactéries, ne sont efficaces ou actives qu'à de hautes températures (chez les thermophiles) ou à de basses températures (mésophiles et psychrophiles). Selon Arrhenius (1889), plus la température de l'environnement augmente, plus le taux de croissance maximal sera élevé. Topiwala et Sinclair (1971) ont apporté quelques modifications au modèle d'Arrhenius. Ils prennent en considération que la température, lorsque supérieure à la température optimale, affecte les microorganismes et réduit leur taux de multiplication.

La température a plusieurs effets sur la croissance bactérienne et la production de structures et de molécules. Les bactéries possèdent des caractéristiques spécifiques comme des polypeptides, des protéines ou des lipides leur permettant de résister aux températures (Kumar and Nussinov, 2001). Elles possèdent aussi ce que l'on nomme des chaperonines qui permettent de restructurer les protéines (et les protéases) et leur rendre leur activité lorsque ces protéines sont dénaturées (Everly and Alberto, 2000). Les membranes cellulaires des bactéries sont constituées d'acides gras saturés qui leur procurent un environnement hydrophobe et ces acides gras demeurent rigides à de hautes températures (Herbert and Sharp, 1992). Les bactéries possèdent aussi des gyrases inverses d'ADN qui produisent des super hélices positives dans l'ADN. Ces super hélices donnent à l'ADN une plus haute température de séparation des deux brins, mais pas aussi haute que la température optimale de croissance, sinon il n'y aurait pas de transcription d'ADN (Lopez, 1999). En plus, les interactions électrostatiques, hydrophobes et les ponts bisulfures aident grandement dans la résistance aux hautes températures (Kumar and Nussinov, 2001). Les bactéries thermophiles possèdent ces mêmes caractéristiques mais plus efficaces.

Comme les bactéries thermophiles produisent des structures plus solides, résistantes aux différentes températures, il est possible de suggérer qu'elles résisteront aussi à

d'autres conditions difficiles. Les bactéries thermophiles isolées des boues d'épuration et des eaux usées peuvent offrir un meilleur rendement de croissance et de production de bioproduits à hautes températures que des souches mésophiles conventionnelles. Isolées de ces milieux alternatifs, elles y sont acclimatées et deviennent des souches potentielles pour une production industrielle.

2.3.5 Influence du pH

Le pH est aussi important que la température. La plupart des bactéries ont un optimum de croissance à des pH neutres, entre 6 et 8. Certaines préfèrent des pH acides, moins de 6 et d'autres préfèrent des pH alcalins, plus de 8. Lors de la croissance bactérienne, les bactéries vont produire des acides qui se retrouvent dans le milieu environnant. Ces acides provoquent une chute dans le pH, acidifiant le milieu. Lorsque le milieu de culture devient pauvre en nutriments, en sources de carbone, les bactéries vont utiliser les acides produits plutôt afin de subvenir à leurs besoins (Paavilainen et al., 1995). Comme les acides sont consommés, le pH va redevenir neutre et même, quelques fois, alcalin.

Le pH influence la régulation de la biomasse, le système de transport d'ions (Guffanti et al., 1984) et le métabolisme des microorganismes (Mayo and Noike, 1996). Le pH du milieu environnant va déterminer quels ions sont présents et sous quelles formes. Dans le métabolisme des bactéries, les ions vont être utilisés comme accepteurs ou donneurs d'électrons, comme coenzymes et comme éléments des nouvelles structures produites par les différents systèmes cellulaires.

Le pH est aussi un facteur clé dans les réactions respiratoires des bactéries aérobies. Le transfert d'un état réduit vers un état oxydé est dépendant du potentiel d'oxydo-réduction qui est dépendant du pH. Comme plusieurs de ces réactions se produisent dans les diverses membranes cellulaires, la différence dans ce potentiel d'un côté à

l'autre de la membrane déterminera l'efficacité de la réaction ainsi que sa rapidité (Calik et al., 2002). En plus, lors de ces réactions membranaires, l'énergie libérée est conservée dans la membrane sous forme d'un gradient transmembranaire de protons (Calik et al., 2000). C'est pourquoi il est important de conserver un pH optimal lors de la croissance bactérienne et non pas laisser le pH évoluer sans contrôle, car il y aura une perte d'efficacité.

Pour ce qui est des enzymes, le pH est important en raison des ions qui seront présents pour leur production, mais aussi pour leur fonctionnement. En effet, plusieurs enzymes ont besoin d'un ion métallique dans leur structure et aussi d'un ion libre permettant à la réaction catalytique de survenir. Lors d'une production industrielle de cellules microbiennes ou de bioproduits issus de cultures microbiennes, il faut déterminer le pH optimal pour la croissance. Lorsque le milieu de culture est complexe comme des boues d'épuration, la production à pH constant et contrôlé devient un paramètre essentiel pour obtenir un rendement adéquat. La stabilité du pH assure l'uniformité du milieu pendant les heures de production.

2.3.6 Concentration en oxygène dissous

L'absence ou la présence d'oxygène est aussi un besoin important pour les bactéries. Il y a les bactéries aérobies strictes qui ne peuvent survivre qu'en présence d'oxygène (~18-21%). Il y a les bactéries anaérobies strictes qui ne croissent qu'en absence totale d'oxygène, car celui-ci est toxique pour elles. Il y a les anaérobies et aérobies facultatives qui peuvent croître sans oxygène, mais dont la présence n'est pas un problème. Finalement, il y a les microaérophiles qui requièrent absolument de l'oxygène, mais à une concentration de moins de 200 μ mole sinon l'oxygène devient toxique. La majorité des bioréactions ayant comme but la production de protéases (ou autres enzymes) se font à l'aide de microorganismes aérobies strictes, la présence d'oxygène est nécessaire. Il est important que l'aération soit optimale dans les

bioréacteurs. Pour les bactéries aérobies et pour la production de protéases, l'oxygène est le gaz le plus important et sa concentration ne doit pas diminuer à moins de 20% (Beg et al., 2003). Par contre, pour certaines souches bactériennes, une concentration en oxygène dissous inférieure à 20% a très peu d'effets sur la production de protéases (Chenel et al., 2008).

La composition du milieu va aussi influencer la production de protéases en faisant varier les concentrations des gaz dans ce milieu. En effet, si le milieu est trop concentré en MES, les bactéries auront de la difficulté à croître, car l'oxygène sera moins accessible dans le milieu (Brar et al., 2005). Plus il y a de particules dans le milieu, plus il y a d'interactions en elles et plus le milieu devient visqueux.

L'oxygène se disperse moins bien dans les fines couches entourant les bulles d'air et les bactéries. Cette couche devient plus épaisse et plus dense. D'un autre côté, lorsque le milieu est moins concentré en MES, l'oxygène se dissout très bien, mais ce sont les éléments nutritifs qui deviennent plus rares et retardent la croissance bactérienne.

Le taux de transfert de l'oxygène (OTR) vers les cellules bactériennes va être dépendant de plusieurs facteurs comme la viscosité du milieu (Brar et al., 2005) qui est dépendant de la concentration en MES, de la température selon la Loi de Henry, des taux d'aération (débit, grosseur des bulles d'air) et d'agitation, de la géométrie du bioréacteur et du taux de consommation de l'oxygène (OUR) par les microorganismes. De plus, certains métaux présents dans le milieu, ainsi que la matière organique et inorganique peuvent compétitionner avec l'oxygène du milieu (Alagappan and Cowan, 2004). La bactérie *Rhodococcus erythropolis* a montré une nette amélioration de sa croissance et de l'efficacité de sa biodésulfuration lorsque l'oxygène était présent en concentration non limitante (Gomez et al., 2006). Il est donc important de déterminer qu'elles sont les paramètres de culture optimaux afin de fournir assez d'éléments nutritifs aux bactéries tout en permettant à l'oxygène de se

dissoudre suffisamment et ainsi se rendre en plus grande concentration auprès de ces bactéries.

2.3.7 Moyens physiques d'augmenter l'oxygène dissous

Dans un bioréacteur, les gaz vont se disperser de manière ascendante, car ils sont plus légers que le liquide environnant. Les gaz stériles sont injectés de façon à entrer en contact avec le liquide par le bas. Le bioréacteur possède un agitateur constitué d'une tige rotative comportant une ou plusieurs séries d'hélices faites d'ailettes ainsi que des chicanes à la périphérie de la cuve. Ces mécanismes permettent un mélange homogène du milieu de culture, une dispersion égale des microorganismes, la diffusion et la dissolution adéquate de l'oxygène injecté (air stérile à ~21% d'oxygène). L'oxygène se retrouve sous forme de bulles plus ou moins grosses qui vont se déplacer dans le milieu pour apporter cet oxygène aux bactéries dans le milieu. Selon les principes de rhéologie (Tyagi, 2006), l'oxygène se transfère de la bulle vers le milieu environnant, où il est capté par les bactéries. Cependant, les bactéries et les bulles de gaz sont entourées d'une fine couche de milieu de culture qui se déplace avec elles. L'oxygène doit alors diffuser et sa concentration varie en fonction de la distance à travers cette couche. Plus cette couche est mince, plus l'oxygène arrivera à la bactérie en grande concentration. Lors des bioréactions, il faut utiliser les différents paramètres et accessoires pour réduire cette couche au maximum.

L'augmentation de l'aération est un bon moyen. Cela permet d'augmenter le nombre de bulles dans le milieu et ainsi favoriser le contact entre les bulles et les bactéries. Selon le type d'injecteur, la grosseur des bulles et leur dispersion peuvent varier (Nielsen et al., 2003). Comme la densité des bulles de gaz est plus faible que la densité du milieu, elles vont se déplacer vers le haut du bioréacteur et s'échapper par la sortie d'air sans être toutes consommées par les bactéries. Lorsque les

microorganismes sont en phase exponentielle de croissance, ils consomment l'oxygène les entourant. L'augmentation de l'aération permet d'augmenter la concentration d'oxygène dissous, mais après un certain point, les gaz s'échappent trop rapidement du milieu pour avoir le temps de se dissoudre. De plus, l'augmentation de l'aération favorise la formation de mousse (section suivante).

Bien que l'agitation dans le bioréacteur ne permette pas d'apporter de l'oxygène dans le milieu, elle permet néanmoins de favoriser l'accessibilité de l'oxygène pour les bactéries. En effet, l'augmentation de l'agitation provoque des turbulences dans le bioréacteur et ces turbulences vont diminuer l'épaisseur des fines couches de milieu entourant les bulles d'air et les bactéries (Nielsen et al., 2003). En étant plus minces, ces couches vont permettre un meilleur transfert d'oxygène vers les bactéries. Par contre, cette technique a, elle aussi, ses limites. L'agitation ne peut être augmentée indéfiniment, tout dépend du bioréacteur utilisé. De plus, l'augmentation excessive de l'agitation provoque l'apparition de grandes forces de cisaillement dans le milieu et ces forces peuvent provoquer le bris ou la dénaturation des grandes structures complexes comme les bactéries et même les protéases (Pedersen, 1992). L'augmentation de l'agitation favorise donc la croissance bactérienne, mais jusqu'à un certain point où elle peut devenir dommageable.

D'autres méthodes expérimentales peuvent aussi servir à favoriser la croissance microbienne par l'augmentation de l'oxygène dissous dans le milieu. L'injection directe d'oxygène pur dans le milieu en est une. Au lieu d'utiliser de l'air ambiant stérile pour aérer le bioréacteur, il est possible d'utiliser de l'oxygène pur, lui aussi stérile. Ceci permet de conserver l'oxygène dissous bien au-delà de la concentration minimale recommandée qui est de 20%. À un niveau expérimental de laboratoire, cette technique est faisable, mais à une échelle industrielle ce n'est pas vraiment réalisable. L'utilisation d'oxygène pur augmenterait les coûts de production et ne serait donc pas rentable. L'autre moyen expérimental est de conserver une certaine

pression dans le bioréacteur. En effet, la Loi de Henry veut que *Pour un liquide et un gaz donnés, la pression du gaz et la concentration du gaz dissous dans le liquide sont proportionnelles* (Zumdahl, 1998). Cela signifie que, dans un bioréacteur, plus on applique de la pression sur les gaz à l'intérieur, plus ces gaz se dissoudront dans la partie liquide. Il est donc possible d'augmenter l'oxygène dissous dans le milieu de culture en augmentant la pression dans le bioréacteur. Ceci peut se faire en actionnant une vanne à la sortie d'air du bioréacteur. Cette méthode aussi a ses limites. L'augmentation de la pression peut affecter les bactéries. En fonction du type de parois cellulaires, les bactéries vont supporter différemment les changements de pressions ou des pressions trop fortes.

Ces moyens deviennent nécessaires lors de bioréactions avec des boues d'épuration car ces milieux sont très complexes. Les boues d'épuration secondaires de la Ville de Québec sont composées, en grande partie, de carcasses de microorganismes qui ont été utilisés lors du traitement secondaire biologique. La boue secondaire contient donc divers composés pouvant augmenter la viscosité, réduire le transfert d'oxygène et provoquer la formation de mousse.

2.3.8 Formation de mousse

Sous certaines conditions, il peut y avoir formation de mousse sur la surface du milieu de culture. Lors des bioréactions et de la stérilisation des milieux de culture, surtout des boues d'épuration, les débris cellulaires, les MES et les polymères extracellulaires peuvent être responsables de la formation de mousse (Barnabé, 2004). La présence de cette mousse engendre plus de risques de contaminations du bioréacteur par le contact de la mousse sur le haut du réacteur et aussi, il y a plus de chance de perte de produit si la mousse s'échappe du bioréacteur ou si elle reste collée aux parois en dehors du liquide (Vardar-Sukan, 1998). Il existe différents types de mousses. La mousse grossière se contrôle plus facilement car les bulles sont plus grosses et éclatent

facilement. Un brise mousse mécanique ou l'utilisation d'anti-mousse chimique peut régler le problème facilement. Plus les bulles deviennent fines, plus la mousse sera crémeuse et son contrôle devient alors difficile. Le brise mousse mécanique, fonctionnant comme un ventilateur de plafond, ne fait qu'empêcher la mousse d'atteindre la surface supérieure du bioréacteur sans la contrôler. L'anti-mousse chimique a plus de succès en réduisant la tension de surface des bulles faisant éclater ces dernières. Par contre, son utilisation peut inhiber la croissance bactérienne en plus de nuire au transfert d'oxygène à l'interface gaz-liquide (Huang et al., 2001). Certains anti-mousses naturels, à base de végétaux peuvent être utilisés mais des quantités importantes sont nécessaires durant les bioréactions.

Lors de bioréactions avec des boues d'épuration municipales, la composition de ce milieu favorise grandement la production de mousse. Lors de la phase exponentielle, la consommation d'oxygène est maximale et il est nécessaire d'aérer le bioréacteur au maximum. C'est à ce moment que la mousse est la plus problématique. De plus, la production d'enzymes pour la décomposition de l'environnement et le relâchement de métabolite microbien lors d'une sporulation prématurée surviennent durant cette période. Ces deux phénomènes engendrent la formation de mousse qui doit être contrôlée.

2.3.9 Sporulation

La sporulation est le phénomène par lequel une cellule bactérienne subit un stress et pour se protéger, se transforme en spore. Dans un environnement qui n'est plus adéquat, la cellule bactérienne, pour ne pas mourir, se change en une forme résistante jusqu'à ce que l'environnement redevienne propice à sa multiplication (Piggot, 2004). Dans une culture standard, la sporulation survient vers la fin de la phase exponentielle de croissance, lorsque le milieu commence à devenir déficient. Il est possible de voir l'apparition de quelques cellules sporulées durant toute la phase exponentielle mais

l'augmentation rapide de la concentration de spores survient généralement à la fin de la phase exponentielle. Au départ, la spore est formée dans la cellule et sort de cette dernière lors de la lyse. Plusieurs substances sont relâchées, comme des enzymes, des constituants cellulaires et certaines molécules biologiques. Le relâchement de ces substances pourrait être considéré comme faisant partie du « quorum-sensing », un phénomène qui permet la « communication » entre les bactéries d'un même milieu (Barnabé, 2004). La sporulation d'une partie de la communauté bactérienne pourrait ainsi déclencher la sporulation des autres bactéries.

Il est aussi possible de remarquer que la sporulation peut être désynchronisée. En effet, elle peut débuter fortement en début de phase exponentielle. Il y a plusieurs raisons à cela. La croissance de la préculture utilisée pour inoculer un bioréacteur peut se trouver en fin de phase exponentielle et les spores peuvent être déjà présentes. La forte concentration de spores peut entraîner la sporulation des autres bactéries. De plus, l'utilisation de boues d'épuration comme milieu de culture peut aussi favoriser la sporulation prématurée des bactéries. En effet, la complexité de ce type de milieu peut provoquer la sporulation car les nutriments facilement assimilables sont peu nombreux et l'acclimatation enzymatique peut être plus ou moins longue. Ensuite, la présence d'éléments perturbateurs dans les boues d'épuration peut inciter les bactéries à sporuler pour y résister. Des produits toxiques, des métaux et même des antibiotiques peuvent se retrouver dans ces boues d'épuration et inhiber la croissance microbienne et même inhiber l'activité des enzymes.

2.3.10 Inhibition

Les milieux de culture ont une grande influence sur la croissance des microorganismes mais aussi sur l'activité des enzymes. Les différentes particules présentes dans le milieu peuvent provoquer un phénomène appelé inhibition par le substrat. En général, l'augmentation de la concentration du substrat augmente la

vitesse de réaction des enzymes mais certaines d'entre elles sont affectées par des excès de substrats. Certaines enzymes peuvent donc être influencées négativement par une augmentation de substrat plutôt que positivement. La présence d'inhibiteurs augmente avec la concentration du substrat. Ces composés empêchent les enzymes d'être efficaces. Ce phénomène d'inhibition peut survenir plus souvent lors de l'utilisation de boues d'épuration car ces dernières sont composées de plusieurs substances inconnues pouvant être inhibitrices.

La production de bioproduits écologiques est un domaine de recherche scientifique important pour l'avenir. Plusieurs microorganismes ont la possibilité de produire différentes substances d'intérêt comme des biopesticides, des biofertilisants, des bioplastiques ou des enzymes. Tous ces produits existent depuis plusieurs années mais leur production est très coûteuse en raison du coût élevé du milieu de culture. La présence de boues d'épuration dans presque tous les endroits du globe devient ainsi une voie de choix car ces matières sont peu coûteuses et ont le potentiel nutritif pour remplacer les milieux semi-synthétiques.

L'utilisation de boues d'épuration secondaires, provenant de la station Est de traitement des eaux usées de la Ville de Québec, pour la production de protéases thermostables est une idée originale et avant-gardiste mais plusieurs aspects importants doivent d'abord être étudiés. Au niveau de la production bactérienne, il faut déterminer la température, le pH, le taux d'aération et la composition du milieu afin d'obtenir un maximum de cellules. Pour ce qui est de la stabilité des enzymes, le pH et la température sont les paramètres à optimiser.

Chapitre III

Hypothèses et objectifs

Le but de cette recherche de doctorat est de trouver une utilisation alternative aux boues d'épuration. Ce nouveau concept doit être viable économiquement et favorable à l'environnement, comparativement aux méthodes de disposition actuelles des boues d'épuration. Ces boues ne sont présentement valorisées qu'avec l'épandage, sinon elles sont détruites ou enfouies. Il est donc important de trouver une façon alternative de recycler ces boues, afin de diminuer leur impact sur l'environnement. Ce projet de recherche propose d'élever ces matières tertiaires au niveau de matières premières. Ces boues sont retrouvées dans tous les secteurs industrialisés et peuvent servir à la croissance d'une vaste gamme de microorganismes. Les bactéries peuvent se servir des nutriments des boues pour produire différents produits à valeur ajoutée comme des enzymes, des antibiotiques, des biofertilisants, des biopesticides, des bioplastiques. La bioconversion des boues d'épuration en un produit à valeur ajoutée donne à l'industrie qui le produit un avantage stratégique en raison du faible coût de production et des propriétés écologiques du produit et du procédé lui-même.

L'un de ces produits à valeur ajoutée est la protéase bactérienne. L'utilisation de la bioconversion des boues d'épuration pour la production de protéases permettra de rendre ce produit mondialement compétitif et offrira une alternative écologique aux catalyseurs chimiques actuellement en usage. Plus précisément, l'élaboration d'un procédé de production de protéases thermostables sera utile pour les industries où des traitements à hautes températures sont nécessaires. L'utilisation de souches sauvages thermophiles, isolées des boues d'épuration municipales de la Ville de Québec, permettra d'obtenir un rendement de production de protéases thermostables plus

élevé. Toutefois, il est important de déterminer les caractéristiques des souches et des protéases avant d'en faire la commercialisation.

Plusieurs paramètres ont été choisis en raison de l'impact qu'ils peuvent avoir sur le rendement de production des protéases thermostables dans des boues d'épuration. Il faut considérer que les boues d'épuration sont des milieux complexes pour la culture contrôlée de microorganismes. Ces boues contiennent des substances difficilement biodégradables, en plus des substances toxiques ou inhibitrices, comme des antibiotiques, qui peuvent nuire à la croissance des microorganismes (Auriol, 2007).

Basée sur cette considération, l'hypothèse suivante est énoncée :

H.1 Les bactéries thermophiles isolées dans les boues d'épuration municipales atteindront une concentration de cellules élevée (plus de 1×10^8 ufc/mL) dans ces mêmes boues et produiront des protéases stables à différentes températures et sur un vaste spectre de pH.

Contrairement aux boues d'épuration, le milieu semi-synthétique est très favorable à la croissance bactérienne par sa composition en substances facilement assimilables. Si les protéases produites par les différentes souches bactériennes isolées des boues d'épuration municipales produisent des protéases de façon induite, leur production devrait être plus faible en milieu semi-synthétique qu'en boues d'épuration. Comme les boues d'épuration sont plus complexes, les protéases seront nécessaires pour fournir les éléments nutritifs essentiels aux bactéries.

L'hypothèse suivante peut alors être énoncée :

H.2 L'activité protéolytique des souches cultivées dans les boues d'épuration sera supérieure à celles des souches dans le milieu semi-synthétique.

Par la suite, en considérant que les bactéries se nourrissent des substances de leur environnement, il est attendu qu'un milieu riche permettra d'obtenir plus de cellules viables. Par contre, toujours en considérant que les protéases sont produites de manière induite, les bactéries ne ressentiront pas le besoin de produire des protéases si le milieu est trop riche. Il devient alors nécessaire de trouver le juste milieu entre un milieu riche favorisant la production de cellules et un milieu pauvre stimulant la production de protéases.

L'hypothèse suivante permettra d'éclairer cette question :

H.3 Plus le milieu de culture sera concentré en matières en suspensions, plus il y aura de cellules, mais moins importante sera l'activité protéolytique.

Finalement, l'utilisation d'un procédé de culture pour les thermophiles comporte certains désavantages dont la faible solubilité de l'oxygène dans le milieu (Chenel, 2005). En bioréaction thermophile, les limites d'oxygénation du bioréacteur sont rapidement atteintes lors de la phase exponentielle de croissance, car l'oxygène a une faible dissolution à haute température et les bactéries consomment tout l'oxygène dissous. Dans la littérature, il est suggéré de conserver un pourcentage d'oxygène dissous supérieur à 20% pour les bactéries mésophiles, permettant ainsi une meilleure croissance et une production de protéases accrue (Beg et al., 2003). Par contre, la pressurisation trop élevée du bioréacteur pourrait entraîner un stress sur les cellules bactériennes, réduisant leur croissance (Malinowska-Panczyk et al., 2008). Ce phénomène sera surveillé. À l'inverse, les enzymes thermostables sont stabilisées lorsque soumises à de hautes pressions car la pression leur permet de conserver leur structure en évitant qu'elles se déplient (Hei and Clark, 1994). Ajouté à cela, l'injection d'oxygène pur a comme effet de dépouiller le milieu du CO₂ en plus de certaines substances volatiles biodégradables (Hagani and Soltanali, 2008) et serait une solution dispendieuse en raison du coût de l'oxygène dans un système industriel.

En raison de ces faits, l'hypothèse suivante est énoncée :

H.4 Pour remédier aux limites du bioréacteur, l'injection d'oxygène pur permettrait d'augmenter la concentration en oxygène dissous mais réduira tout de même la croissance. La pressurisation augmentera la concentration en oxygène dissous mais aura aussi un effet néfaste sur la croissance. Par contre, il est possible que les protéases produites à l'aide de cette dernière méthode soient plus efficaces dû à leur production sous pression.

Ce projet comporte quatre objectifs principaux, en relation avec les hypothèses énoncées précédemment.

O.1 Identifier des souches bactériennes thermophiles isolées des boues d'épuration municipales de la Ville de Québec et déterminer leurs caractéristiques optimales.

Cet objectif comprend trois sous-objectifs :

- SO.1 Isoler et identifier des souches bactériennes thermophiles montrant un potentiel pour la production de protéases.
- SO.2 Déterminer la température et le pH optimaux de croissance des souches isolées.
- SO.3 Déterminer la température et le pH de stabilité des protéases produites par ces souches.

Il sera alors possible de comparer ces souches bactériennes avec d'autres présentement utilisées en industries.

O.2 Déterminer si des souches bactériennes cultivées dans des boues d'épuration montrent une meilleure activité protéolytique que lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu semi-synthétique.

Pour atteindre cet objectif, les souches bactériennes isolées et montrant un potentiel pour la production de protéases seront cultivées dans un milieu semi-synthétique à base de farine de soja ainsi que dans des boues d'épuration municipales secondaires de la Ville de Québec ayant 25 g/L de MES. Ces expériences seront effectuées en bioréacteur afin de permettre le contrôle des différents paramètres de culture (pH, température, mousse, aération, agitation).

O.3 Déterminer l'impact de la concentration en matières en suspensions des boues d'épuration municipales sur la croissance bactérienne et sur la production de protéases.

Il sera possible d'atteindre cet objectif en cultivant les différentes souches bactériennes isolées dans trois concentrations différentes de MES des boues d'épuration municipales secondaires, 15, 25 et 35 g/L. Comme précédemment, le bioréacteur sera utilisé pour contrôler la culture.

O.4 Déterminer l'impact de la concentration en oxygène dissous sur la croissance bactérienne et la production de protéases lors de la culture des bactéries thermophiles en boues d'épuration municipales secondaires.

Des boues d'épuration à 25 g/L de MES sont utilisées pour cultiver les souches de *Bacillus aestuarii* JP1 et JP2 précédemment utilisées. Les bioréactions se feront en bioréacteur et trois stratégies seront évaluées. Une première en mode normal, sans ajout supplémentaire d'oxygène (cette expérience correspond à celle effectuée précédemment en boues d'épuration à 25 g/L de MES). Pour les deux autres stratégies, les bioréacteurs seront pressurisés ou bien de l'oxygène pur sera injecté à la place de l'air ambiant stérile.

L'atteinte de ces objectifs et la confirmation (ou infirmation) des hypothèses permettront d'élaborer les bases d'un projet de production d'enzymes à partir de rejets industriels ou municipaux.

Chapitre IV

Originalité de la recherche

L'originalité de cette recherche est d'utiliser une boue d'épuration municipale comme milieu alternatif pour la croissance de microorganismes thermophiles producteurs de protéases thermostables. Premièrement, bien que la production de protéases soit un des domaines les plus à l'étude en biotechnologie, les protéases thermostables, quant à elles, sont peu étudiées en comparaison. L'activité des protéases est accrue lorsque la température environnante est plus élevée mais leur stabilité en est grandement réduite (Beadle et al., 1999). Il est donc intéressant d'étudier ces protéases thermostables afin d'élaborer de nouveaux procédés pour leur production. Deuxièmement, la production conventionnelle de protéases se faisait généralement par les bactéries de la classe des bacilles et surtout du genre *Bacillus* (Banik and Prakash, 2004; Singh et al., 2001). Ces souches bactériennes sont souvent mésophiles et il est supposé que de nouvelles souches thermophiles auront un meilleur potentiel pour la production de protéases thermostables. De plus, de nouvelles souches peuvent être isolées de divers milieux (boues d'épuration et eaux usées) et il est attendu que leurs performances de production de protéases dans ces mêmes milieux de cultures seront grandement améliorées. Troisièmement, l'utilisation d'un milieu à base de boues d'épuration municipales pour la production d'enzymes par des bactéries thermophiles est l'aspect le plus original de cette recherche. En effet, la production de protéases par des souches bactériennes conventionnelles dans des milieux semi-synthétiques est très connue, mais ce type de production est aussi très coûteux. L'utilisation de boues d'épuration pour la croissance de bactéries permet de réduire ces coûts et leur utilisation est plus simple que d'autres milieux alternatifs où il faut ajouter des suppléments (Alam et al., 2008). L'étude de l'effet de l'oxygène sur la croissance et la

production de protéases est aussi un autre aspect original. Plusieurs auteurs (Beg et al., 2003; Zouari et al., 2002) s'accordent à dire que l'oxygène est très important pour les bactéries aérobies mais très peu de tests ont été effectués en bioréacteurs en utilisant des appareils pressurisés ou de l'oxygène pur. L'utilisation de bactéries thermophiles entraîne inévitablement des problèmes de disponibilité de l'oxygène dans le liquide et les effets néfastes (ou bénéfiques), autant sur la croissance que sur la production, n'ont pas été clairement établis. Bien que certains auteurs commencent à s'y intéresser (Thanh et al., 2006; Han and Zhong, 2003), une recherche sur une plus grande échelle est nécessaire.

Chapitre V

Méthodologie

Afin d'atteindre les objectifs fixés et confirmer ou infirmer les hypothèses, une série d'expériences a été effectuée. Ces expériences sont faites selon le schéma général suivant:

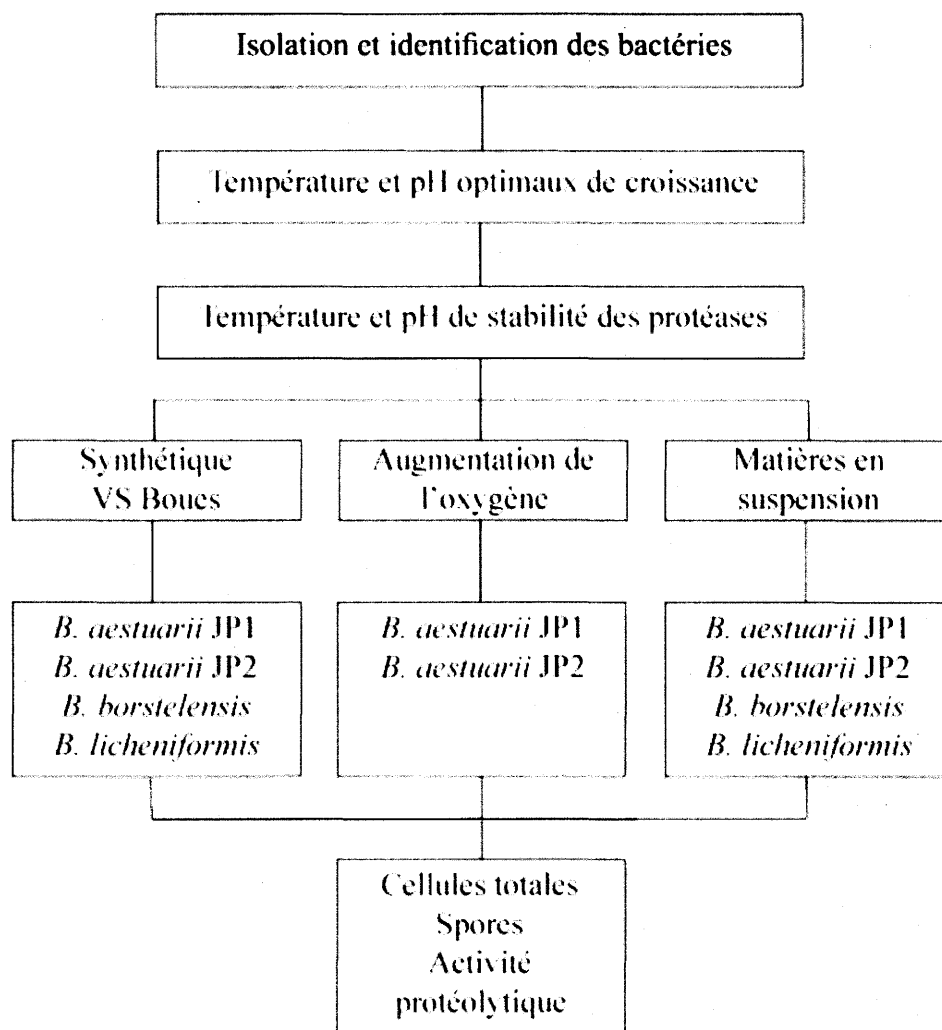


Figure 3 Organigramme de la séquence des expériences et les souches utilisées.

5.1 Isolation et identification des souches bactériennes thermophiles

Les boues sont échantillonnées à la station de traitement des eaux usées de la Ville de Québec (CUQ), à la station Est. Les échantillons sont conservés à 4°C dans une chambre froide dans des bouteilles hermétiques pour un maximum de deux semaines afin d'éviter la mort des souches pouvant être potentiellement utiles. Même durant l'entreposage à basse température, certaines souches bactériennes peuvent se développer, produire des enzymes et différentes substances qui peuvent altérer le milieu de culture. Ces phénomènes peuvent aussi éliminer des souches potentielles pour la production d'enzymes.

Pour isoler les souches thermophiles, un échantillon de chacune des boues est inoculé sur des géloses nutritives (0.3% d'extrait de viande; 0.5% de peptone de caséine; 1.5% d'agar, ajuster le pH à 7.0, stériliser à 121°C pendant 15 minutes à 15 psi) pendant 24 heures à 50°C. Toutes les bactéries sont purifiées sur des géloses nutritives jusqu'à l'obtention de cultures pures.

Pour déterminer le potentiel protéolytique des souches, un test d'hydrolyse de la gélatine a été effectué en pétris. Si la gélatine nutritive, où la souche a été cultivée, demeure liquide après une heure au froid, c'est un signe de la production de protéases par la souche, car les protéases extracellulaires vont dégrader la gélatine empêchant la solidification de celle-ci.

Après une observation visuelle de la morphologie des colonies bactériennes, leur identification est faite par séquençage de l'ADN bactérien extrait. La méthodologie détaillée de l'extraction et de la purification se trouve en Appendice A et les solutions en Appendice B. À l'aide des séquences obtenues, les arbres de phylogénie correspondants à chacune des souches sont analysés afin de corréliser les nouvelles souches avec celles proches génétiquement. À des fins de comparaison, l'ADNr 16S

la souche de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 a aussi été séquencée en tant que contrôle de la méthode.

5.2 Température optimale pour la croissance bactérienne

Pour déterminer la température optimale de croissance, les souches sont inoculées dans des fioles Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de milieu semi-synthétique (1.5% de farine de soja; 0.5% de dextrose; 0.5% d'amidon de maïs; 0.1% de KH_2PO_4 ; 0.1% de K_2HPO_4 ; 0.03% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.002% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.002% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.1% de CaCO_3 ; ajuster le pH à 7.0 et stériliser à 121°C pendant 30 minutes à 15 psi; stériliser le dextrose et le MgSO_4 séparément) à partir de précultures (200 rpm, 12 heures, 55°C, cette température permettant la croissance d'une vaste gamme de thermophiles) en bouillon nutritif (0.3% d'extrait de viande; 0.5% de peptone de caséine; ajuster le pH à 7.0, stériliser à 121°C pendant 15 minutes à 15 psi). Chaque souche est incubée pendant 24 heures à 200 rpm à des températures différentes, c'est-à-dire 45, 55 et 65°C dans un incubateur agitateur. Des échantillons de 0.5 mL sont pris toutes les trois heures afin d'en déterminer les cellules totales et les spores et sont entreposés à 4°C afin de prévenir la biodégradation des échantillons, des cellules et des enzymes.

Les comptes de cellules totales et le μ_{max} permettront de déterminer quelles sont les températures optimales de croissance de chacune des souches (voir 5.11).

5.3 pH optimal pour la croissance bactérienne

En fioles Erlenmeyer de 500 mL (avec un volume de travail de 100 mL de milieu semi-synthétique) les bactéries sont cultivées à leur température optimale mais différentes fioles auront des pH différents. Elles sont toutesensemencées avec le même échantillon de départ et des échantillons sont prélevés aux trois heures durant

les 24 premières heures pour évaluer la croissance. Des pH de 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 et 8.5 sont testés.

5.4 Température de stabilité des protéases (Lamontagne, 2004)

Pour déterminer la température de stabilité des protéases, l'activité protéolytique est testée à différentes températures et à pH 8.2 (pH standard de ce test). Les échantillons de 24 heures des bioréactions en fioles Erlenmeyer sont choisis pour ces tests. Les températures testées sont 40, 50, 60 et 70°C. La mesure de l'activité protéolytique est décrite en 5.12.

5.5 pH de stabilité des protéases bactériennes (Lamontagne, 2004)

Lorsque la température de stabilité des protéases est connue, l'activité protéolytique est mesurée dans des conditions de pH différentes. Des pH de 6 à 12 sont testés. Les tampons utilisés sont dans l'Appendice C.

5.6 Croissance bactérienne et production de protéases en bioréacteurs

Les bioréactions à l'échelle de laboratoire sont effectuées à l'aide de bioréacteurs (fait maison par Biogénie) de 15 litres (volume de travail de 10 litres) équipés d'un système de contrôle automatique de l'oxygène dissous (OD), du pH, de la température, du taux d'aération, de la vitesse de l'agitation et de l'anti-mousse (voir la figure 4). Le bioréacteur est une cuve de 15 L en acier inoxydable à double couche, c'est-à-dire qu'il possède deux parois séparées par un espace. Cette cavité renferme le serpentín permettant le contrôle de la température du bioréacteur par l'écoulement d'eau chaude ou froide (eau de la ville entre 4 et 10°C selon la saison). À l'aide d'un système de valves, le serpentín permet aussi le passage de la vapeur, venant de la chaudière à vapeur, lors de la stérilisation du bioréacteur et de son contenu. De cette

façon, le milieu n'est pas en contact direct avec la vapeur. Le bioréacteur est aussi composé de quatre chicanes de 30 cm par 2 cm par 0.4 cm espacées de 90° l'une de l'autre. L'agitateur du bioréacteur est fait d'une tige cylindrique de 20 cm par 1.5 cm où sont disposées trois hélices agitatrices à six pales chacune (4 cm). Elles sont disposées à 6 cm l'une de l'autre le long de la tige de l'agitateur. Le couvercle plat, d'une épaisseur de 2 cm, comporte plusieurs ouvertures permettant l'introduction des différents injecteurs : air, base, acide et anti-mousse, tout en conservant la stérilité du bioréacteur. Ce couvercle sert aussi de support au brise-mousse mécanique composé d'une hélice de 10 cm de diamètre à deux pales inclinées. C'est le déplacement de l'air qui empêche la mousse de monter dans le bioréacteur. Ce dernier est relié à un système de pompes péristaltiques, elles-mêmes reliées à l'automate (fait maison par Biogénie). L'automate converti les instructions de l'ordinateur (Pentium IV avec le logiciel Fix 3.5 d'Intellution, USA) en commandes effectuées par les pompes ou les valves automatiques. L'automate converti également les informations des sondes du bioréacteur en données affichées à l'écran de l'ordinateur.

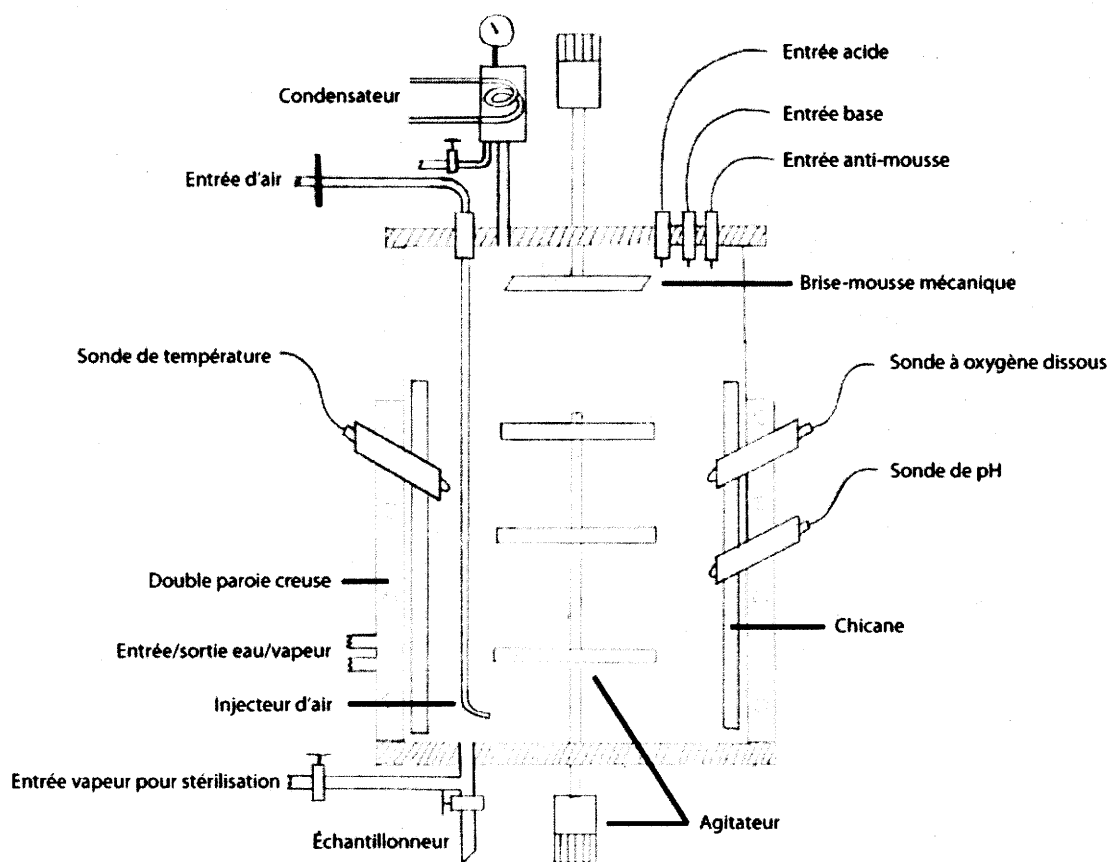


Figure 4 Schéma d'un bioréacteur en acier inoxydable de 15 litres de Biogénie.

Pour les souches de *Bacillus aestuarii* JP1 et JP2 et *Brevibacillus borstelensis*, les bioréactions sont effectuées à pH 7.0 alors que pour la souche de *Bacillus licheniformis*, le pH est de 7.5. Le pH est contrôlé automatiquement par l'ajout de NaOH 2N et de H₂SO₄ 2N contenus dans des bouteilles Nalgene® stérilisées et la température est ajustée à 55°C pour toute la durée de l'expérience. Le taux d'oxygène dissous est tenu au-dessus de 20%, autant que possible, par la variation de l'agitation (300-500 rpm) et de l'aération (0.25-5.0 L/min). La concentration d'oxygène est un paramètre important pour la croissance des bactéries aérobies, en raison de l'utilisation de l'oxygène dans les différents métabolismes (Gomes and Menawat,

2000). Certains auteurs suggèrent que la production de plusieurs enzymes (pour la transformation des antibiotiques) est dépendante, en partie, de la concentration d'oxygène qui doit être au-dessus de 50% (Rollins et al., 1990). Beg et al., (2003) suggère que l'oxygène au-dessus de 20% est suffisant pour la production de protéases.

La préparation des bioréacteurs prend environ une journée. Les sondes de pH à électrolyte à gel pressurisé (Mettler Toledo ELEC, 405-DPAS-SC-K8S/120) et d'oxygène dissous (Mettler Toledo, InPro6100/120/TN) sont calibrées de la manière suivante. La sonde à pH est tout d'abord plongée dans une solution tampon à pH 4. Lorsque la valeur sur le contrôleur devient stable, la calibration à pH 4 est effectuée. La même procédure est suivie pour le pH 7. Pour la sonde à oxygène dissous (OD), un réservoir d'azote est branché sur une bouteille contenant de l'eau et la sonde y est plongée. Lorsque l'OD indiqué sur le contrôleur est de 0%, la calibration du 0% de la sonde est effectuée. Par la suite, la même bouteille d'eau est branchée sur la sortie d'air ambiant (~21% d'oxygène) du contrôleur. Lorsque la valeur affichée atteint un maximum stable pendant 20 minutes, la calibration du 100% d'OD est effectuée.

Lorsque les sondes sont installées dans le bioréacteur, celui-ci est rempli du milieu à l'étude pour être ensuite stérilisé. La stérilisation du bioréacteur s'effectue à l'aide d'une chaudière à vapeur qui injecte de la vapeur dans la paroi du bioréacteur et non directement dans le milieu. La stérilisation commence lorsque la température atteint environ 121°C et la pression dans le bioréacteur atteint environ 15 psi. Cette stérilisation dure 30 minutes. Après la stérilisation, la sonde à OD est calibrée une seconde fois de la même manière, mais l'azote et l'air ambiant stérile sont injectés directement dans le bioréacteur. La sonde à pH ne peut pas être calibrée une seconde fois, car variation de pH changerait le milieu de culture.

Le bioréacteur est inoculé stérilement (à l'aide d'un brûleur) avec une préculture de même nature que le milieu contenu dans le bioréacteur. Cette préculture est âgée de

12 heures et son volume est de 3% (paramètres standards pour la production de produits à valeur ajoutée).

Le pH et la température utilisés pour les expériences sont ceux déterminés comme optimaux. L'agitation et l'aération varient durant les expériences afin de conserver, le plus longtemps possible, l'oxygène dissous supérieur à 20%. La mousse est contrôlée de deux façons, à l'aide d'un brise mousse mécanique et avec de l'anti-mousse chimique stérile, le Polypropylène glycol (LabMat). La surveillance de la mousse se fait de manière visuelle et en tant réel, car elle fluctue rapidement.

Puisque la concentration en cellules diminue, en générale, après 24 heures et que le maximum d'activité protéolytique survient toujours avant 48 heures, la durée des bioréactions est fixée à 48 heures avec des échantillonnages stériles (~10 mL) aux trois heures pendant les 24 premières heures et trois autres échantillonnages à 30, 36 et 48 heures, le tout pour un total de 12 échantillons. Ces derniers sont rapidement refroidis dans la glace avant d'être entreposés dans une chambre froide à 4°C. Tous les tests sur les échantillons sont effectués dans les 72 heures suivant la fin de la bioréaction.

Les expériences de comparaison en bioréacteurs ont été effectuées en milieu semi-synthétique (composition semblable au milieu semi-synthétique de l'optimisation des paramètres) et en boues d'épuration secondaires de la station d'épuration des eaux usées de la Ville de Québec (station Est).

5.7 Comparaison entre le milieu semi-synthétique et les boues d'épuration municipales

Toutes les souches sont cultivées en bioréacteur dans le milieu semi-synthétique (voir 5.2) et en boues d'épuration à 25 g/L de MES (voir 2.1.3). L'effet des différents milieux est évalué par les cellules totales, les spores et l'activité protéolytique.

5.8 Effet de la concentration en matières en suspensions (Drouin, 2005)

Pour toutes les souches, des concentrations de 15, 25 et 35 g/L de MES sont testées en bioréacteur. Après l'échantillonnage à la station de traitement, les bidons de boues réfrigérés sont décantés afin de retirer le surnageant en trop et ainsi concentrer les boues. Le surnageant retiré est conservé. Les boues sont concentrées à environ 60 g/L et diluées par la suite avec le surnageant qui a été retiré pour obtenir la concentration voulue. Un analyseur d'humidité à halogène (Mettler Toledo HR83-P) est utilisé pour mesurer les solides des boues.

5.9 Effet de l'augmentation de l'oxygène dissous (OD)

Deux méthodes sont utilisées pour augmenter l'oxygène dissous lorsque l'agitation et l'aération sont maximales et que l'OD tend à descendre sous la barre minimale de 20%. La première consiste à pressuriser le bioréacteur. La sortie d'air du bioréacteur possède une vanne permettant de réduire le débit de sortie de l'air et ainsi faire augmenter la pression. Le bioréacteur possède aussi une jauge à pression indiquant la pression réelle à l'intérieur du bioréacteur. Celui-ci peut donc être soumis à une pression. La deuxième méthode est d'utiliser un réservoir à oxygène pur au lieu de l'air ambiant possédant ~21% d'oxygène. Le réservoir est branché directement sur le bioréacteur en passant par un rotamètre permettant le suivi du débit. Ce débit est contrôlé par le détendeur situé sur le réservoir d'oxygène. La mesure de l'efficacité

de ces méthodes se fait en mesurant la croissance bactérienne, les spores et l'activité des protéases.

5.10 Effet d'une baisse de température pour augmenter l'oxygène dissous (OD)

La Loi de Henry démontre que plus la température d'un liquide est élevée, moins les gaz y sont dissous. Dans le but de diminuer l'impact d'une baisse d'oxygène dissous durant la phase exponentielle de croissance de *B. aestuarii* JP1 et JP2, la température de bioréaction est diminuée de 55 à 40°C. Les bioréactions sont effectuées dans le milieu semi-synthétique à base de farine de soja sur les deux souches de *B. aestuarii*, JP1 et JP2. La mesure de l'efficacité de cette méthode se fait en mesurant la croissance bactérienne et la production de protéases.

5.11 Décompte des cellules totales et spores (APHA-AWWA-WPCF, 1995)

La méthode pour déterminer les cellules totales et les spores est la même pour les échantillons prélevés des expériences en fioles Erlenmeyer ou en bioréacteurs. Pour les cellules totales, chacun des échantillons réfrigérés est dilué (0.5 mL dans 4.5 mL) de 10^3 à 10^6 , selon l'âge de la culture, dans des tubes de saline (0.85% de NaCl). Pour trois dilutions consécutives, 100 μ L de ces dilutions sont inoculés sur des géloses nutritives, en duplicata, et ces pétris sont incubés 24 heures à 55°C. Le décompte de cellules totales se fait en comptant les unités formatrices de colonies par millilitres (ufc/mL) sur les pétris contenant de 30 à 300 ufc/ml. L'erreur de la méthode est évaluée à 7%.

Pour les décomptes de spores, les mêmes tubes à dilutions utilisés pour les cellules totales sont plongés dans un bain-marie à 80°C pour 20 minutes. Par la suite, chaque

dilution est étalée sur une gélose et les ufc/mL sont mesurées de la même manière que pour les cellules totales. L'erreur de la méthode est évaluée à 7%.

5.12 Mesure de l'activité protéolytique (Kunitz, 1947)

Toutes les mesures de l'activité protéolytique pour l'optimisation ou pour les échantillons des expériences ont été faites avec la méthode de Kunitz (Kunitz, 1947). Les échantillons récoltés durant les bioréactions sont centrifugés dans des tubes Eppendorf de 2 mL à 8000 rpm (7650 g) et à 4°C pour éviter la dénaturation des enzymes. Les protéases se trouvent dans le surnageant et le culot peut être rejeté. Les échantillons de surnageant sont ensuite dilués, si nécessaire, dans le tampon borate pH 8.2 (1.36% d'acide borique; 0.29% de NaCl; 1.91% de borate de sodium). Dans des éprouvettes, 5 mL d'une solution de caséine à 1.2% dans un tampon borate à pH 8.2 sont incubés pendant cinq minutes dans un bain-marie agitateur à la température de stabilité des protéases mesurée préalablement. Pour chacun des échantillons, il y a un blanc correspondant puisque la composition des échantillons varie durant la bioréaction. La figure 5 montre le déroulement du test. Lorsque la solution de caséine a incubé pendant 10 minutes, 1 mL de la solution d'enzymes est ajouté au tube à essai et incubé pendant 10 minutes dans le bain-marie. Pour terminer la réaction de la caséine avec les protéases, 5 mL d'une solution d'acide trichloroacétique modifiée (1.80% d'une solution d'acide trichloroacétique 50% p/v; 2.99% d'une solution d'acétate de sodium 1M; 1.90% d'une solution d'acide acétique 1M) sont ajoutés et les tubes sont incubés pendant 30 minutes. Pour le blanc, 5 mL de la même solution de TCA sont ajoutés à la réaction **avant la solution d'enzymes** afin de faire précipiter la caséine instantanément. Ensuite, 1 mL de la solution d'enzymes est ajouté et les tubes sont incubés pendant 30 minutes dans le bain-marie. Dans le blanc, la caséine va précipiter avec le TCA avant que l'échantillon de protéases ne soit ajouté dans le tube. De cette façon, l'effet des protéases est annulé ce qui donne le

blanc. Tous les échantillons et leurs blancs correspondants sont filtrés à l'aide d'une pompe vacuum et de filtres de 0.45µm.

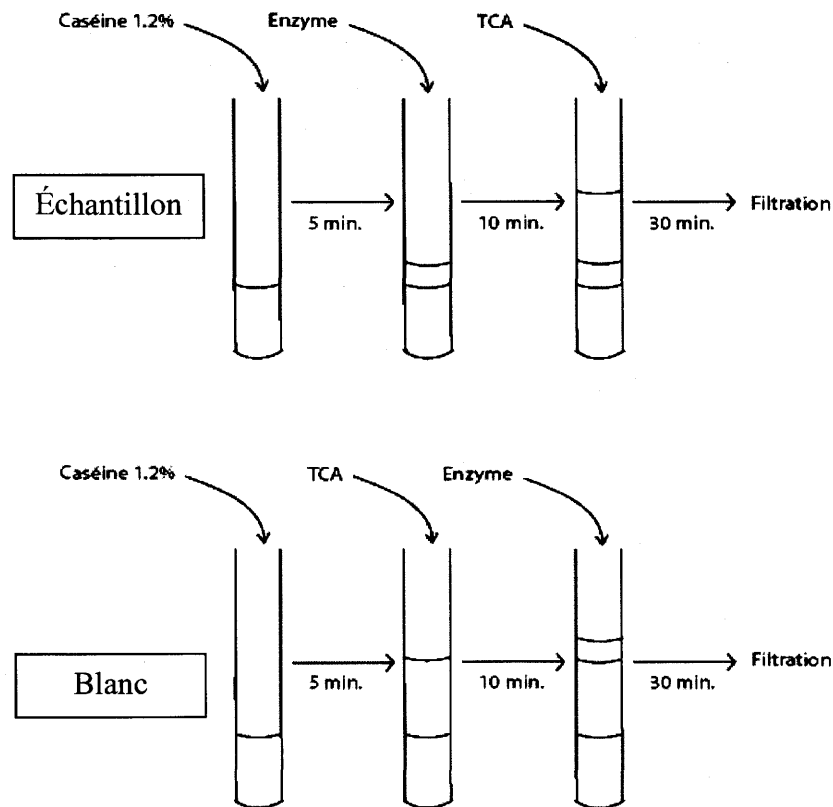


Figure 5 Étapes de la méthode pour l'évaluation de l'activité protéolytique et l'élaboration des blancs correspondants.

La quantité de tyrosine relâchée de la caséine par les protéases peut être mesurée au spectrophotomètre à 275 nm dans des cuvettes au quartz. À l'aide d'une courbe standard de tyrosine (0 à 1000 mg/mL), il est possible de convertir l'absorbance en concentration de tyrosine qui est ensuite convertie en Unité internationale par millilitre (UI/mL) en utilisant l'équation suivante. L'erreur sur la méthode est évaluée à 7%.

Équation 1 Mesure de l'activité protéolytique

$$AP(UI/mL) = \frac{Conc.Tyr.(\mu mole/L)}{10\text{ min.} \times 10^3\text{ mL}} \times 11\text{ mL} \times \text{Facteur de Dilution}$$

Chapitre VI

Résultats et discussion

6.1 Isolation et identification des souches bactériennes thermophiles

La Ville de Québec possède deux stations pour le traitement de ses eaux usées, la station Ouest, située dans le Parc Technologique et la station Est, à Beauport. Les deux usines sont construites exactement sur le même modèle et utilisent la même chaîne de traitement à l'exception du fait que la station Ouest pompe ses boues (primaires et secondaires) dans les réservoirs de décantation de la station Est. Celle-ci étant à proximité de l'incinérateur municipal, il est plus simple d'y envoyer les boues afin de les déshydrater et ensuite de les incinérer.

Quatre souches bactériennes thermophiles ont été isolées des boues d'épuration secondaires municipales de la station Est de la Ville de Québec. Ces échantillons ont été récoltés en septembre 2005. Grâce au séquençage, ces quatre souches ont été identifiées en utilisant le site Internet BLAST du National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et les séquences ont été soumises au GenBank de ce même centre. L'algorithme (Zhang et al., 2000) utilisé est le MEGABLAST (optimisé pour les séquences hautement similaires). L'identification indique qu'il y a deux souches très proches de *Bacillus aestuarii* qui seront nommées JP1 (GenBank GQ918255) et JP2 (GenBank GQ918256). Les deux autres souches isolées et identifiées sont *Brevibacillus borstelensis* (GenBank GQ918257) et *Bacillus licheniformis* (GenBank GQ918258).

La figure suivante montre les différences visuelles entre les deux souches.

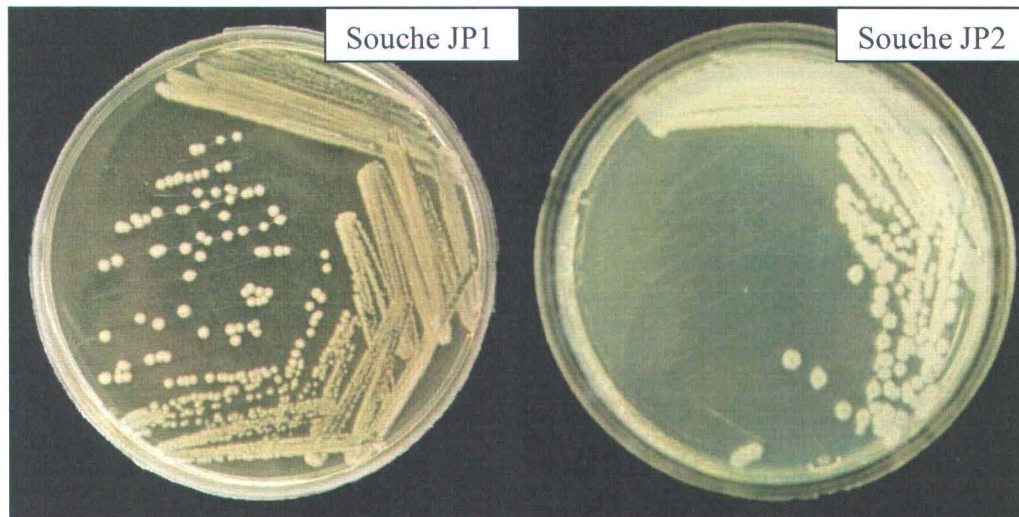


Figure 6 Colonies de *Bacillus aestuarii* JP1 et JP2 sur gélose nutritive.

Les colonies de *B. aestuarii* JP1 mesurent entre deux et trois millimètres, sont rondes, ont un relief plat, à bords réguliers et surface lisse et il en est de même pour les colonies de *B. aestuarii* JP2. Par contre, les couleurs sont clairement différentes. Lors de l'ensemencement des souches, les géloses sont légèrement opaques (comme sur la photo de JP2). Après 24 heures d'incubation à 50°C, la souche JP1 montre une couleur jaunâtre de même que le milieu de culture qui est aussi plus transparent. Les colonies de JP2 sont plutôt blanchâtres et le milieu de culture n'a pas changé de couleur. En plus de ces différences, les résultats des sections suivantes permettront clairement d'établir la différence entre ces deux souches.

À noter, dans l'Appendice D, dans l'article intitulé *Production of thermostable protease enzyme in wastewater sludge using thermophilic bacterial strains isolated from sludge*, les deux souches bactériennes sont nommées AC et D. Au moment de la rédaction de cet article, les deux souches n'étaient pas identifiées. La souche AC correspond à JP2 et la souche D correspond à JP1.

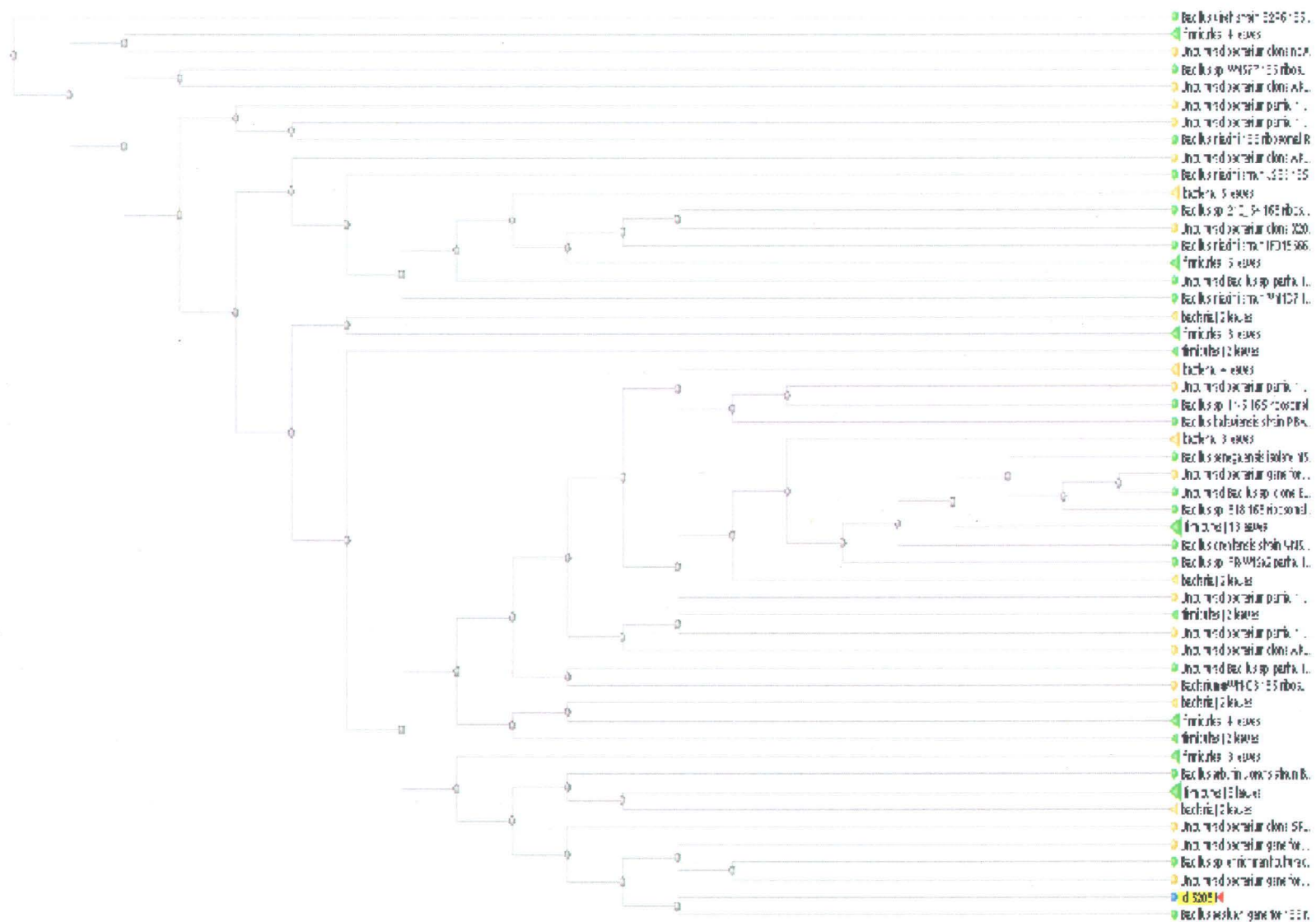


Figure 7 Arbre de phylogénie de *Bacillus aestuarii* JP1.

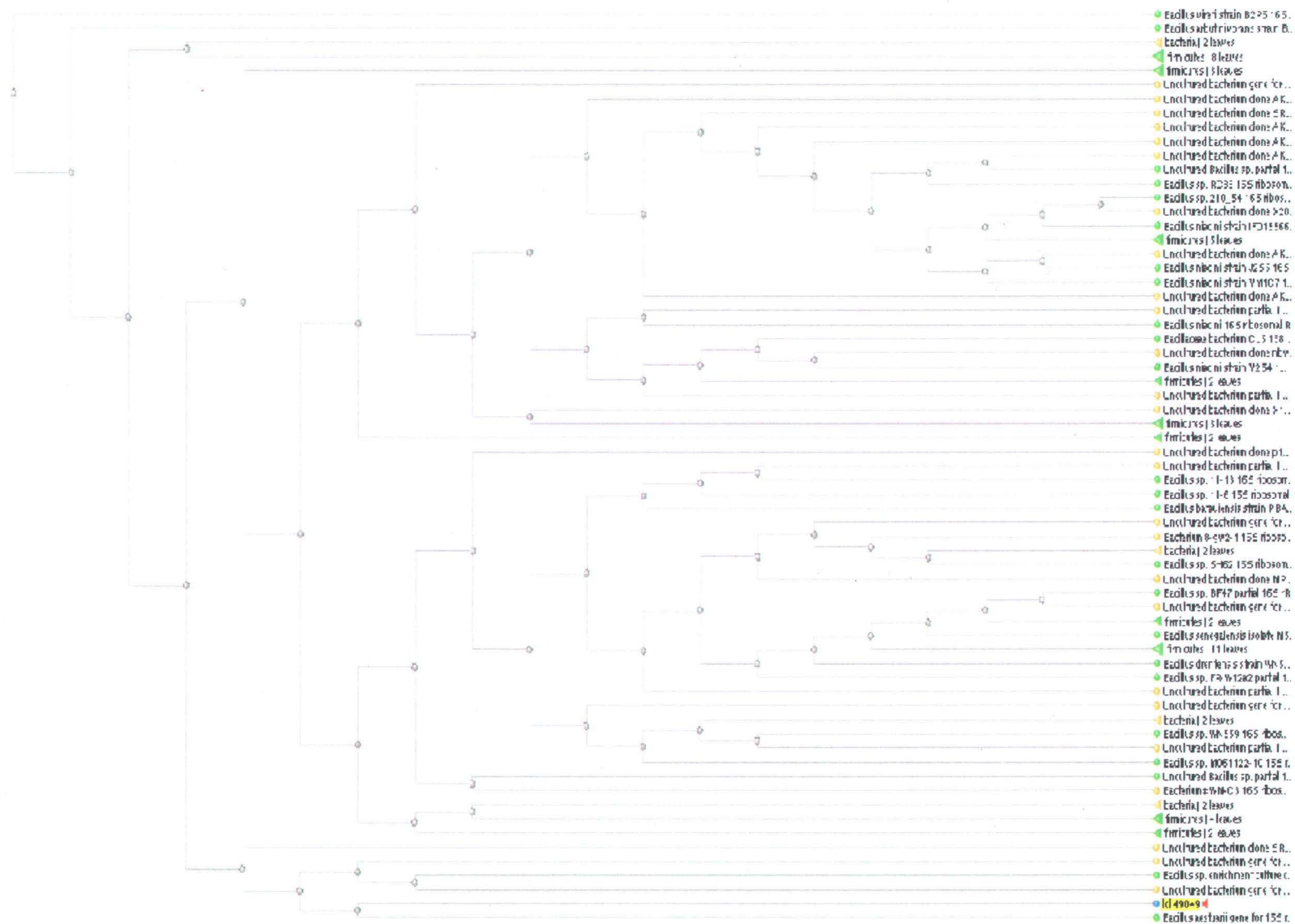


Figure 8 Arbre de phylogénie de *Bacillus aestuarii* JP2.

La figure 7 montre que la première souche isolée s'apparente, avec un pourcentage d'identité de 98%, à *Bacillus aestuarii* (GenBank : AB062696.1), découvert par Ando et al. en 2001.

La figure 8 montre l'arbre de phylogénie de la deuxième souche, indiquant aussi son appartenance à *Bacillus aestuarii* (GenBank : AB062696.1) avec un pourcentage d'identité, lui aussi, de 98%. **Jusqu'à maintenant, aucun groupe de recherche n'a effectué d'études sur cette espèce bactérienne.**

La troisième souche identifiée est *Brevibacillus*. La figure 9 montre la croissance de *Bv. borstelensis* sur une gélose nutritive.



Figure 9 Colonies de *Brevibacillus borstelensis* sur gélose nutritive.

Les colonies mesurent entre trois et six millimètres de diamètre, sont jaunâtres, de formes irrégulières, plates, à bords réguliers et de surface lisse. Comme pour *B. aestuarii* JP1, la gélose semble plus transparente après l'incubation. L'arbre de phylogénie suivant indique un pourcentage d'identité de 98% apparentant cette souche à *Brevibacillus borstelensis* (GenBank : FJ982663.1) découverte par Uhm et Yun en 2009.

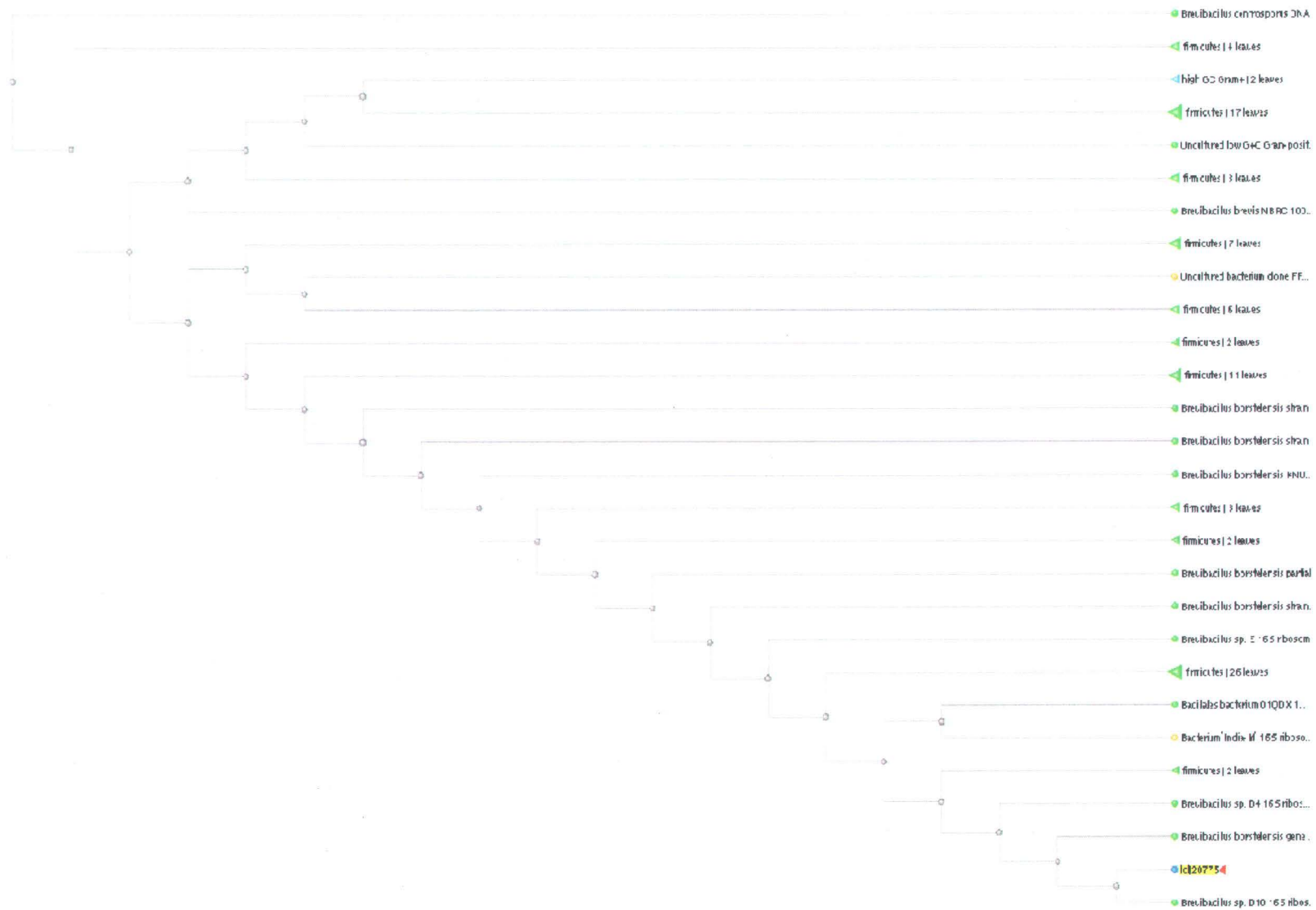


Figure 10 Arbre de phylogénie de *Brevibacillus borstelensis*.

Les bactéries du genre *Brevibacillus* sont reconnues pour leur production d'enzymes permettant la dégradation de différents substrats. En effet, *Brevibacillus borstelensis* 707, lorsqu'en contact avec du polyéthylène, forme un biofilm qui permet le contact direct des enzymes et des bactéries sur le plastique (Hadad et al., 2005). Une autre espèce, *Brevibacillus sp.* KH3, est utilisée dans la digestion des boues activées grâce aux protéases qu'elle sécrète ainsi que sa résistance à de hautes températures (Li et al., 2009). Dans le domaine des biopesticides, *Brevibacillus laterosporus* G4 produit une protéase extracellulaire montrant un pouvoir nématocidal (contre les nématodes). Le surnageant de la culture de cette bactérie montre qu'il existe une protéase extracellulaire, produite par la bactérie, qui tue les nématodes en moins de 12 heures (Huang et al., 2005).

La dernière souche identifiée est *Bacillus licheniformis*. Les colonies des bactéries de l'espèce de *Bacillus licheniformis* possèdent sensiblement les mêmes caractéristiques morphologiques que la souche de référence *Bacillus licheniformis* ATCC 21424, reconnue pour sa grande production de protéases alcalines.

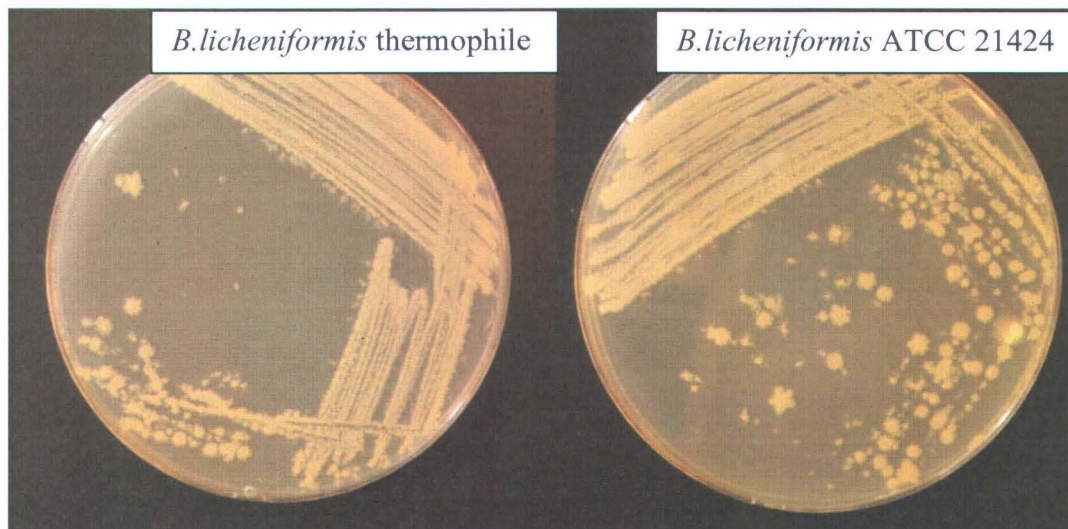


Figure 11 Colonies de *Bacillus licheniformis* (souche isolée et ATCC 21424) sur gélose nutritive.

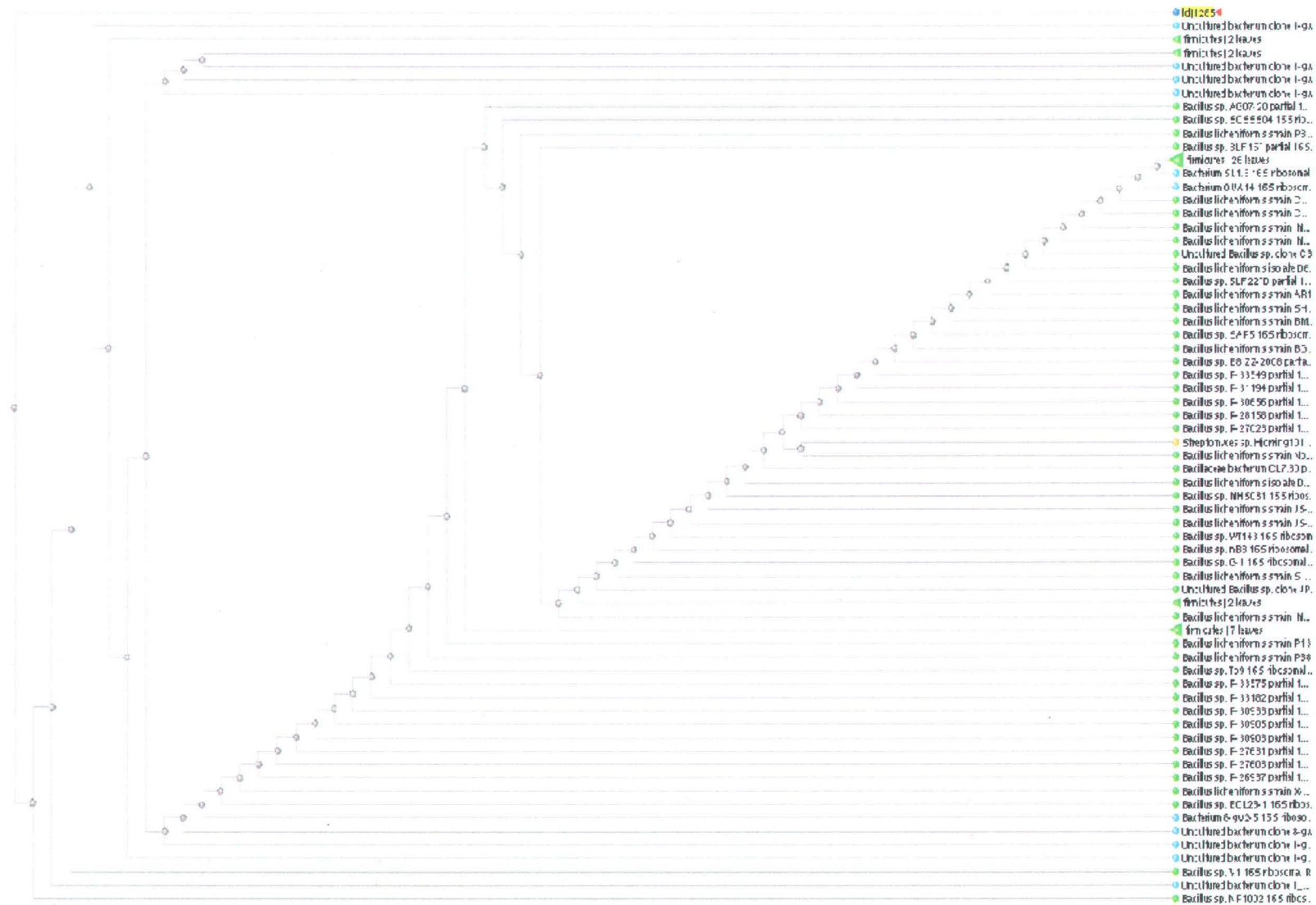


Figure 12 Arbre de phylogénie de *Bacillus licheniformis*.

Les colonies de *B. licheniformis* mesurent entre trois et six millimètres de diamètre, sont jaunâtres, de formes irrégulières, plates, avec des bords réguliers et une surface rugueuse. La figure 12 montre qu'elle est apparentée, avec un pourcentage d'identité de 95%, à *Bacillus licheniformis* 6A (GenBank : EU998983.1) découverte par Elvira et al. en 2008. *Bacillus licheniformis* est très connue pour sa production de protéases.

Une cinquième souche a aussi été séquencée afin de vérifier la méthode. *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 est une souche très bien connue pour sa production de protéases. Elle est actuellement utilisée dans d'autres recherches sur la valorisation de divers rejets municipaux et industriels dans les laboratoires du Prof. Tyagi (Bezawada et al., 2009; Drouin et al., 2008; Drouin, 2005; Meunier, 1999). Les résultats obtenus de ces recherches seront utilisés pour comparer avec les quatre souches étudiées dans cette thèse. La figure 13 montre l'arbre de phylogénie de la souche ATCC 21424. Elle est apparentée, avec un pourcentage d'identité de 99%, à la souche de *Bacillus licheniformis* D14A3 étudiée par S. Lokegaonkar et son équipe en 2009.

Bacillus licheniformis peut produire des enzymes comme des protéases, des amylases, des pénicillinases et des cellulases, utilisées dans divers domaines comme dans l'industrie des détergents, alimentaire, des textiles, du papier et pharmaceutique en plus d'autres produits comme des antibiotiques (bacitracines), des solvants (glycérol) et divers polypeptides (Archana and Satyanarayana, 2003; Gupta et al., 2003; Perego et al., 2003; Meunier, 1999).

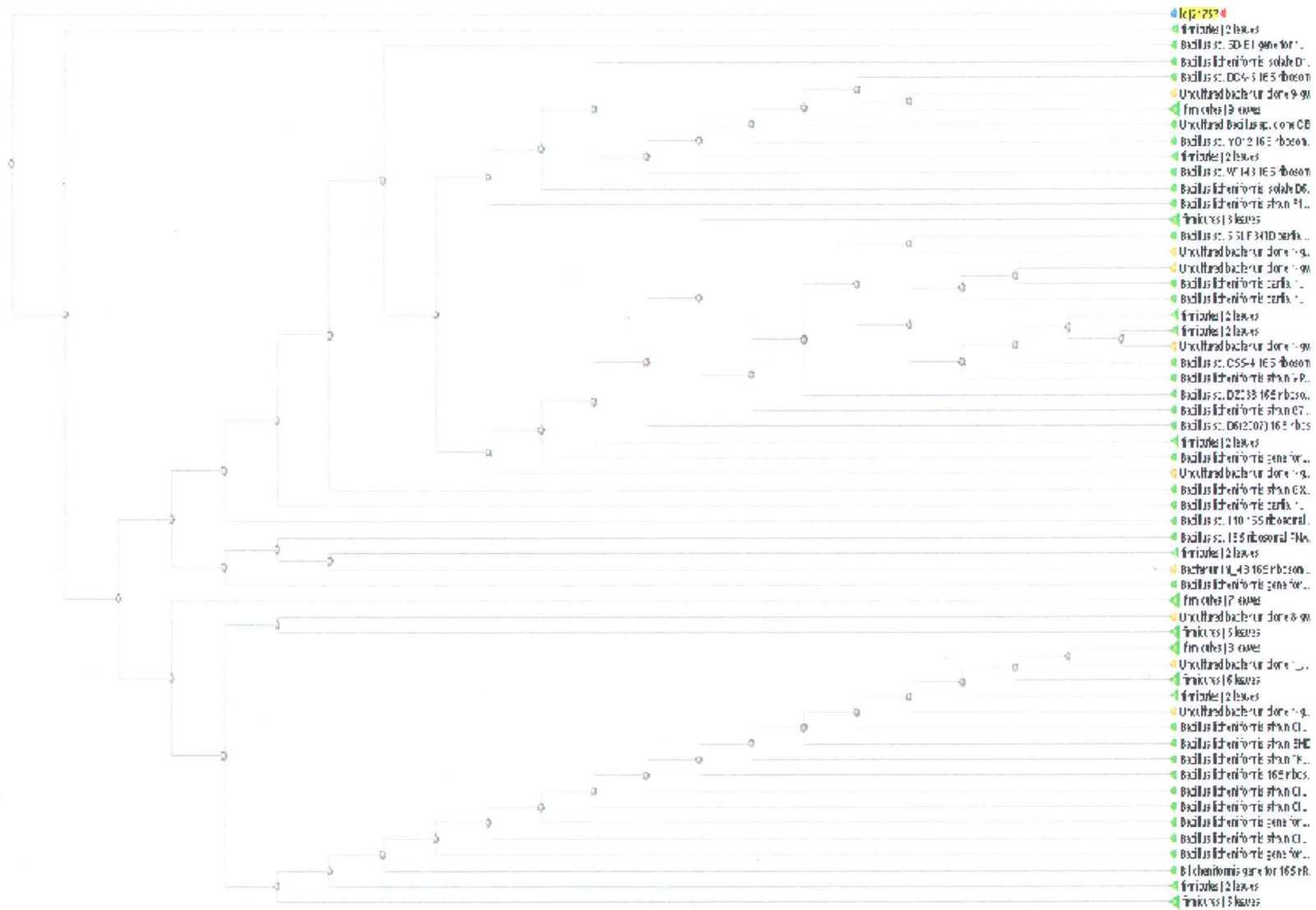


Figure 13 Arbre de phylogénie de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424.

L'arbre de phylogénie suivant (créé grâce au logiciel CLC bio) indique clairement que les quatre souches isolées des boues d'épuration de la Ville de Québec sont différentes les unes des autres ainsi que de la souche de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424.

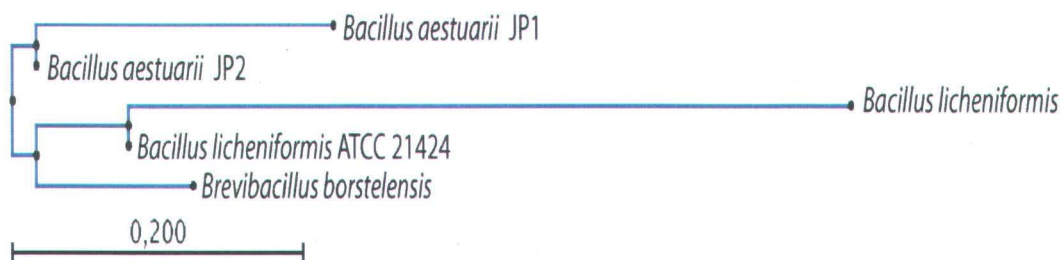


Figure 14 Arbre de phylogénie des quatre souches et de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424.

6.2 Température de croissance optimale

La température à laquelle les bactéries sont soumises pour leur croissance est très importante. En effet, la température influence plusieurs aspects de la culture de bactéries. Lorsque la température devient trop élevée, plusieurs organelles, membranes, ribosomes et ARNr subissent des dommages irréversibles (Mackey et al., 1991), ralentissant ainsi la croissance. C'est pour cela qu'il est important de déterminer la température optimale de croissance, cette température permettant d'avoir un taux de croissance maximal, une biomasse maximale, des enzymes fonctionnant à un régime élevé et une dénaturation de ces enzymes, des composantes des cellules et des protéines minimale. Les résultats obtenus sous ces conditions laissent entrevoir le potentiel des bactéries à former des protéases thermostables. La figure 15 montre les profils de croissance (cellules totales) pour la souche de *B. aestuarii* JP1 à différentes températures, dans le milieu semi-synthétique. Elle indique que la température optimale de croissance de cette souche se situe tout près de 55°C. En effet, les cellules totales atteignent environ 1×10^9 ufc/mL, alors que pour les températures de 45 et 65°C, les cellules totales n'atteignent pas 1×10^8 ufc/mL

montrant une nette différence de plus d'un log avec les cellules totales à une température de 55°C. Il est aussi possible de remarquer qu'à une température de 65°C, la phase de latence est plus longue par rapport aux autres températures.

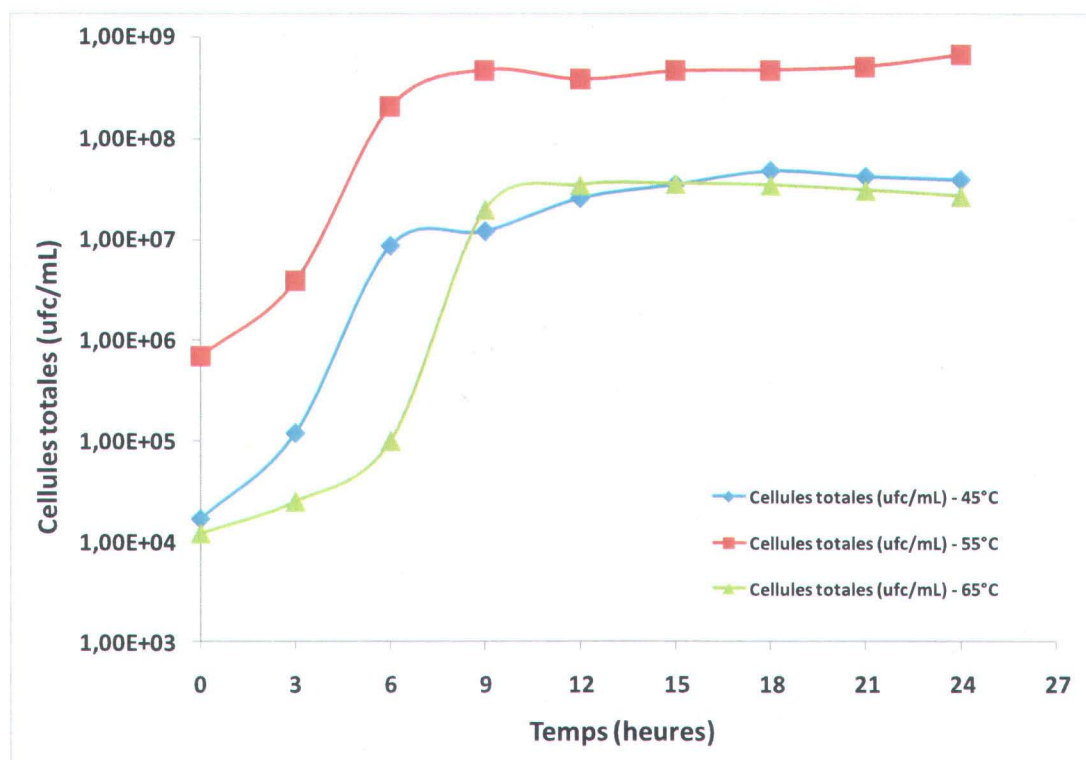


Figure 15 Profils de croissance de la souche *B. aestuarii* JP1 à différentes températures (45, 55 et 65°C) dans des fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu semi-synthétique.

Pour la souche de *B. aestuarii* JP2, dans les mêmes conditions de croissance que JP1, la figure 16 montre que 55°C est aussi la température optimale pour la croissance en atteignant un nombre de cellules totales d'environ 1×10^8 ucf/mL. Encore là, la température de 65°C n'atteint pas 1×10^7 ucf/ml et montre une phase de latence plus longue que pour les autres températures. Par contre, les cellules totales pour la température de croissance de 45°C sont très légèrement sous les valeurs de 55°C. La figure 16 suggère que la température optimale pour cette souche se situe aux alentours de 55°C.

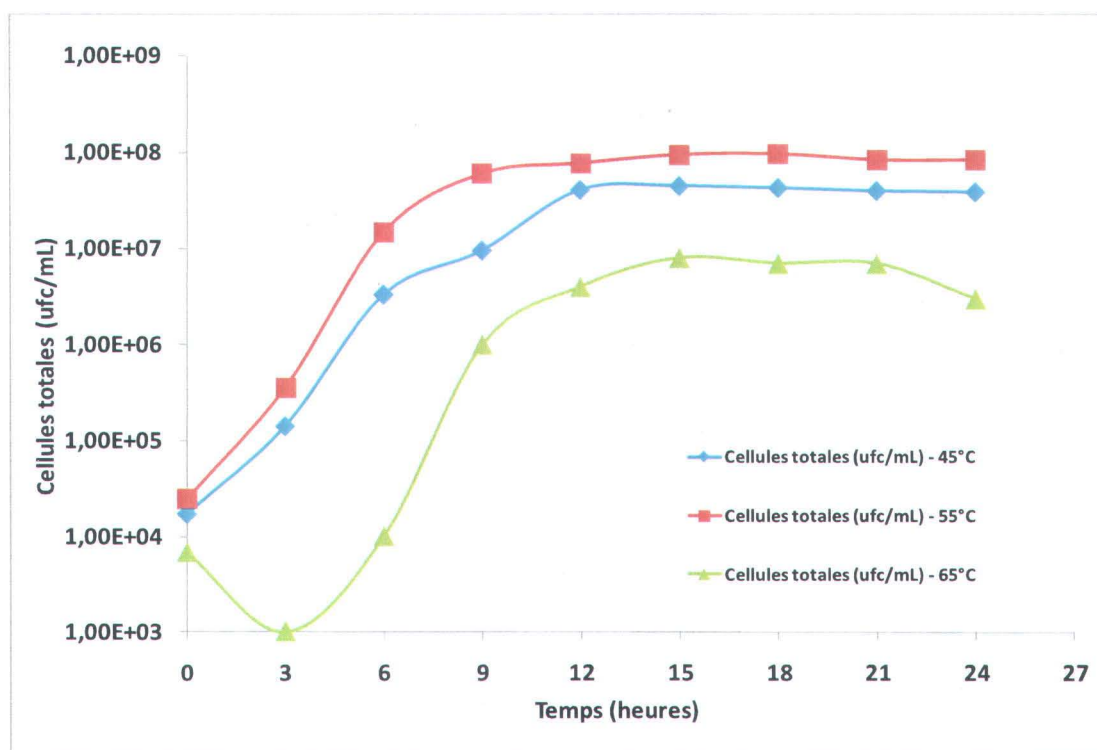


Figure 16 Profils de croissance de la souche *B. aestuarii* JP2 à différentes températures (45, 55 et 65°C) dans des fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu semi-synthétique.

Pour la souche de *Brevibacillus borstelensis*, la figure 17 montre qu'encore là, la température de 55°C propose la plus grande concentration de cellules totales en atteignant une valeur un peu au-dessus de 1×10^7 ufc/mL. Pour les deux autres températures, 45 et 65°C, les valeurs sont sous les 1×10^7 ufc/mL, mais légèrement au-dessus de 1×10^6 ufc/mL. Il est aussi possible de remarquer dans la figure 17 que les phases exponentielles de croissance suivent le même profil. Toutefois, à partir de 12 heures d'incubation, les expériences à 45 et 65°C atteignent un plateau alors que la multiplication des cellules à 55°C se poursuit. Dans tous les cas, il est possible de voir une diauxie. Ceci est explicable par la métabolisation de deux sources de carbone différentes. Dans le cas présent, le milieu semi-synthétique fournit plusieurs différentes sources de carbone pour la croissance de ce microorganisme. Indépendamment de la température de croissance, cette bactérie utilise un premier

substrat préférentiellement et un deuxième par la suite, lorsque le premier est épuisé, ce qui provoque une deuxième phase de latence. Cette diauxie n'est pas visible chez les autres souches. Cela suggère qu'elles utilisent un substrat durant toute la durée de la bioréaction, mais il est possible aussi que la phase de latence entre les deux substrats ne soit pas perceptible. Ceci peut être dû au fait que les échantillonnages se font aux trois ou six heures, réduisant la précision des courbes.

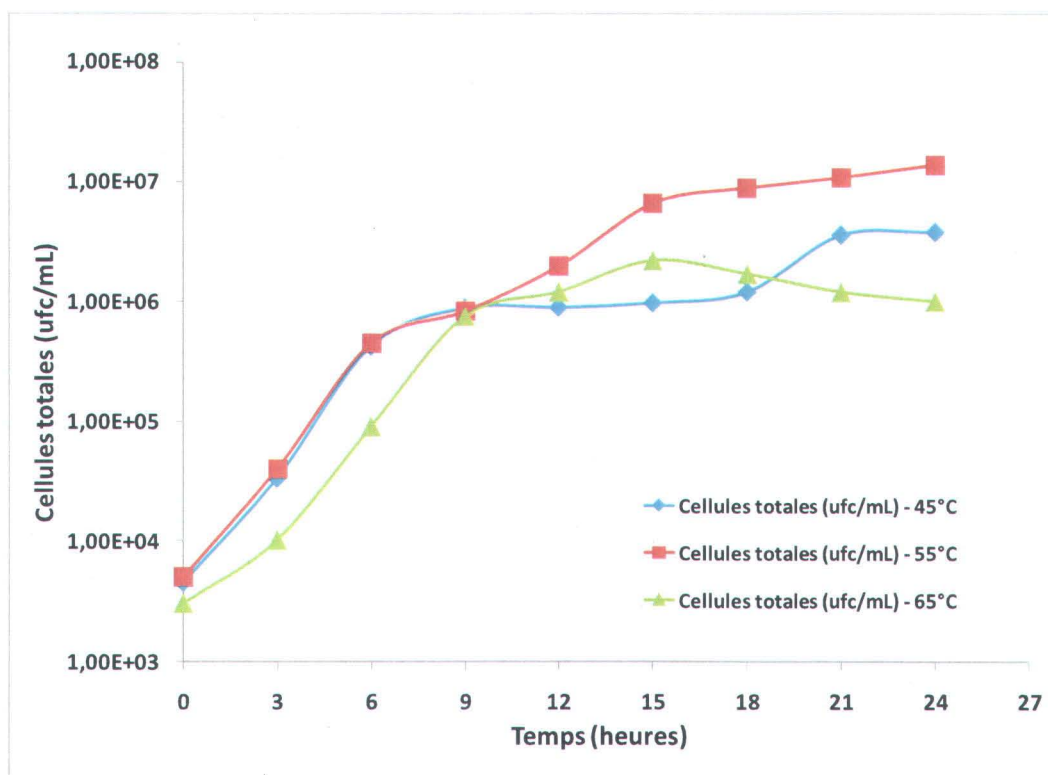


Figure 17 Profils de croissance de la souche *Bv. borstelensis* à différentes températures (45, 55 et 65°C) dans des fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu semi-synthétique.

La figure 18 montre les profils de cellules totales pour la souche de *B. licheniformis*. Cette souche montre aussi un maximum de cellules totales à une température de 55°C en atteignant une biomasse de près de 1×10^8 ufc/mL alors que les températures de 45 et 65°C montrent des maximums un peu en-dessous de 1×10^7 ufc/mL et un peu au-

dessus de 1×10^6 ufc/mL respectivement. Encore là, les profils de croissance durant la phase exponentielle se ressemblent, mais le maximum de cellules est optimal à 55°C.

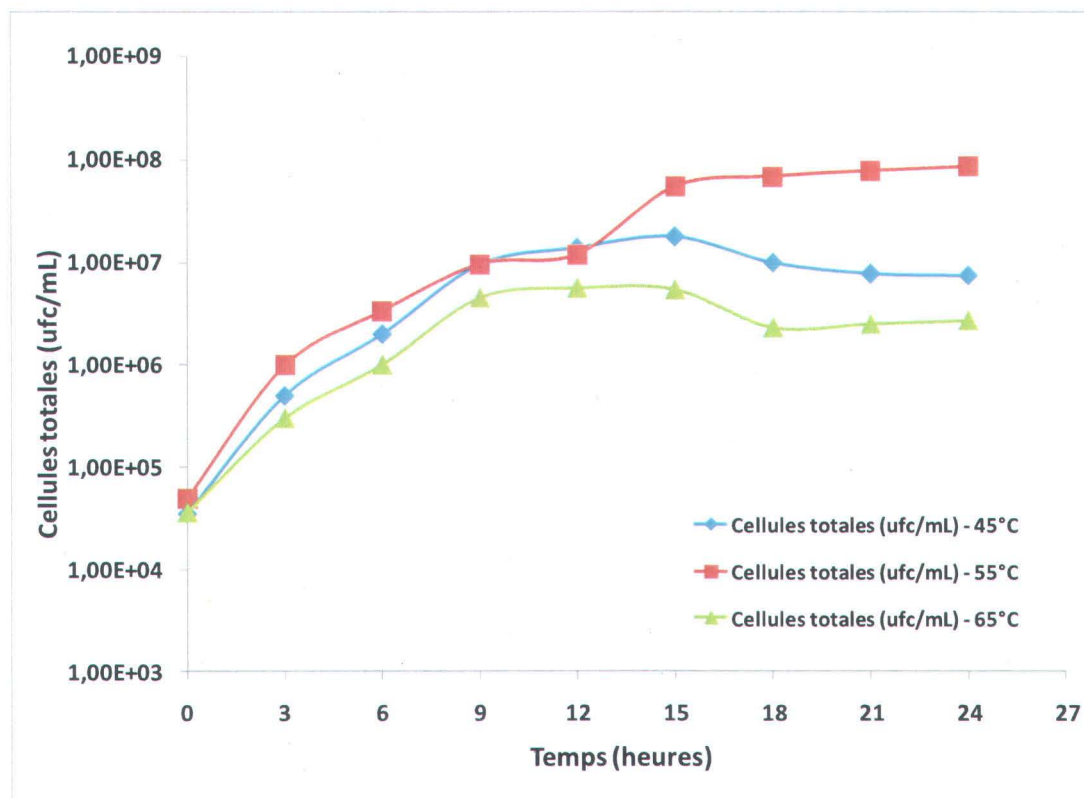


Figure 18 Profils de croissance de la souche *B. licheniformis* à différentes températures (45, 55 et 65°C) dans des fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu semi-synthétique.

Plusieurs études ont démontré que des souches thermophiles isolées de résidus biologiques peuvent produire des protéases alcalines performantes à des températures élevées. *Bacillus* sp. JB-99, isolée de résidus de cannes à sucre, produit des protéases à une température optimale de 55°C (Johnvesly et Naik, 2001) alors que *Bacillus stearothermophilus* TLS33, isolée d'une source thermique, produit des protéases à 65°C (Sookkheo et al., 2000). Une température de 55°C pour la croissance thermophile suggère que des enzymes thermophiles seront produites. Cette température permet aussi de faire des économies sur la production en comparaison à

d'autres cultures thermophiles qui se font à plus de 80°C et qui nécessitent des coûts plus élevés de chauffage.

6.3 pH optimal pour la croissance bactérienne

Le pH est un facteur important pour la croissance bactérienne. Pour plusieurs auteurs, le contrôle du pH est nécessaire pour obtenir une production d'enzymes supérieure (Frankena et al., 1986; Moon and Paruleka, 1993). En effet, un pH équilibré et optimal aurait comme conséquence de préserver le potentiel d'oxydo-réduction de chaque côté de la membrane bactérienne. Le gradient électrochimique transmembranaire ainsi conservé permet, chez les bacilles, d'effectuer les réactions nécessitant de l'énergie comme le transport des solutés, la synthèse d'ATP et la mobilité (Taber, 1993). Selon d'autres auteurs, le pH environnant ne doit pas être contrôlé (van Putten et al., 1996). Bien que l'avis des chercheurs soit contradictoire, il a été décidé de contrôler le pH lors des bioréactions. Pour déterminer le pH optimal, chaque bactérie a été inoculée dans cinq pH différents (6.5, 7.0, 7.5, 8.0 et 8.5) en fioles Erlenmeyer. La plupart des bacilles étudiées ont leur optimum de pH entre 7.0 et 8.0 et c'est pour cette raison que ce spectre de pH a été choisi. La figure 19 indique l'effet du pH sur la croissance bactérienne.

Pour les souches de *Bacillus aestuarii* JP1 et JP2 et pour *Brevibacillus borstelensis*, le pH optimal pour la croissance bactérienne est de 7.0. La souche de *Brevibacillus borstelensis* SH169 possède un optimum de pH de 6.8 (Tsai et al., 2007). Pour *Bacillus licheniformis*, le pH optimal est de 7.5, identique au pH optimal de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 (Drouin et al., 2008). Ces bactéries ont un pH optimal de croissance neutre. Il est supposé que les pH de stabilité des protéases sera alcalin, plus élevé que le pH de croissance.

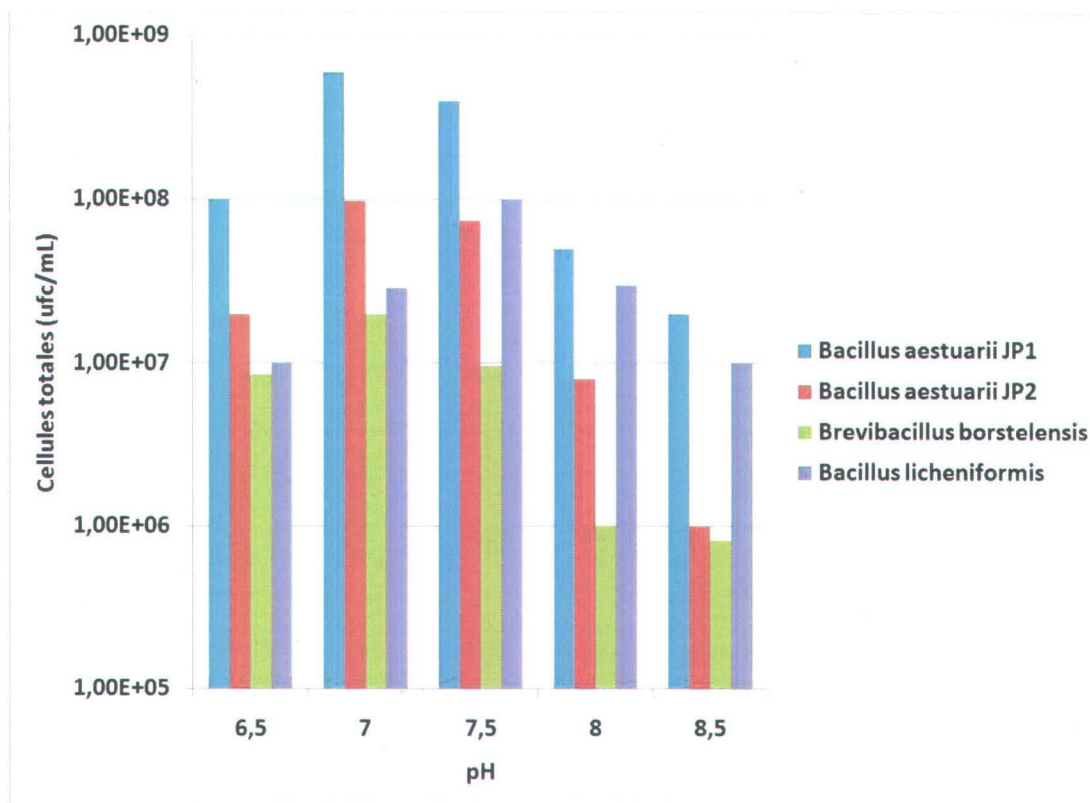


Figure 19 Maximums des cellules totales des quatre souches bactériennes isolées des boues d'épuration municipales à différents pH (6.5, 7.0, 7.5, 8.0 et 8.5).

6.4 Température de stabilité des protéases

Comme pour la température optimale de croissance, la température de stabilité des enzymes est importante et est bien souvent différente de la première. Les enzymes sont plus efficaces à des températures élevées, mais sont aussi plus instables (Illanes, 2008). En effet, les enzymes prennent une certaine conformation tout dépendant de la température environnante et les sites actifs des enzymes sont plus accessibles sous certaines conformations. Des molécules comme les chaperonines permettent aux enzymes de résister aux températures élevées, et souvent, elles leur donnent une conformation active à plus haute température. Lorsque les températures deviennent trop élevées, les enzymes sont dénaturées et désactivées par agrégation moléculaire ou par une mauvaise conformation (Bommarius and Broering, 2005; Horton et al.,

1994; Misset, 1993). La stabilité est très importante dans leurs applications en industries où les conditions environnementales peuvent varier. C'est pourquoi il est important de déterminer la température de stabilité enzymatique.

La figure 20 montre l'activité protéolytique des quatre différentes souches bactériennes isolées des boues d'épuration. Ces activités ont été mesurées à différentes températures afin de déterminer à laquelle de ces températures les protéases sont les plus stables.

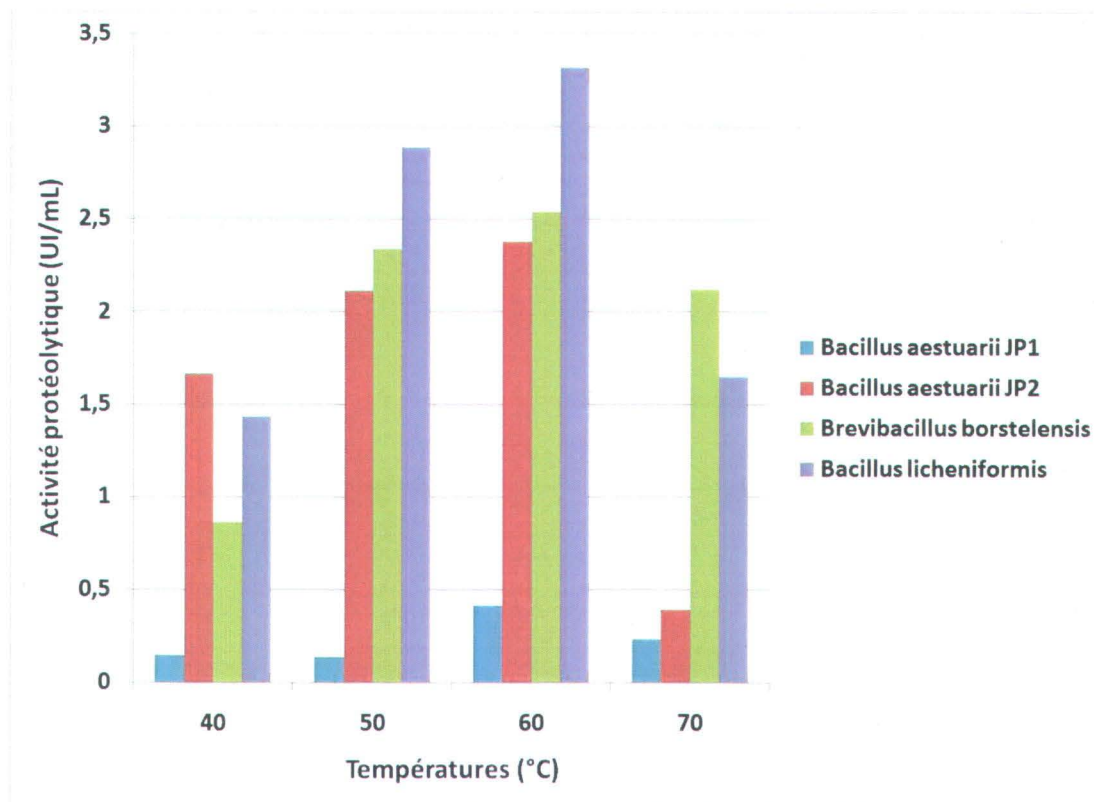


Figure 20 Activités protéolytiques des quatre souches bactériennes à différentes températures (40, 50, 60 et 70°C). Ce sont les échantillons de 24 heures des cultures en fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu semi-synthétique qui ont été utilisés.

Pour les quatre souches, la température de stabilité pour l'activité enzymatique est de 60°C. Selon Lamontagne (2004), la Subtilisine Carlsberg, une protéase-sérine produite par la famille des *Bacillus*, possède une activité maximale lors d'expériences à 60°C. Cette protéase a longtemps été la plus utilisée dans le domaine des détergents.

Les protéases thermostables ont les propriétés d'être viables plus longtemps et d'être plus efficaces que les protéases ne supportant pas les températures extrêmes, basses ou élevées (De Azaredo et al., 2004). Pour toutes ces souches bactériennes, l'activité protéolytique de leurs protéases diminue à des températures plus basses ou plus hautes que 60°C. Pour les plus hautes températures, les enzymes sont souvent dénaturées ou perdent leur stabilité, ce qui diminue leur activité (Johnvesly et Naik, 2001). Quant aux températures plus basses, elles vont diminuer les vitesses des réactions enzymatiques, ce qui se traduit aussi par une baisse de l'activité protéolytique. Il serait intéressant d'approfondir ce paramètre dans des travaux ultérieurs. Des tests avec des différences de température de 5°C seront nécessaires afin de préciser la température de stabilité.

6.5 pH de stabilité des protéases

Le pH aura aussi une grande influence sur l'activité enzymatique. Il fait fluctuer les charges dans le site actif et sur la surface de la molécule, la protéase dans le cas présent (Illanes, 2008). La réalisation de tests au pH de stabilité est donc importante pour tirer le maximum du potentiel des protéases et évaluer leur sensibilité à des variations de pH. La figure 21 montre l'activité protéolytique des quatre souches en fonction des changements de pH lors des tests à 60°C.

Pour les quatre souches bactériennes, le pH de stabilité de la réaction enzymatique est aux alentours de 8.2. Selon Huang et son équipe (2005), une souche du genre *Brevibacillus* (*Bv. laterosporus* G4) produit une protéase extracellulaire ayant un pH

de stabilité de 10.0. Pour *Bacillus licheniformis* NH1, le pH de stabilité se trouve entre 10.0 et 11.0 (Hadj-Ali et al., 2007). De plus, selon Lamontagne (2004), la Subtilisine Carlsberg produite majoritairement par la famille des *Bacillus*, présente également un pH de stabilité de 8.2. Les quatre souches bactériennes produisent des protéases dont le pH de stabilité se compare à la Subtilisine Carlsberg. Toutefois, elles ne démarquent pas dans cette caractéristique par rapport à d'autres souches sauvages productrices de protéases.

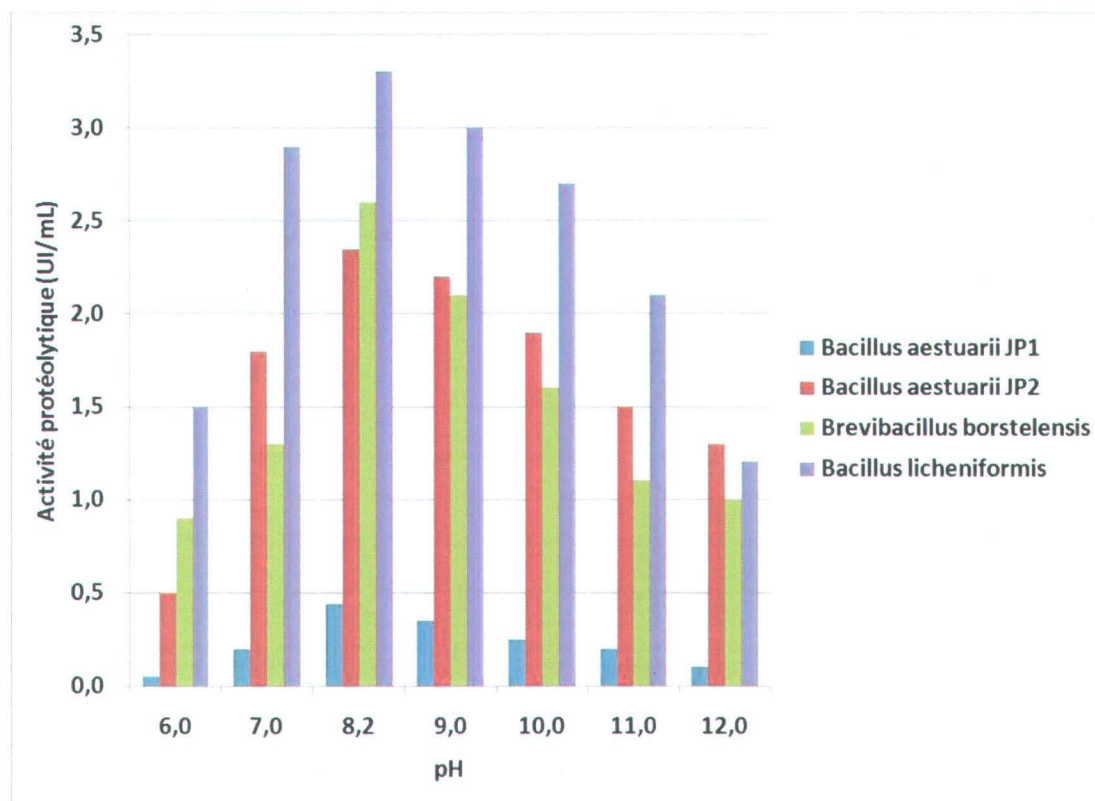


Figure 21 Activités protéolytiques des quatre souches bactériennes à différents pH (6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 et 12.0). Ce sont les échantillons de 24 heures des cultures en fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu semi-synthétique qui ont été utilisés.

6.6 Effet du milieu de culture : semi-synthétique et boues d'épuration

Les quatre souches bactériennes isolées de boues d'épuration municipales, *B. aestuarii* JP1 et JP2, *Bv. borstelensis* et *B. licheniformis*, ont été cultivées dans un milieu semi-synthétique conventionnel à base de farine de soja et dans une boue d'épuration municipale, celle de la Ville de Québec (CUQ). Ces tests sont nécessaires afin d'évaluer la possibilité d'utiliser les boues d'épuration municipales comme milieu alternatif. L'utilisation du milieu semi-synthétique donne un point de référence, permettant ainsi les comparaisons lorsque certaines variables sont testées. Ces résultats nous permettent aussi de déterminer si les boues d'épuration peuvent supporter la croissance et la production de protéases par les différentes souches. En effet, les boues d'épuration contiennent une grande diversité de substances et certaines d'entre elles peuvent favoriser la croissance et la production d'enzymes alors que d'autres peuvent être inhibitrices de la croissance ou de la production. La production d'enzymes peut être constitutive, mais tend souvent à être induite. La composition du milieu influencera grandement cette production (Tari et al., 2006; Gupta et al., 2002). Le tableau 2 énumère les différents maximums atteints pour les quatre souches dans le milieu semi-synthétique et dans les boues d'épuration.

Tableau 2 Valeurs maximales observées des cellules totales (ufc/mL), des spores (ufc/ml), de l'activité protéolytique (UI/mL) et les μ_{\max} avec les temps correspondants, pour les quatre souches bactériennes lors des expériences en bioréacteurs de 15 L (volume de travail de 10 L) en milieu semi-synthétique et en boues (25 g/L).

Conditions d'opération	Cellules totales (ufc/mL)	Temps (heures)	μ_{\max}	Spores (ufc/mL)	Temps (heures)	Activité protéolytique (UI/mL)	Temps (heures)
<i>B. aestuarii</i> JP1 – MS	7,40E+08	30	0,60	9,20E+06	30	5,25	15
<i>B. aestuarii</i> JP1 – 25 g/L	3,10E+09	24	0,56	3,00E+07	24	5,08	30
<i>B. aestuarii</i> JP2 – MS	9,80E+07	18	0,54	4,10E+06	24	2,40	9
<i>B. aestuarii</i> JP2 – 25 g/L	3,00E+08	30	0,61	3,00E+07	36	1,26	30
<i>Bv. borstelensis</i> – MS	4,30E+08	36	0,19	9,00E+06	48	0,98	21
<i>Bv. borstelensis</i> – 25 g/L	9,60E+07	48	0,15	2,00E+06	48	2,30	48
<i>B. licheniformis</i> – MS	8,10E+08	36	0,36	4,10E+06	36	2,86	48
<i>B. licheniformis</i> – 25 g/L	6,50E+08	48	0,19	1,39E+08	36	4,10	36

Bacillus aestuarii JP1

La figure 22 montre les résultats de la souche *B. aestuarii* JP1 en milieu semi-synthétique et en boues d'épuration.

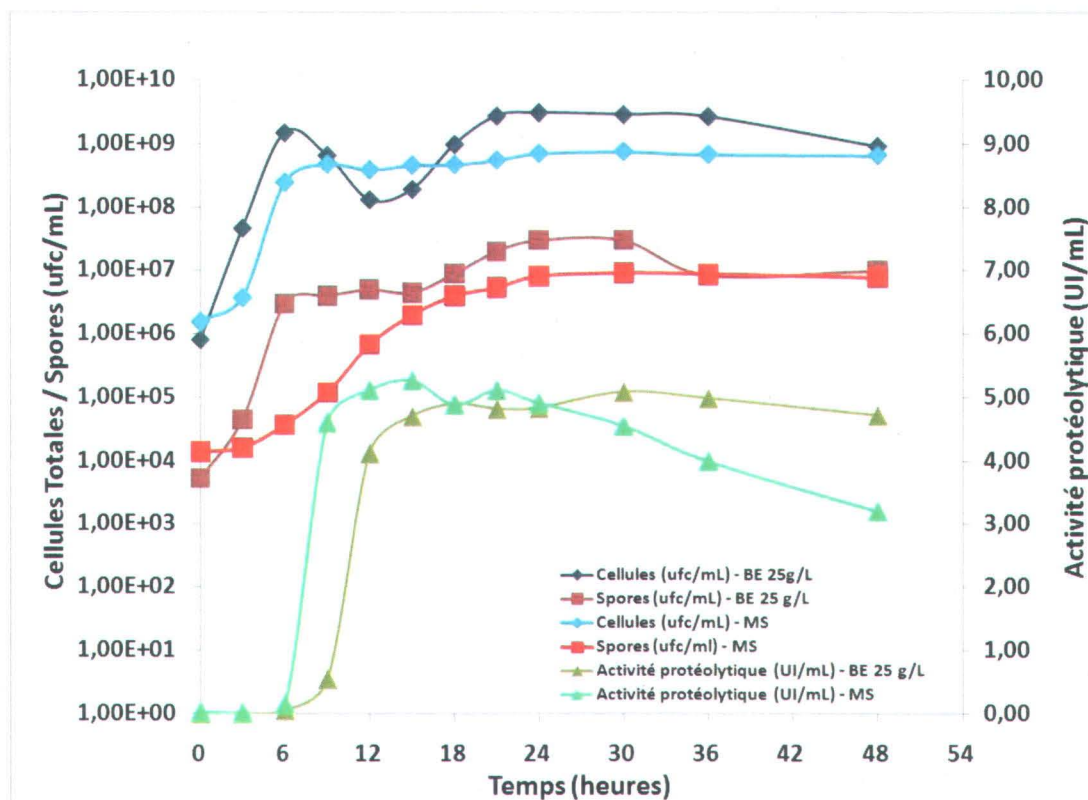


Figure 22 Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche *B. aestuarii* JP1, en bioréacteurs, à 55°C, en milieu semi-synthétique et en boues d'épuration à 25 g/L de MES.

Pour *B. aestuarii* JP1, le milieu à base de boues d'épuration serait une bonne alternative au milieu semi-synthétique à base de farine de soja. En effet, il y a plus de cellules et de spores produites alors que l'activité protéolytique est équivalente dans les deux milieux. Les cellules et les spores sont plus nombreuses dans les boues d'épuration car ce milieu comporte beaucoup de matières organiques. Comme la production de cellules est dépendante de la quantité de nutriments dans le milieu, il y a plus de cellules lorsqu'il y a plus de nutriments. Ces nutriments supportent mieux la

croissance de cette souche bactérienne par rapport au milieu semi-synthétique. Cette bactérie possède des mécanismes de transport plus adaptés pour ce milieu. Cela la rend beaucoup plus apte à se servir de tous les éléments à sa disposition dans son environnement. Dans les deux milieux, il est intéressant de constater que la souche JP1 maintient son taux de croissance maximum près de 0.60 /h, soit près de celui en milieu semi-synthétique. *B. aestuarii* JP1 est une souche thermophile isolée des boues d'épuration. Quoiqu'elle soit adaptée aux boues, elle ne croît pas plus rapidement en milieu semi-synthétique. Elle croît plus rapidement que la souche conventionnelle *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 produisant la Subtilisine. Selon Drouin et al. (2008), *Bacillus licheniformis* ATCC 21424, la souche mésophile la plus commune pour la production de protéases industrielles, le μ_{\max} dans différents milieux (boues hydrolysées ou non) se situe toujours sous la barre de 0.50 /h. Donc, *B. aestuarii* JP1 a une croissance très rapide ce qui en fait une excellente souche potentielle pour des applications industrielles. Comme elle croît rapidement, le temps de production peut être potentiellement réduit, entraînant diverses économies (chauffage, électricité, main d'oeuvre). De plus, la méthode des précultures permet aussi de réduire le temps de bioréaction en réduisant la phase de latence à quelques minutes ou dizaines de minutes, là où les bactéries prennent le temps de s'adapter au milieu. Cette phase se produit dans la préculture permettant ainsi aux bactéries d'être déjà en phase exponentielle lors de leur inoculation dans le bioréacteur. Les spores sont normalement produites lorsque le milieu s'appauvrit, mais la figure montre que le phénomène de la sporulation survient plus rapidement. Cela suggère une désynchronisation de la sporulation qui pourrait être due à la complexité des sources de nutriments. Certaines cellules bactériennes pourraient détecter l'absence de nutriments et commencer le processus de sporulation. Les autres cellules pourraient faire comme leurs consœurs et sporuler. L'influence des milieux alternatifs sur l'activation de la sporulation ou le phénomène de « quorum-sensing » entre les cellules seraient intéressants à étudier dans des travaux ultérieurs.

Au niveau de la production de protéases, les résultats sont similaires dans les deux milieux. Il est possible d'observer que l'activité protéolytique est presque nulle au début de la bioréaction. En effet, il a été démontré que les bacilles ont tendance à produire des enzymes seulement lorsque cela est nécessaire (Gupta et al., 2002; Kumar and Takagi, 1999). Au début de la croissance bactérienne, lors de la phase exponentielle, les bactéries utilisent les substrats simples, les sources de carbone et d'azote facilement assimilables. L'absence de protéases détectables dans le milieu peut être aussi expliquée par le fait que les substrats facilement assimilables peuvent aussi agir comme des inhibiteurs de la production d'enzymes (Oskouie et al., 2008). Les bactéries produisent (de manière induite) des enzymes pour dégrader les substances complexes de leur environnement afin d'obtenir des éléments simples. Par contre, elles ne produiront pas d'enzymes si ces molécules simples sont déjà présentes. Le milieu semi-synthétique contient une concentration de sucres facilement assimilables (0.5% de dextrose et 0.5% d'amidon) qui vont être utilisés préférentiellement aux autres sources de carbone plus complexes (Ferreiro et al., 1996). Les boues d'épuration, quant à elles, contiennent de plus grandes quantités de substances complexes. Les résultats suggèrent que les boues contiennent tout de même une certaine proportion de substrats facilement assimilables, de là des activités protéolytiques semblables dans les deux milieux.

Le début de la production de protéases dans le milieu survient lorsque la bactérie atteint sa phase stationnaire. Cela correspond au moment où la concentration de spores dans le milieu atteint un premier plateau en boues d'épuration et commence à augmenter dans le milieu semi-synthétique. La production de spores par les bactéries survient lorsque celle-ci subit un stress, comme la pauvreté du milieu, la chaleur, la sécheresse ou la présence de substances toxiques (Piggot, 2004). De plus, lorsque le milieu devient pauvre en nutriments facilement assimilables, les bactéries commencent à sécréter des enzymes dans leur milieu environnant afin de dégrader les substances plus complexes qui ne peuvent être absorbées directement par les cellules,

à travers leurs membranes cellulaires (Junker et al., 2001). Les protéases ainsi produites vont dégrader ces molécules complexes, fournissant ainsi les éléments nutritifs essentiels à la croissance bactérienne. Ce sont ces protéases qu'il est possible d'isoler et d'utiliser. De plus, la production de spores est parfois reliée à l'augmentation de protéases dans le milieu. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté un lien entre la production de protéases et la sporulation (Bezawada et al., 2009; Gupta et al., 2002; Kumar and Takagi, 1999). Ces productions ne sont pas clairement et directement reliées. Lorsque la spore est produite, une lyse de la cellule bactérienne survient. Les protéases, normalement intracellulaires, sont relâchées dans le milieu environnant, augmentant ainsi l'activité protéolytique mesurée lors des tests. La production de spores est donc indirectement reliée à l'activité protéolytique. Pour *B. aestuarii* JP1, l'activité protéolytique et la concentration de spores corroborent cette hypothèse. Finalement, il est possible de remarquer que l'activité protéolytique diminue dans le milieu semi-synthétique vers la fin de la bioréaction. Il est possible que cette observation soit due à la respiration endogène. Ce phénomène, selon lequel les cellules vivantes se nourrissent des constituants des cellules mortes environnantes, suppose la production de protéases extracellulaires dans le milieu. Si ce phénomène n'est pas observé, c'est que le milieu de culture contient encore de la matière organique biodégradable comme pour la culture en boues d'épuration.

***Bacillus aestuarii* JP2**

La figure 23 montre les résultats pour *B. aestuarii* JP2 en milieu semi-synthétique et en boues d'épuration à 25 g/L de MES.

La comparaison de ces deux séries de résultats montre que pour *B. aestuarii* JP2, les boues d'épuration supportent une meilleure croissance bactérienne. La concentration de spores est plus élevée, mais l'activité protéolytique maximale est moindre, environ la moitié de l'activité maximale obtenue en milieu semi-synthétique. De plus, l'activité maximale survient après seulement neuf heures en MS alors qu'elle est

obtenue en BE après 30 heures. Selon les résultats, la souche de *B. aestuarii* JP2 est meilleure pour produire des cellules en BE qu'en MS, mais la production de protéases est inférieure.

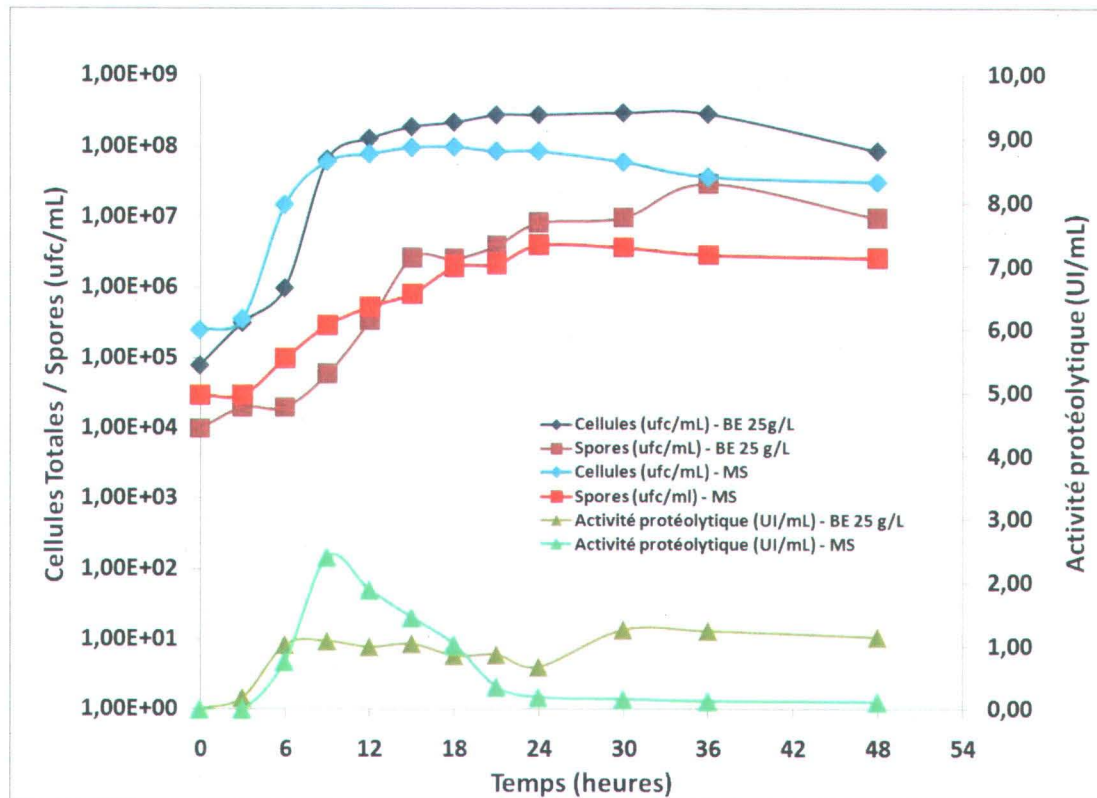


Figure 23 Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche *B. aestuarii* JP2, en bioréacteurs, à 55°C, en milieu semi-synthétique et en boues d'épuration à 25 g/L de MES.

Contrairement à *B. aestuarii* JP1, *B. aestuarii* JP2 produit plus de protéases en MS plutôt que dans les boues. En effet, comme la variété JP1, la JP2 démontre une meilleure production de cellules et de spores en boues qu'en MS à base de farine de soja. Son taux de croissance maximal est aussi plus élevé avec des valeurs près de 0.60 /h pour les deux types de milieux. Malgré la différence génétique mineure qui les distingue, la souche JP2 se démarque de la souche JP1 en termes de sporulation et d'activité protéolytique.

Lors de sa culture dans les boues, il est possible d'apercevoir deux phases dans la production de spores. En considérant l'erreur des valeurs, il est possible aussi qu'il y ait seulement une phase et que la pente soit très faible. La valeur des spores à 15 heures porte à confusion en créant deux phases qui ne sont pas réellement présentes.

Cette variété de *B. aestuarii* possède sensiblement les mêmes attributs que la variété JP1 au niveau de la croissance. Par contre, l'activité de ses protéases est beaucoup plus faible en MS ou dans les boues. En MS, l'activité protéolytique maximale est de 2.40 UI/ml, soit le double de celle observée en boues (1.26 UI/mL). La farine de soja du milieu semi-synthétique est un substrat complexe qui nécessite la présence de protéases pour sa dégradation, au même titre que la matière organique dans les boues d'épuration. Par contre, cette matière dans les boues ne semble pas stimuler rapidement la production de protéases par la bactérie car l'activité protéolytique observée est faible. Il aurait été intéressant d'attendre quelques heures supplémentaires afin que tous les nutriments facilement assimilables soient épuisés. Le MS stimule légèrement la production de protéases grâce à ses nutriments facilement assimilables, mais il est rapidement épuisé. Les nutriments sont manquants et il ne reste plus de matières biodégradables à utiliser. Cela provoque la consommation des enzymes du milieu extracellulaire et la respiration endogène. Il faut noter que, même si l'activité protéolytique en MS est le double de celle en BE, la faible stabilité de la production pourrait poser un problème. En effet, comme les protéases sont consommées très tôt dans la production, il est essentiel de terminer cette production dans le début. Lors d'une production industrielle, le moment exact du commencement de la dégradation des protéases devrait être connu pour arrêter la production au moment opportun. Le moment où l'activité est maximale doit aussi être connu pour les procédés continus et semi-continus.

À partir de neuf heures, l'activité des protéases commence à diminuer dans le MS suggérant que les protéases ont été dénaturées, inhibées ou aussi bien dégradées par

d'autres enzymes. Selon Schnell et Hanson (2006), la plupart des auteurs attribuent le manque d'activité de leurs enzymes à des phénomènes comme un changement de température, de pH, du milieu ou à la présence d'un inhibiteur compétitif ou d'inhibition par le substrat. De tous ces phénomènes, le milieu et les inhibiteurs peuvent être principalement en cause lors de l'inactivation des protéases. Comme le pH et la température sont stables, ils ne peuvent soudainement devenir inhibiteurs de l'activité des protéases. Dans le cas présent, l'inactivation survient au moment où les cellules entament leur phase stationnaire et que les spores augmentent. Yezza et al. (2006) ont démontré que lors de la sporulation, les bactéries vont produire beaucoup plus de protéases afin d'aller chercher les acides aminés nécessaires à la production de la capsule. Il est donc normal de voir l'activité protéolytique augmenter en même temps que la concentration de spore. Vers 18h de production, les spores semblent atteindre un plateau et l'activité protéolytique est très basse. Ces deux variables pourraient être corrélées, mais des expériences plus approfondies sont nécessaires (utiliser une souche identique dont la sporulation est inhibée). Dans les BE, les protéases maintiennent une activité beaucoup plus longtemps, même après 30 heures. Comme pour la variété JP1, les BE sont si riches et complexes en nutriments que les bactéries ont suffisamment de substrats à dégrader, ce qui favorise ainsi la production d'enzymes (Beg et al., 2002).

Brevibacillus borstelensis

La figure 24 montre les résultats de croissance et d'activité protéolytique pour *Bv. borstelensis* en milieu semi-synthétique et en boues.

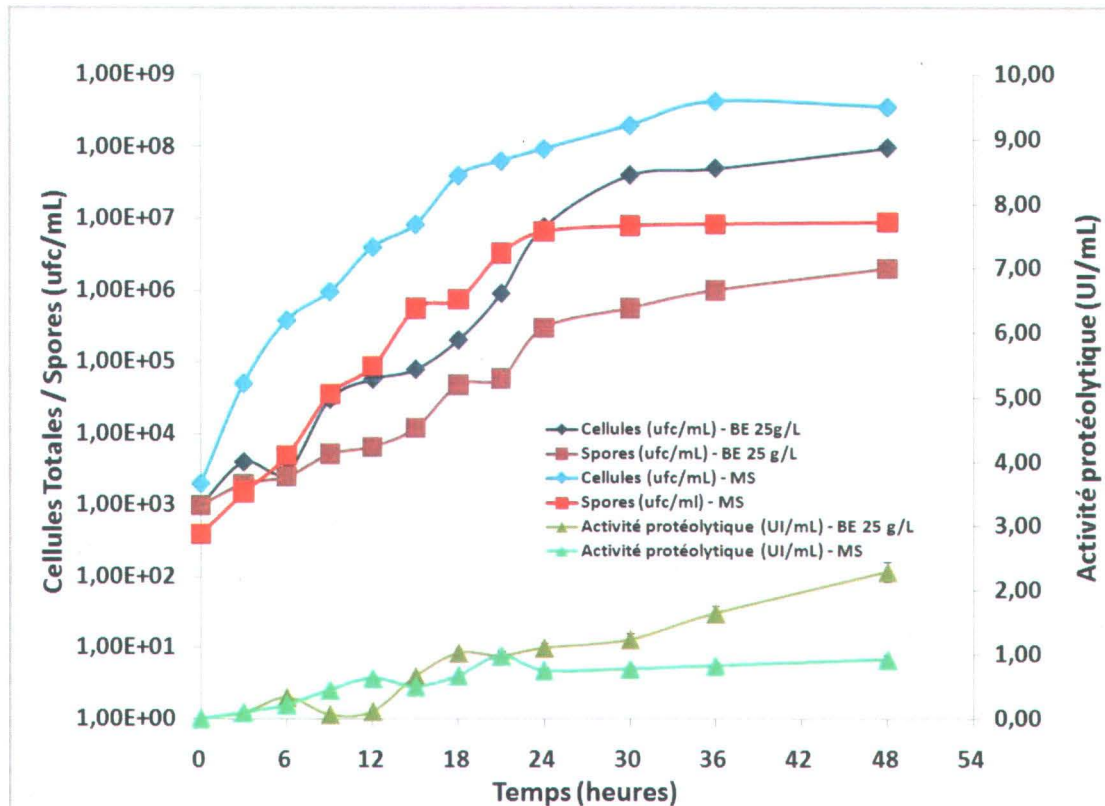


Figure 24 Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche *Bv. borstelensis*, en bioréacteurs, à 55°C, en milieu semi-synthétique et en boues d'épuration à 25 g/L de MES.

Bacillus borstelensis a un très faible taux de croissance, soit un μ_{\max} sous les 0,20 /h. Le MS permet à la bactérie de produire plus de cellules que les BE. Par contre, la quantité de spores dans les deux milieux est sensiblement la même. Pour l'activité protéolytique, le MS ne permet pas d'obtenir une activité convenable. L'activité de 0,98 UI/mL est très faible contrairement aux boues qui permettent d'obtenir une activité deux fois plus élevée (2,30 UI/mL), mais avec moins de cellules productrices. Ces résultats suggèrent que le taux de croissance de cette souche est très faible. Le milieu à base de BE, dans son état actuel, ne permettrait pas d'utiliser cette souche en industrie. Par contre, une étude approfondie de la bactérie et de la composition du milieu de culture favoriserait possiblement la production des protéases. Selon Joo et Chang (2005), l'addition de certaines sources de carbone et d'azote permet d'améliorer

grandement la production de protéases par une souche de *Bacillus* sp. I-312. Il est possible d'utiliser des résidus de maïs comme source d'azote de des résidus d'industries d'amidon pour le carbone.

Bacillus licheniformis

La figure 25 montre les résultats des bioréactions avec *Bacillus licheniformis* dans le milieu semi-synthétique et en boues d'épuration.

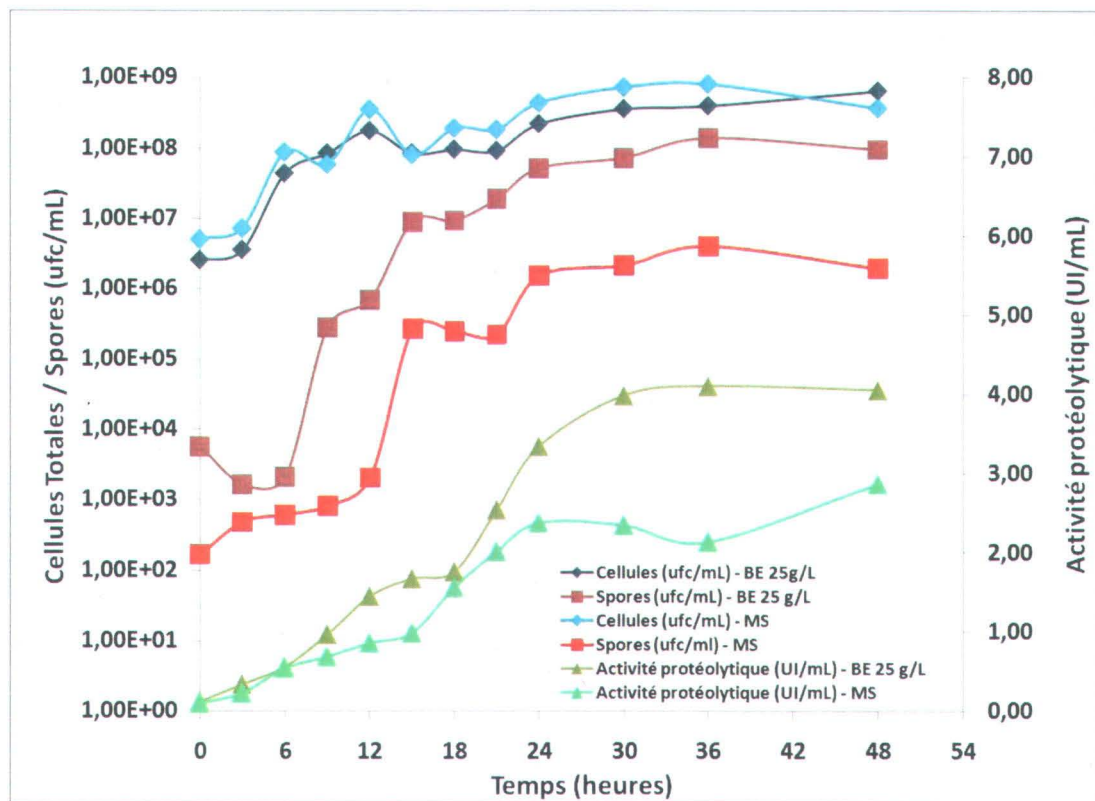


Figure 25 Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche *B. licheniformis*, en bioréacteurs, à 55°C, en milieu semi-synthétique et en boues d'épuration à 25 g/L de MES.

La souche de *Bacillus licheniformis* thermophile atteint une forte concentration de cellules dans les deux milieux. Les spores sont plus nombreuses dans les BE, ce qui suggère un milieu est plus stressant pour cette souche. Bien que les boues semblent

plus complexes, cette souche a une excellente production de protéases. L'activité protéolytique est presque de 45% supérieure en BE qu'en MS. Cela suggère que cette souche est grandement stimulée par les molécules complexes du milieu. De plus, *B. licheniformis* commence la bioconversion des boues avec une plus grande quantité de cellules venant de la préculture. Cette souche croît rapidement et il est même possible de voir une activité protéolytique dans les premières heures contrairement aux autres souches. La grande concentration des cellules au temps zéro a favorisé la consommation des substances facilement assimilables en début d'expérience. Ceci explique en grande partie la production précoce des protéases. La figure 25 montre aussi que l'activité protéolytique dans les BE devient stable après 30 heures, ce qui suggère que les bactéries continuent de produire des protéases (Kocabiyyik and Özel, 2007).

Tous ces résultats montrent qu'il est effectivement possible de faire la culture de différentes bactéries thermophiles dans des boues d'épuration. Ces boues sont très complexes et possèdent une grande variété de matières qui varient entre facilement biodégradables et complètement non-biodégradables (Tirado-Montiel et al., 2001). Les différentes souches bactériennes sont des entités bien définies et souvent très différentes les unes des autres, et c'est pour cela que leurs comportements dans différents milieux vont varier d'une bactérie à l'autre. Des milieux différents peuvent avoir une influence sur les souches bactériennes et un même milieu, à des concentrations différentes, peut aussi influencer ces souches.

6.7 Effet de la concentration en matières en suspensions des boues d'épuration

La quantité de MES du milieu de culture influence grandement la croissance, la sporulation et la production d'enzymes par les microorganismes (Farrera et al., 1998). D'une part, selon la disponibilité des nutriments, les bactéries croîtront plus ou moins

vite et produiront des quantités variables de protéases. Plus il y a de nutriments, plus les souches sont bien nourries et devraient se multiplier en grands nombres. Cette croissance est différente d'une souche bactérienne à l'autre. D'une autre part, l'augmentation des MES augmente la concentration de substances inhibitrices et de nutriments (inhibition par le substrat). Cela diminue le transfert d'oxygène qui est un élément réputé indispensable à une bonne production d'enzymes et une bonne croissance (Beg et al., 2003; Lachhab et al., 2001). Il est donc primordial de trouver la concentration en MES pour permettre une bonne croissance et une production de protéases efficace. Cette concentration en MES doit aussi permettre un bon transfert d'oxygène qui est nécessaire au métabolisme bactérien comme celui des *Bacillus sp.*

Les expériences suivantes ont pour but de déterminer la meilleure concentration en MES des boues d'épuration municipales pour les quatre souches bactériennes à l'étude, *Bacillus aestuarii* JP1, JP2, *Brevibacillus borstelensis* et *Bacillus licheniformis*.

Le tableau 3 résume différents maximums atteints pour les quatre souches dans les boues d'épuration.

Tableau 3 Résultats maximaux des cellules totales (ufc/mL), des spores (ufc/ml), du pourcentage de spores (%), de l'activité protéolytique (UI/mL) et les μ_{\max} avec les temps correspondants, pour les quatre souches bactériennes lors des expériences en bioréacteurs de 15 L (volume de travail de 10 L) en boues d'épuration à 15, 25 et 35 g/L de MES.

Conditions d'opération	Cellules totales (ufc/mL)	Temps (heures)	μ_{\max}	Spores (ufc/mL)	Temps (heures)	% de spores	Activité protéolytique (UI/mL)
<i>B. aestuarii</i> JP1 – 15 g/L	1,80E+09	24	0,52	2,30E+07	24	0,82	4,10
<i>B. aestuarii</i> JP1 – 25 g/L	3,10E+09	24	0,56	3,00E+07	24	0,96	5,08
<i>B. aestuarii</i> JP1 – 35 g/L	4,10E+09	30	0,58	3,60E+07	30	0,87	3,43
<i>B. aestuarii</i> JP2 – 15 g/L	2,53E+08	30	0,60	2,55E+07	48	9,9	1,02
<i>B. aestuarii</i> JP2 – 25 g/L	3,00E+08	30	0,61	3,00E+07	36	10	1,26
<i>B. aestuarii</i> JP2 – 35 g/L	7,20E+08	24	0,61	3,00E+07	48	4,2	1,65
<i>Bv. borstelensis</i> – 15 g/L	1,00E+07	48	0,09	3,00E+06	48	30	1,10
<i>Bv. borstelensis</i> – 25 g/L	9,60E+07	48	0,15	2,00E+06	48	2,1	2,30
<i>Bv. borstelensis</i> – 35 g/L	1,50E+08	48	0,09	9,00E+07	48	60	2,39
<i>B. licheniformis</i> – 15 g/L	1,98E+08	36	0,15	3,14E+07	48	16	2,67
<i>B. licheniformis</i> – 25 g/L	6,50E+08	48	0,19	1,39E+08	36	21	4,10
<i>B. licheniformis</i> – 35 g/L	2,20E+08	36	0,17	5,00E+07	36	23	3,99

Trois concentrations de MES ont été testée. Les résultats à 25 g/L de MES sont les mêmes que dans la section précédente qui portait sur la comparaison entre les cultures dans les boues d'épuration et dans le milieu semi-synthétique.

Bacillus aestuarii JP1

Le tableau 3 et la figure 26 montrent les résultats de *B. aestuarii* JP1 dans les BE.

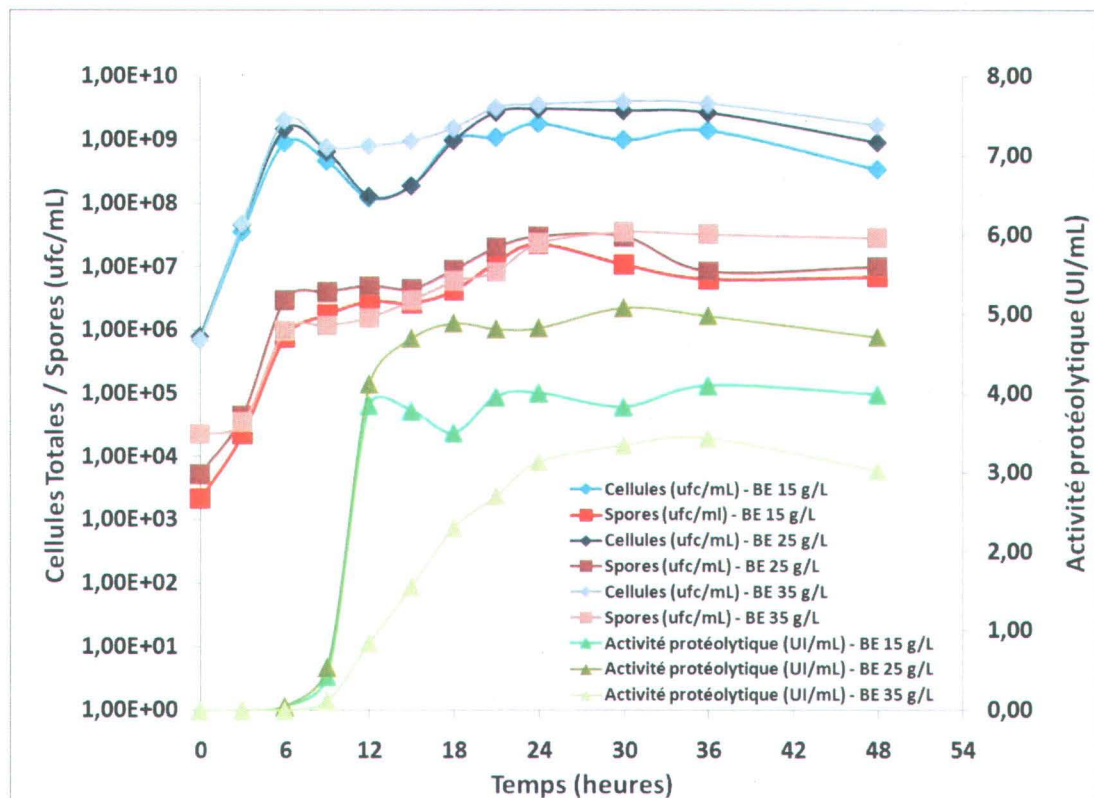


Figure 26 Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche *B. aestuarii* JP1 à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 15, 25 et 35 g/L de MES.

Tout d'abord, il est possible de remarquer que les résultats se ressemblent d'une concentration à l'autre. Les taux de croissance maximaux (μ_{\max}) sont sensiblement les mêmes avec une augmentation de 11% lorsque la concentration en MES des boues passe de 15 g/L à 35 g/L et une augmentation de 7% de 15 g/L à 25 g/L.

Il est difficile de choisir une concentration en MES adéquate pour cette souche seulement en se fiant aux CT, aux SP et aux μ_{\max} . Par contre, l'AP est supérieure lors de l'utilisation de BE à 25 g/L de MES. Cette concentration favorise une excellente croissance bactérienne. Un taux de croissance maximal rapide de 0.56 /h est observé en comparaison avec *Bacillus licheniformis* ATCC 21424 en BE à 25 g/L de MES qui a un μ_{\max} de 0.36 /h (Drouin, 2005). Il est important de prendre en compte plusieurs phénomènes, souvent opposés, qui surviennent lors de l'augmentation de la concentration en MES des boues. Premièrement, l'augmentation de la concentration en MES amène plus de nutriments aux bactéries. Comme ces dernières sont mieux nourries, elles vont mieux se développer et se reproduire (Yezza et al., 2005). Pour affirmer cette hypothèse, il suffit de considérer le pourcentage de spores dans chacun des milieux. Pour les trois concentrations en MES, le pourcentage de spores est inférieur à 1%. La grande majorité des protéases produites le sont par les bactéries végétatives et ne sont pas dues à la sporulation. Certains auteurs suggèrent que la production d'enzymes extracellulaires est grandement influencée par la sporulation. Bezawada et al. (2009) ont effectivement démontré que certaines souches de *Bacillus licheniformis* industrielles (ATCC 21415, 21417 et 21424) produisent des protéases et que cette production est corrélée à la sporulation.

Deuxièmement, l'augmentation des MES fournit aux bactéries de plus grandes quantités de substances complexes protéiques, favorisant ainsi la production de protéases. En effet, les substances complexes des boues vont favoriser la production de protéases contrairement aux milieux contenant peu de ces substances (Tyagi et al., 2002; Zouari et al., 2002).

Troisièmement, une trop forte concentration en MES peut réduire le taux de transfert d'oxygène (OTR) et le taux de consommation de l'oxygène (OUR), c'est-à-dire la concentration d'oxygène dissous disponible pour les bactéries. Le milieu devient trop visqueux et le transfert est moins efficace (Barnabé, 2004). L'oxygène est un élément

essentiel à la croissance des bactéries aérobies et pour la production d'enzymes (Beg et al., 2003). Cette inhibition a été démontrée dans différentes recherches sur la bioconversion des boues d'épuration (Lachhab et al., 2001; Vidyarthi et al., 2002). Dans le cas présent, une concentration en MES de 35 g/L réduit la production de protéases par l'inhibition pas le substrat et une réduction de l'OTR et de l'OUR. Une concentration en MES de 25 g/L est donc la meilleure approche. De plus, les protéases de cette souche conservent bien leur activité et leur concentration tout au long de la bioréaction. Leur dénaturation survient uniquement dans les dernières heures. Pour résister à leur environnement, les souches bactériennes, isolées dans des boues d'épuration se seraient acclimatées à leur milieu et auraient produit des enzymes plus résistantes à l'environnement, au pH, aux inhibiteurs ou à la température.

***Bacillus aestuarii* JP2**

Le tableau 3 et la figure 27 montrent les résultats de *B. aestuarii* JP2 dans des boues d'épuration. Tout comme la souche précédente, cette variété de *B. aestuarii* montre des résultats très similaires dans les trois expériences à diverses concentrations. Les taux de croissance maximaux (μ_{max}) de 0.60, 0.61 et 0.61 /h sont identiques. Pour les valeurs d'AP, il y a une augmentation de l'activité lorsque la concentration en MES augmente. À 15 g/L, l'AP est de 1.02 UI/mL et augmente de 24% (1.26 UI/mL) à 25 g/L et de 62% (1.65 UI/mL) à 35 g/L. De 25 g/L à 35 g/L, il y a une augmentation de 31%. Bien que ces valeurs d'AP soient plutôt faibles, il n'en demeure pas moins que l'augmentation de la concentration en MES améliore l'activité protéolytique.

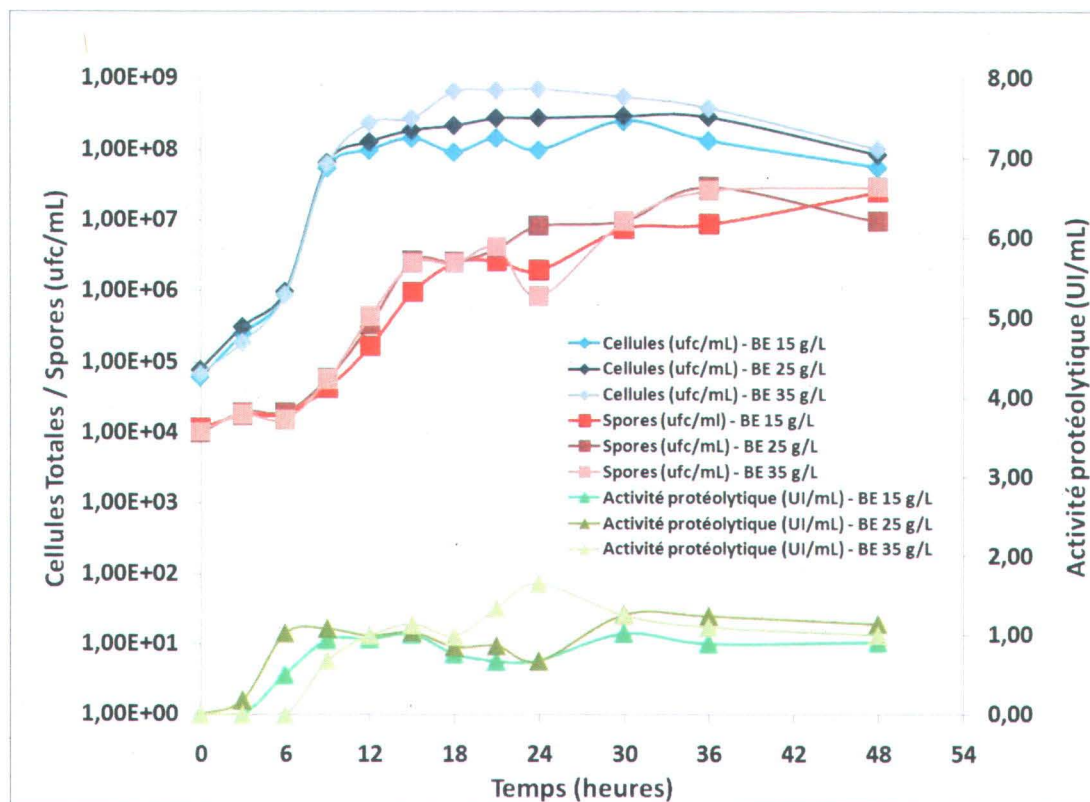


Figure 27 Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche *B. aestuarii* JP2 à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 15, 25 et 35 g/L de MES.

Contrairement à la variété JP1, la JP2 montre les meilleurs résultats à 35 g/L de MES. Au niveau des taux de croissance maximaux, les valeurs, qui sont très élevées comparativement à la souche de référence de *B. licheniformis* ATCC 21424, sont identiques pour les trois différentes concentrations de MES des boues. Les valeurs de CT et de SP sont sensiblement les mêmes, mais plus faibles que ces mêmes comptes pour la souche de *B. licheniformis* ATCC 21424. Les pourcentages de spores (10%) montrent qu'à 15 et 25 g/L de MES, la concentration en nutriments est insuffisante pour cette souche vers la fin de la bioréaction. En effet, à 35 g/L de MES, le pourcentage de spores diminue à 4,2%. Le fait qu'il y ait moins de spores à une concentration plus haute suggère que le milieu contient plus de nutriments (carbone, azote et même phosphore) pour la croissance bactérienne (Piggot, 2004). Les

bactéries sont moins stressées et la sporulation est retardée jusqu'à ce que le milieu devienne inadéquat.

Tout comme pour la variété JP1, avec la JP2 il est possible de constater l'influence des concentrations en MES sur l'AP. En effet, une augmentation de l'AP survient lorsque la concentration en MES augmente. Cette souche apprécie de plus fortes concentrations en MES (plus de cellules, ratio spores:cellules plus faible, plus de protéases). Son AP, bien qu'elle soit plutôt faible, est plus forte lorsque la présence de substrats complexes est élevée. Les protéases de *B. aestuarii* JP2 perdent leur activité très lentement et ce, uniquement dans les dernières heures de la bioréaction. Cela suggère une inactivation due à la haute température (Beadle et al., 1999), à l'auto-hydrolyse ou au manque de nutriments (Chu et al., 1992).

Brevibacillus borstelensis

Le tableau 3 et la figure 28 montrent les résultats de *Bv. borstelensis* dans des boues d'épuration. Pour cette souche bactérienne, la concentration en MES de 35 g/L permet d'obtenir les meilleurs résultats au niveau des CT et des SP. Quant aux résultats d'AP sont similaires pour 25 et 35 g/L. Pour la culture à 25 g/L, le μ_{\max} (0.15 /h) est 66% plus élevé que pour les cultures à 15 g/L (0.09 /h) et 35 g/L (0.09 /h). Au niveau de l'AP, les valeurs à 25 (2.30 UI/mL) et 35 g/L (2.39 UI/mL) sont 109% et 117% plus élevées que celle à 15 g/L (1.10 UI/mL). Par contre, la valeur à 35 g/L n'est que de 4% supérieure à celle à 25 g/L, ce qui n'est pas considéré comme significativement différent.

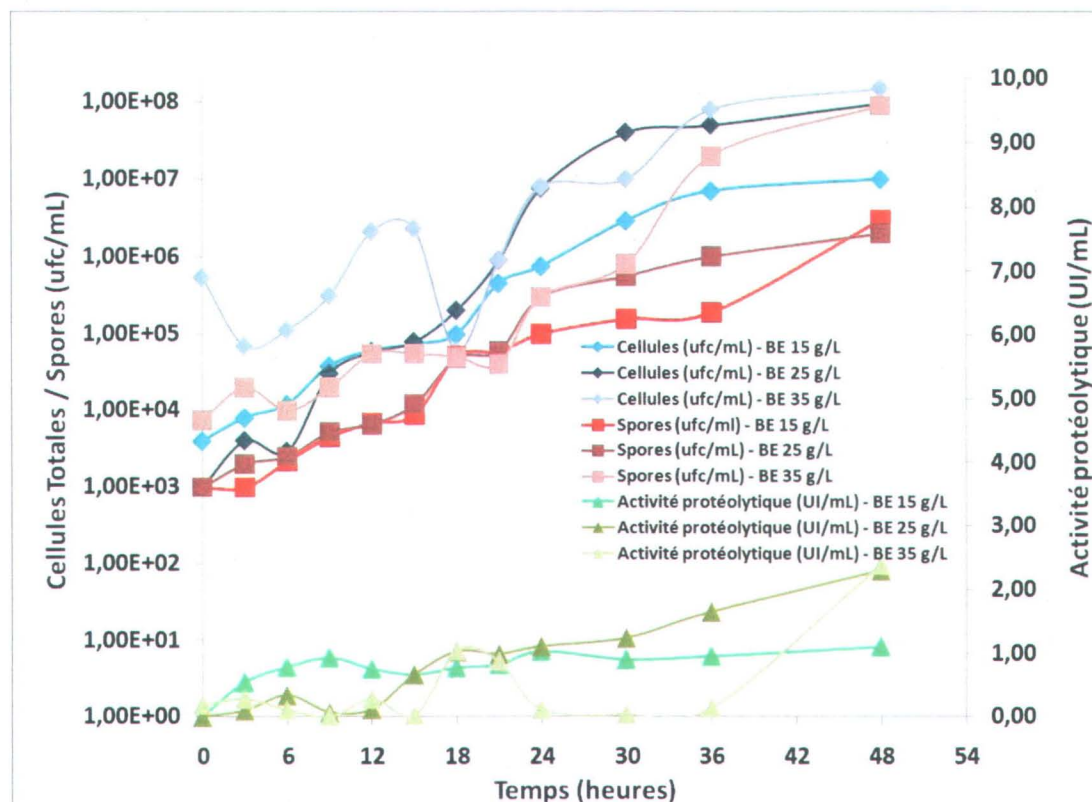


Figure 28 Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche *Bv. borstelensis* à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 15, 25 et 35 g/L de MES.

Pour *Bv. borstelensis*, la meilleure concentration en MES des BE est de 35 g/L. Comme pour la variété JP2 de *B. aestuarii*, cette souche semble tolérer de fortes concentrations en MES. Les protéases de cette souche ont, comme les autres, une stabilité intéressante en boues d'épuration. L'activité ne décroît pas dans les 48 heures de bioréaction. Par contre, cette souche bactérienne n'est pas adéquate pour une production industrielle. En comparaison avec *B. licheniformis*, son taux de croissance maximum est très faible (~ 0.09 à 0.15 /h) et les maximums de CT, de SP et d'AP surviennent tard dans la bioréaction. Elle demande donc plus de temps de bioréaction, ce qui entraîne davantage de coûts et de consommation d'énergie.

Il est aussi possible de remarquer, avec les pourcentages de spores, qu'une boue contenant 25 g/L de MES favorise grandement la multiplication des cellules végétatives plutôt que la formation de spores (2.1%). À l'inverse, une boue contenant 15 g/L de MES favorise la formation de spores (30%). À cette concentration, le milieu est plus ou moins favorable à une bonne croissance car peu de cellules végétatives sont produites ($CT - SP = 7,00 \times 10^6$ ufc/mL). Aussi, les résultats à 35 g/L montrent une inhibition par le substrat (Vidyarthi et al., 2002; Lachhab et al., 2001). En effet, 60% des cellules dans le bioréacteur sont des spores. Bien qu'il y ait moins de cellules végétatives à 35 g/L qu'à 25 g/L, la quantité de spores est plus élevée. Comme l'AP est semblable, il est possible de suggérer que la sporulation a contribué à la production de protéases (Brar et al., 2007; Yezza et al., 2006).

Bacillus licheniformis

Le tableau 3 et la figure 29 montrent les résultats de *B. licheniformis* dans des boues d'épuration. Pour cette souche bactérienne, une concentration en MES de 25 g/l permet d'obtenir la plus forte production de protéases. Les taux de croissance maximaux sont faibles, avec des valeurs de 0.15, 0.19 et 0.17 /h pour des MES de 15, 25 et 35 g/L, respectivement.

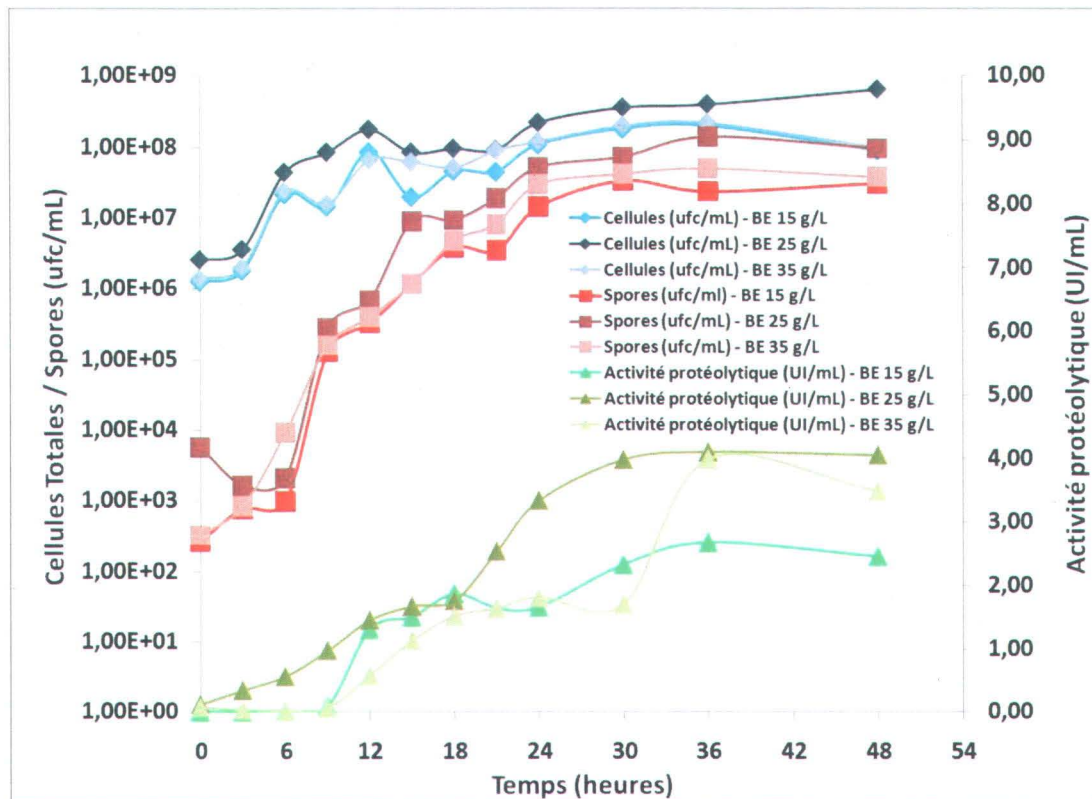


Figure 29 Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche *B. licheniformis* à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 15, 25 et 35 g/L de MES.

Les CT sont similaires pour les trois concentrations. Par contre, la concentration à 25 g/L de MES propose une production de SP accrue. La production de protéases est reconnue pour être influencée par la production de spores chez *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, 21417 et 21424 (Bezawada et al., 2009). Selon ces résultats, il serait pertinent de choisir une concentration de 25 g/L de MES pour les futures bioréactions avec la souche thermophile isolée. Les taux de croissance maximaux sont faibles et la croissance parvient à son maximum tard dans la bioréaction. Il est tout de même intéressant de prendre en compte que les CT de départ, à zéro heure, étaient très élevées. Cela peut expliquer le faible μ_{max} , car l'inoculum contenait déjà beaucoup de bactéries. La phase de croissance a été très courte avant d'atteindre la phase stationnaire. Cette souche atteint malgré cela de fortes concentrations en CT et en SP.

Son AP est aussi élevée à 25 g/L de MES (4.10 UI/mL), ce qui en fait un bon choix comme souche productrice. De plus, comme toutes les souches cultivées en boues d'épuration, l'activité protéolytique conserve une bonne vigueur durant tout le processus de production. La même chose est démontrée avec la souche conventionnelle de *B. licheniformis* ATCC 21424 (Drouin, 2005). Les pourcentages de spores sont de 15.8, 21.0 et 22.7% à 15, 25 et 35 g/L de MES. Cette série d'expériences démontre bien l'inhibition par le substrat. Plus la concentration en MES augmente, plus il y a de spores. L'augmentation des nutriments devrait favoriser l'augmentation des CT mais elles sont similaires dans les trois tests. Ceci montre qu'une plus haute concentration de nutriment stress les bactéries. L'augmentation de la viscosité et la diminution du transfert d'oxygène peuvent aussi expliquer ce phénomène.

6.8 Effet des différentes stratégies d'oxygénation

Comme mentionnée dans plusieurs recherches (Beg et al., 2003; Calik et al., 2000; Yezza et al., 2004), l'oxygénation du milieu est un facteur important, limitant pour la croissance bactérienne ainsi que pour la production de protéases. Comme les bioréactions de cette recherche se faisaient à 55°C, la dissolution de l'oxygène dans le liquide était très réduite. En effet, lors de l'utilisation des souches de *B. aestuarii* JP1 et JP2, l'oxygène dissous (OD) tombait sous la barre des 20% et descendait même jusqu'à 0% pendant les dernières heures de la phase exponentielle de croissance. Ce phénomène est principalement dû à la température de bioréaction élevée qui provoquait une faible dissolution de l'oxygène dans le liquide. Le phénomène est dû aussi au taux de consommation de l'oxygène (OUR) par les microorganismes qui est plus élevé à haute température de culture et durant la phase exponentielle (Smets et al., 1996). Pour cette raison, l'évaluation de l'oxygénation a été étudiée. Différentes bioréactions ont été menées en mode « normal », en utilisant une aération et une agitation conventionnelle, en mode « pressurisé », en utilisant une vanne pour

appliquer de la pression (max 5 psi) sur le bioréacteur et en mode « oxygéné », en utilisant de l'oxygène pur pour alimenter le bioréacteur.

Les expériences sur les stratégies d'oxygénation ont été menées sur deux souches seulement, *B. aestuarii* JP1 et JP2 en boues d'épuration et le tableau 4 résume les maximums atteints.

Tableau 4 Résultats maximaux des cellules totales (ufc/mL), des spores (ufc/ml), du pourcentage de spores (%), de l'activité protéolytique (UI/mL) et les μ_{\max} avec les temps correspondants, pour *B. aestuarii* JP1 et JP2 lors des expériences en bioréacteurs de 15 L (volume de travail de 10 L) en boues d'épuration à 25 g/L et selon trois stratégies d'oxygénation : normal (N), pressurisé (P) et oxygéné (O).

Conditions d'opération	Cellules totales (ufc/mL)	Temps (heures)	μ_{\max}	Spores (ufc/mL)	Temps (heures)	% de spores	Activité protéolytique (UI/mL)
<i>B. aestuarii</i> JP1 – 25 g/L - N	3,10E+09	24	0,56	3,00E+07	24	0,97	5,08
<i>B. aestuarii</i> JP1 – 25 g/L - P	7,00E+09	30	0,61	2,00E+07	30	0,29	5,24
<i>B. aestuarii</i> JP1 – 25 g/L - O	3,00E+09	30	0,51	4,00E+07	24	1,3	5,99
<i>B. aestuarii</i> JP2 – 25 g/L - N	3,00E+08	30	0,61	3,00E+07	36	10	1,26
<i>B. aestuarii</i> JP2 – 25 g/L - P	1,60E+09	18	0,62	8,90E+06	18	0,56	2,15
<i>B. aestuarii</i> JP2 – 25 g/L - O	7,00E+09	30	0,61	8,00E+06	48	0,11	1,52

Bacillus aestuarii JP1

Le tableau 4 et la figure 30 montrent les résultats de *B. aestuarii* JP1 dans les BE en utilisant diverses stratégies d'oxygénation, soit en modes « normal », « pressurisé » et « oxygéné ». La figure 31 montre les profils d'oxygène dissous selon les différentes stratégies.

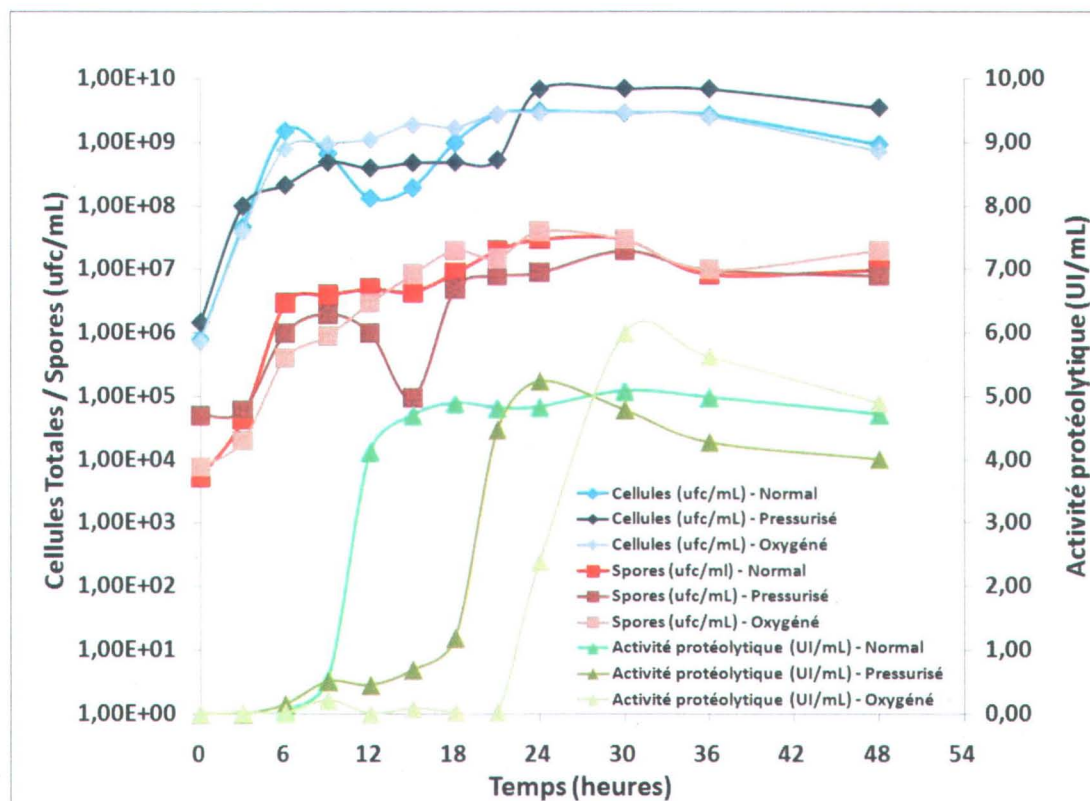


Figure 30 Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche *B. aestuarii* JP1 à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 25 g/L de MES, en modes normal, pressurisé et oxygéné.

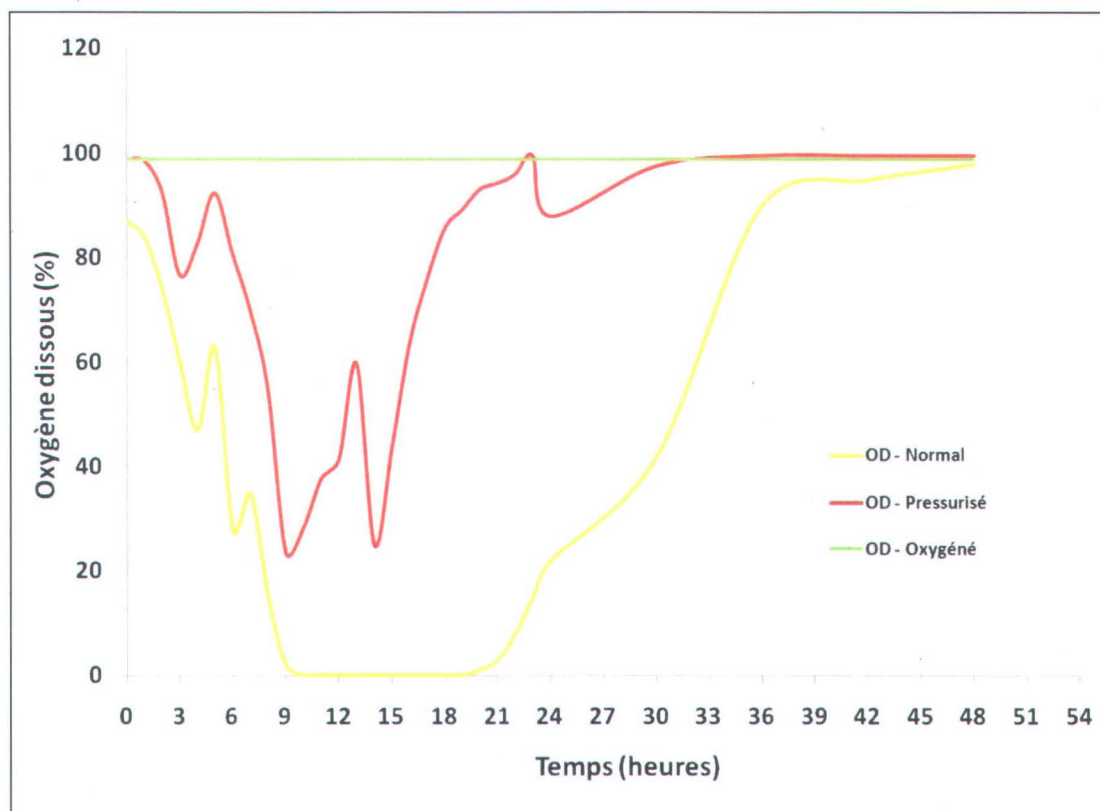


Figure 31 Profils d'oxygène dissous (OD) de la souche *B. aestuarii* JP1 à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 25 g/L de MES.

Des différentes stratégies, celle de l'oxygène pur montre les meilleurs résultats d'AP avec une valeur de 5.99 UI/mL comparativement à 5.08 et 5.25 UI/mL pour les modes normal et pressurisé, respectivement. Ces améliorations sont de 3% pour l'utilisation de pression et 18% pour l'oxygène en comparaison au mode « normal ». Pour les trois stratégies, les CT sont similaires, de même que pour les SP. Au niveau des taux de croissance maximaux, l'utilisation de pression montre le meilleur résultat pour la souche de *B. aestuarii* JP1. En comparaison avec le mode « normal » (0.56/h), le mode « pressurisé » (0.61 /h) indique une augmentation du μ_{\max} de 9% alors que le mode « oxygéné » (0.51 /h) montre une baisse de 9%. Comme les BE contiennent beaucoup de composés différents, certains toxiques, l'oxygène se retrouvant dans le milieu de culture est utilisé dans plusieurs mécanismes dont la dégradation de composés toxiques (Alagappan and Cowan, 2004). L'oxygène est aussi utilisé pour la

dégradation de la matière organique de façon chimique ou biologique. Il est difficile de calculer l'oxygène consommé seulement pour la dégradation de la matière.

L'oxygène est utilisé dans plusieurs processus qui sont souvent inter reliés, comme la production d'enzymes et la dégradation de la matière par ces enzymes. Lors de l'utilisation de pression et d'oxygène pur dans les cultures, l'oxygène dissous est présent en plus grandes concentrations dans le milieu, cessant d'être un élément limitant dans la croissance et surtout dans la production de protéases. C'est en grande partie grâce à ce phénomène que le pourcentage de spores passe de 0.97% dans les expériences normales à 0.29% dans les expériences pressurisées. De plus, les cellules totales, l'activité protéolytique et le μ_{\max} augmentent et les spores diminuent.

L'utilisation de pression a peu d'effet sur l'activité des enzymes dans le bioréacteur. Bruins et al. (2006) ont démontré que des pressions en colonnes d'au moins 1000 MPa (145 000 psi) sont nécessaires pour améliorer l'activité enzymatique alors que le bioréacteur n'était soumis qu'à 34 kPa (5 psi) maximum. Ce n'est donc pas une meilleure activité des enzymes qui a permis une meilleur croissance et production de protéases, mais bien une meilleure distribution et concentration d'oxygène disponible dans le milieu. Par la suite, l'expérience en bioréacteur avec une saturation d'oxygène (figures 30 et 31) montre que les cellules totales, le taux de croissance, les spores, le pourcentage de spores restent stables (ils ne sont pas significativement différents). Cependant, l'activité protéolytique augmente significativement. En addition, l'activité protéolytique survient plus tard dans le milieu oxygéné. Une très grande concentration d'oxygène a comme effet de perturber les flux de carbone dans le métabolisme bactérien et influencer négativement l'activité de certaines enzymes (Thanh et al., 2006; Han and Zhong, 2003) ce qui provoque un retard de la production.

Bien que ces résultats montrent que l'utilisation d'oxygène pur dans le processus de bioréaction augmente l'AP, cette méthode est coûteuse. En effet, l'utilisation d'oxygène augmenterait considérablement le coût du procédé à grande échelle. Cette

méthode est difficilement applicable à cause des coûts occasionnés par l'achat d'immenses quantités d'oxygène à 30 \$ pour 9.42 m³ (0.00318 \$/L); pour une bioréaction de 48 heures à une aération moyenne de 4.00 L/min, 11 520 L sont nécessaires et le coût atteint 36.63 \$ pour seulement 10 L de milieu.

Bacillus aestuarii JP2

Le tableau 4 et la figure 32 montrent les résultats de *B. aestuarii* JP2 dans BE en utilisant diverses stratégies d'oxygénation, soit en modes « normal », « pressurisé » et « oxygéné ». La figure 33 montre les profils d'oxygène dissous selon les différentes stratégies.

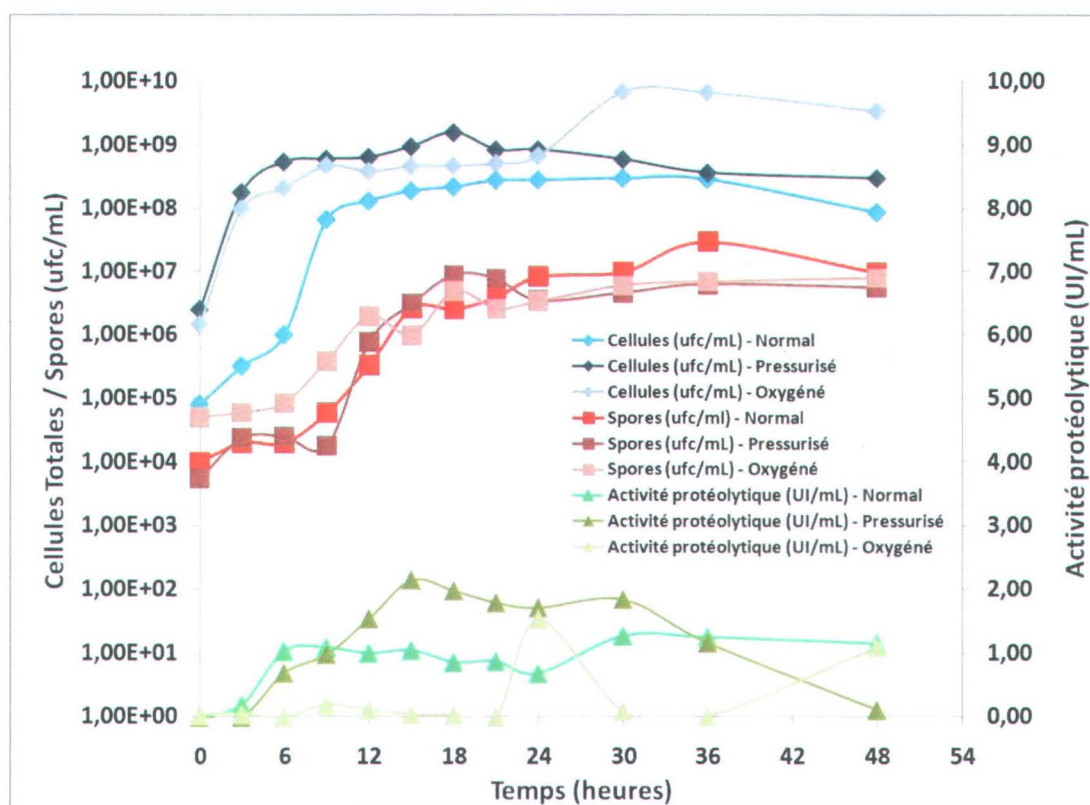


Figure 32 Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche *B. aestuarii* JP2 à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 25 g/L de MES, en modes normal, pressurisé et oxygéné.

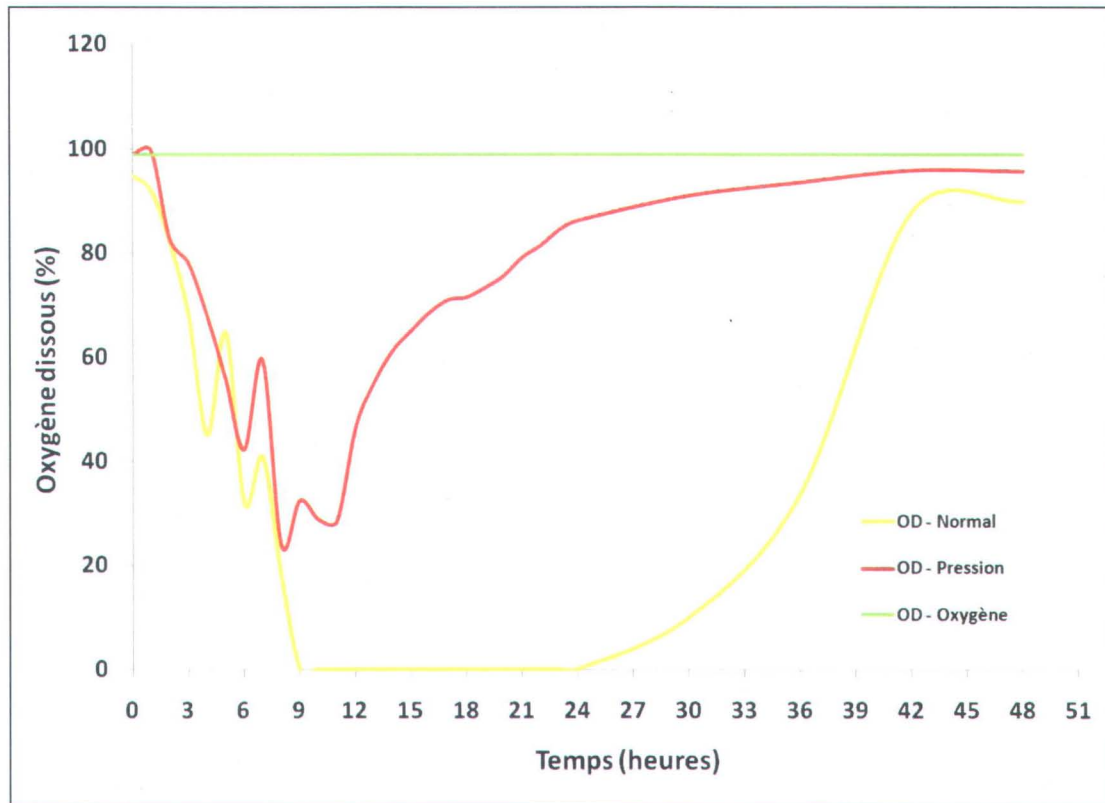


Figure 33 Profils d'oxygène dissous (OD) de la souche *B. aestuarii* JP2 à 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues d'épuration à 25 g/L de MES.

Au niveau de la production de protéases, la stratégie avec pression est la plus efficace. En effet, l'AP de 2.15 UI/mL est 71% plus élevée qu'en mode normal alors que l'utilisation d'oxygène pur ne montre qu'une augmentation de 21% avec une valeur de 1.56 UI/mL. Les CT sont supérieurs lors de l'utilisation de pression et d'oxygène comparativement au mode normal. De plus, les spores diminuent ainsi que le pourcentage de spores dans les deux méthodes d'amélioration de l'oxygène dissous. Les taux de croissance maximaux sont identiques, avec des valeurs d'environ 0.61 /h pour les trois stratégies.

Contrairement à *B. aestuarii* JP1, la variété JP2 montre les meilleurs résultats de croissance lors de l'utilisation de pression. Il est possible de remarquer une amélioration dans les CT et une diminution dans les SP. Les CT augmentent car

l'oxygène est présent en grandes concentrations (Hameed et al., 1999). De plus, si moins de SP sont produites, cela suggère que l'approvisionnement en oxygène est non limitant. En effet, les cellules entrent en sporulation lorsqu'elles subissent un stress comme une carence en oxygène (Piggot, 2004). Donc, en augmentant la concentration d'oxygène dissous, cet élément cesse de manquer et il y a alors moins de cellules qui entrent en sporulation. Par contre, l'AP du mode oxygène, bien qu'elle soit supérieure en comparaison avec le mode normal, est plus faible qu'avec l'utilisation de pression. Bronsted et al. (2005) ont démontré que l'oxygène, lorsque présent en trop grande quantité, peut avoir un effet inhibiteur sur certaines souches bactériennes. En effet, la trop grande concentration d'oxygène génère plus facilement des radicaux libres très oxydants dans le milieu de culture. Ces radicaux réagissent avec les solides des boues, les cellules ainsi que les enzymes. L'effet sur les cellules se fait remarquer non pas par leur diminution, mais par l'inactivation des protéases ainsi que par la diminution de leur production. Toutefois, les résultats ne permettent pas de déterminer la limite d'oxygénation. L'utilisation de pression a permis de conserver l'oxygène dissous au-dessus de 20% (souvent citée dans la littérature). Par contre, l'utilisation d'oxygène pur avait pour effet de saturer complètement le milieu en plus de la sonde qui était inadéquate pour mesurer une concentration aussi importante en oxygène. Des systèmes de mesures et de contrôle plus performants seraient nécessaires afin de déterminer cette limite.

Bien que les variétés JP1 et JP2 soient très proches génétiquement, les résultats ont démontré qu'elles réagissent très différemment dans le même environnement. La variété JP1 semble mieux tolérer de fortes concentrations en oxygène, produisant ainsi plus de protéases. Quant à elle, la variété JP2 est plus sensible aux fortes concentrations d'oxygène. Par contre, les deux souches semblent très à l'aise lorsque les concentrations sont maintenues au-dessus du seuil des 20% par la méthode de l'ajout de pression. Cette méthode semble donc appropriée pour la production de protéases thermostables et génère peu de coûts supplémentaires.

6.9 Effet d'une baisse de température pour augmenter l'oxygène dissous

Cette courte expérience fût menée afin de voir l'effet d'une baisse de température, dans le but d'augmenter l'oxygène dissous, sur la production de protéases. Le tableau 5 et les figures 34 et 36 montrent les résultats de CT, de SP, les pourcentages de spores et l'AP et les figures 35 et 37, les profils d'OD pour les souches de *B. aestuarii* JP1 et JP2 dans le milieu semi-synthétique à base de farine de soja, soumis à la température optimale de 55°C et à la température testée de 40°C. Cette température permettait de maintenir l'oxygène dissous au-dessus de 20%.

Selon les résultats, la baisse de température diminue grandement les taux de croissance maximaux des deux souches. En effet, pour la variété JP1, le μ_{\max} passe de 0.60 à 0.37 /h, soit une diminution de 39%. Cependant, l'AP reste stable aux alentours de 5 UI/mL. De plus, le pourcentage de spores passe de 1.2 à 27%, indiquant clairement que la souche subie un énorme stress. Bien que la diminution de l'AP ne soit pas significative, la chute du taux de croissance maximal et l'augmentation du pourcentage de spores montrent bien que la diminution de la température provoque plus d'impacts négatifs par rapport à la diminution de l'oxygène dissous. Les résultats de la variété JP2 corroborent cet énoncé. En effet, le taux de croissance maximal diminue de 17%, passant de 0.54 à 0.45 /h, et l'AP chute de 48%, passant de 2.40 à 1.24 UI/mL. Par contre, le pourcentage de spores diminue de 4.2 à 2.5%. Cette variation est plutôt faible. Toutefois, en considérant la baisse drastique de l'AP, il est possible de conclure qu'il est préférable d'avoir une concentration d'oxygène dissous sous les 20% pendant quelques heures plutôt qu'une température plus faible que celle optimale pour la croissance de la souche.

Tableau 5 Résultats maximaux des cellules totales (ufc/mL), des spores (ufc/ml), du pourcentage de spores (%), de l'activité protéolytique (UI/mL) et les μ_{\max} avec les temps correspondants, pour *B. aestuarii* JP1 et JP2 lors des expériences en bioréacteurs de 15 L (volume de travail de 10 L) en milieu semi-synthétique et à deux températures différentes : 40 et 55°C.

Conditions d'opération	Cellules totales (ufc/mL)	Temps (heures)	μ_{\max}	Spores (ufc/mL)	Temps (heures)	% de spores	Activité protéolytique (UI/mL)
<i>B. aestuarii</i> JP1 – MS - 55°C	7,40E+08	30	0,60	9,20E+06	30	1,2	5,25
<i>B. aestuarii</i> JP1 – MS - 40°C	3,00E+08	48	0,37	8,10E+07	18	27	5,01
<i>B. aestuarii</i> JP2 – MS - 55°C	9,80E+07	18	0,54	4,10E+06	24	4,2	2,40
<i>B. aestuarii</i> JP2 – MS - 40°C	4,80E+07	18	0,45	1,20E+06	30	2,5	1,24

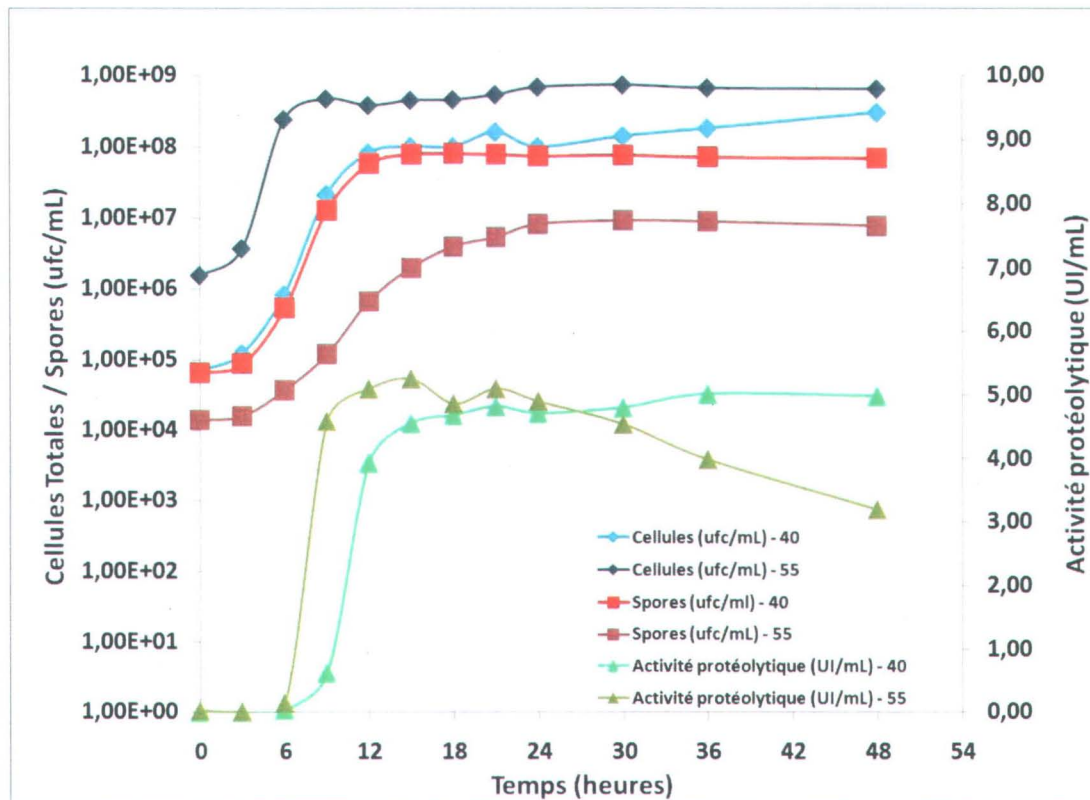


Figure 34 Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche *B. aestuarii* JP1 à 40 et 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de milieu semi-synthétique.

D'un autre côté, l'activité protéolytique était beaucoup plus stable à la température de 40°C et ce, pour les deux souches. Bien que la température de stabilité pour l'activité protéolytique soit de 60°C, une température plus basse, lors de la production, pourrait affecter la stabilité des protéases. La stabilité est un facteur important pour la commercialisation des protéases, mais il est plus avantageux de les produire à la température optimale et d'arrêter la réaction avant la désactivation des protéases que de produire à une plus faible température.

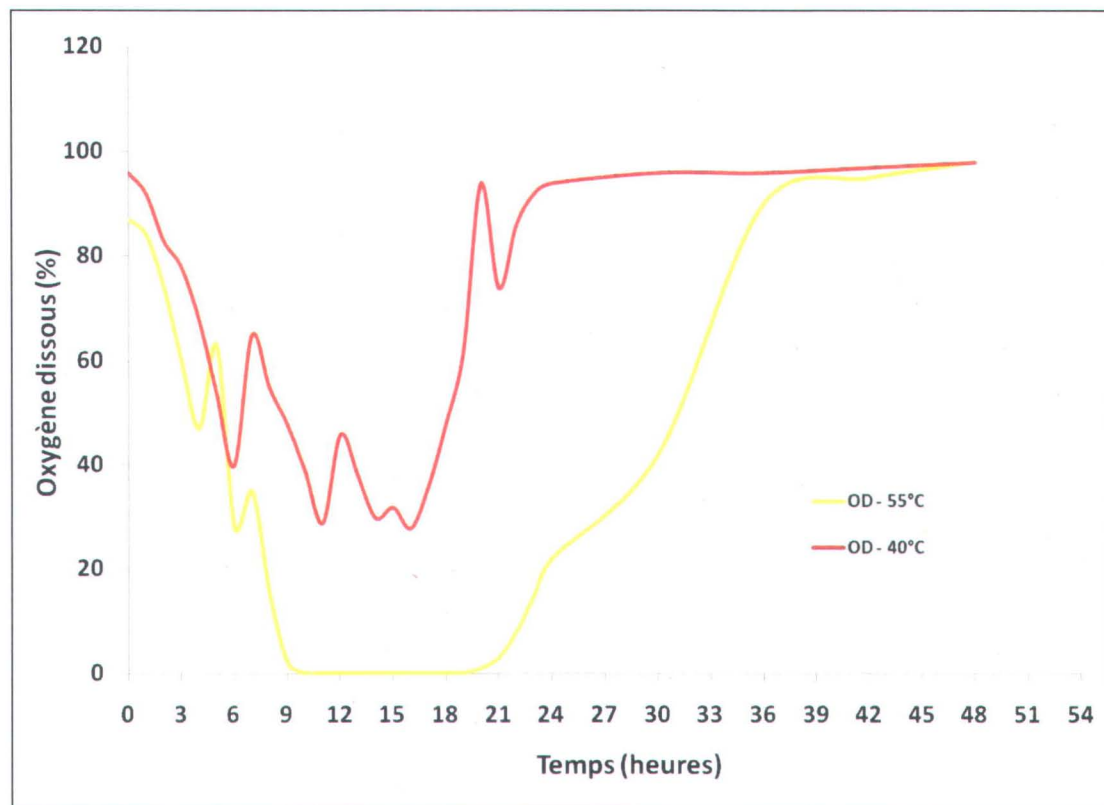


Figure 35 Profils d'oxygène dissous (OD) de la souche *B. aestuarii* JP1 à 40 et 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de milieu semi-synthétique.

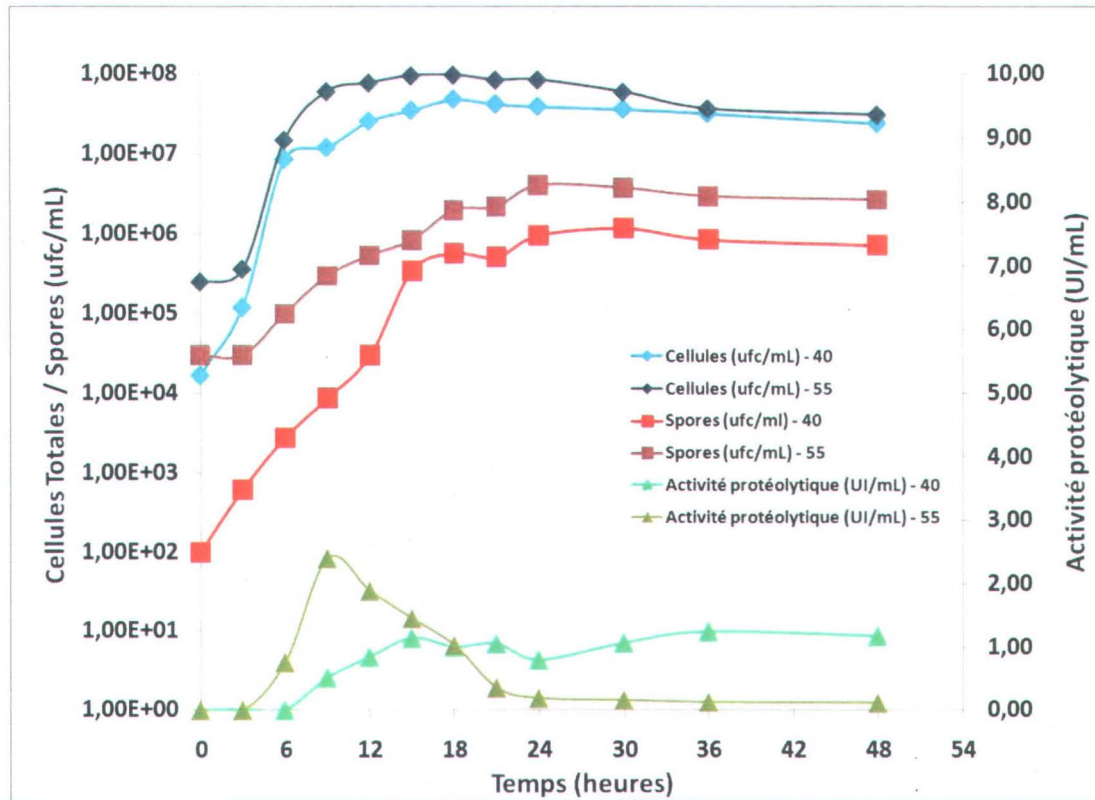


Figure 36 Profils de croissance, de spores et d'activité protéolytique de la souche *B. aestuarii* JP2 à 40 et 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de milieu semi-synthétique.

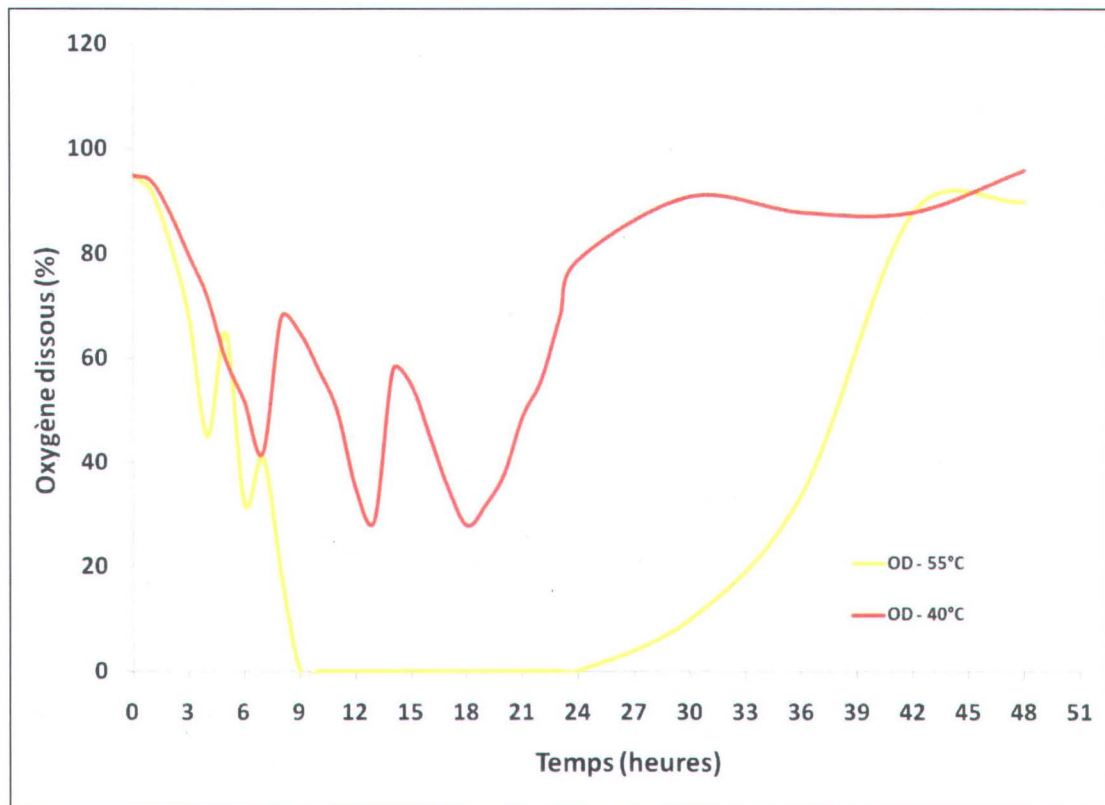


Figure 37 Profils d'oxygène dissous (OD) de la souche *B. aestuarii* JP2 à 40 et 55°C dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de milieu semi-synthétique.

Chapitre VII

Conclusion

La réalisation de ce projet a permis de mettre en lumière plusieurs aspects de la bioconversion de rejets municipaux. Il a été établi que les boues d'épuration municipales pouvaient contenir des souches bactériennes sauvages ayant un potentiel pour la production d'enzymes. Il a été établi aussi que les boues supportent la culture de ces nouveaux isolats et que ceux-ci produisaient des protéases aux fonctionnalités accrues comme la thermostabilité. La souche de *Bacillus aestuarii* JP1 a montrée les meilleurs résultats dans toutes les situations de la recherche. D'un autre côté, la production industrielle d'enzymes se fait dans des milieux semi-synthétiques dont les ingrédients sont très coûteux à grande échelle. Ce projet a donc démontré la faisabilité d'utiliser des souches indigènes des boues d'épuration pour produire des protéases dans ces mêmes boues.

Les expériences ont permis aussi de démontrer que les nouveaux isolats réagissaient de différentes façons lors de leur production en boues d'épuration municipales. Les expériences ont entre autre permis de découvrir que deux isolats de la même espèce bactérienne, avec une différence génétique mineure, se comportent très différemment dans les boues d'épuration. Les quatre souches étudiées ont permis d'arriver à différentes conclusions :

- Sur la faible quantité de bactéries thermophiles des boues d'épuration municipales, la majorité de celles produisant des protéases sont des bacilles du genre *Bacillus* sp. Ce résultat était attendu puisque la majorité des microorganismes industriels producteurs de protéases appartiennent au genre bactérien *Bacillus* sp.

- La concentration de la matière organique des boues d'épuration est un moyen plus adéquat pour contrer la pauvreté du milieu original (non concentré) que l'ajout de suppléments synthétiques. En effet, il est possible d'améliorer la croissance bactérienne et la production de protéases en concentrant les MES des boues d'épuration.
- La concentration de la matière organique des boues d'épuration a aussi permis de visualiser l'effet de l'inhibition par le substrat sur la production de cellules microbiennes, la sporulation et la production de protéases thermostables.
- L'étude de l'effet de l'oxygène sur la croissance et sur la production de protéases a permis d'établir que l'utilisation de pression est une excellente stratégie pour contrer le manque d'oxygène survenant lors de la culture de bactéries thermophiles.
- Ce projet a démontré que la température pour la production d'enzymes thermostables est un facteur plus important que de conserver un taux d'oxygène supérieur à 20%.

De plus, l'utilisation des boues d'épuration municipales pour la culture de microorganismes producteurs de protéases a permis de réduire le volume des boues utilisées d'environ 20% car les MES passent de 25 g/L à ~19 g/L. L'optimisation du procédé pourrait augmenter ce rendement jusqu'à 40%, ce qui réduirait grandement les volumes de boues à traiter et à incinérer, le tout, en générant un produit commercialisable.

Les protéases thermostables produites dans les boues d'épuration par les nouveaux isolats pourraient être récoltées et commercialisées. Ces protéases pourront être appliquées dans des procédés industriels opérant à des températures élevées. Les protéases peuvent être utilisées dans les détergents domestiques et industriels et des compagnies de lingerie (uniformes, literie) seraient les plus intéressées. Il y a aussi

d'autres marchés où peuvent être appliquées d'autres types de protéases comme celles résistantes à de faibles températures et produites par des souches psychrophiles.

L'utilisation de détergents et de nettoyants biologiques, efficaces à basses températures, est un marché grandissant. Au niveau des besoins industriels, les techniques développées dans ce projet de recherche pourraient être adaptées à la production de nouveaux isolats psychrophiles ou autres producteurs de protéases. Que l'on ait besoin d'antibiotiques dans des pays pauvres ou de biofertilisants dans une future station spatiale, l'utilisation de boues d'épuration pour la production de microorganismes industriels pourra répondre à ces besoins. La recherche sur leur bioconversion doit se poursuivre.

Chapitre VIII

Recommandations

Plusieurs recommandations sont faites afin d'orienter les futures recherches sur le sujet du projet.

Tout d'abord, il faudra approfondir les caractéristiques des souches et des protéases produites. Des analyses génétiques et biochimiques sur les deux souches de *Bacillus aestuarii* seront nécessaires afin d'en déterminer les différences. Les paramètres optimaux de pH et de température, autant sur les souches que sur les protéases devront être précisés. Des analyses moléculaires des protéases seront nécessaires pour déterminer les caractéristiques de la solution de protéases (types, structure 3D). Ces caractéristiques pourraient permettre de mieux comprendre leur fonctionnement et d'évaluer leur potentiel à être utilisées en industrie.

Différents types de boues d'épuration devront être utilisés comme milieux de culture afin de mesurer l'impact sur le comportement des souches et les fonctionnalités des protéases. Il serait aussi intéressant de déterminer les autres activités enzymatiques de ces nouveaux isolats. Il est possible que ces souches soient aussi performantes pour la production d'autres enzymes commerciales.

Plusieurs recherches sur la purification et la formulation des solutions d'enzymes devront être menées afin de permettre la commercialisation d'un produit. Des préparations sèches et liquides devront être élaborées et les additifs de stabilisation des formulations devront aussi être étudiés afin d'en déterminer les impacts sur l'activité enzymatique.

Bibliographie

- Aehle, W. 2007. *Enzymes in industry*. Chapters 1 and 3. 3rd edition. Weinheim, Germany. 517 p.
- Alagappan, G. and R. M. Cowan. 2004. "Effect of temperature and dissolved oxygen on the growth kinetics of *Pseudomonas putida* F1 growing on benzene and toluene". *Chemosphere*, vol. 54, p. 1255-1265.
- Alam, M.Z., S.A. Muyibi and R. Wahid. 2008. "Statistical optimization of process conditions for cellulase production by liquid state bioconversion of domestic wastewater sludge". *Bioresource Technology*, vol. 99, p. 4709-4716.
- APHA-AWWA-WPCF. 1995. In: L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, R.R. Trussell and M.A. Franson (Eds.). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18th edition. Washington D.C., USA.
- Archana, A. and T. Satyanarayana. 2003. "Purification and characterization of a cellulase-free xylanase of a moderate thermophile *Bacillus licheniformis* A99". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 19, p. 53-57.
- Arnaud, A. et P. Galzy. 1999. *Biotechnologie*. 5^e Édition; R. Scriban. Technique et Documentation Lavoisier. Paris, France, 1042 p.
- Arrhenius, S. 1889. "Arrhenius, on the reaction rate of the inversion of non-refined sugar upon souring". *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, vol. 4, p. 226-248.
- Auriol, M. 2007. « Enlèvement des perturbateurs endocriniens (hormones) par oxydation enzymatique, dans les eaux usées ». Thèse de Doctorat, Québec, INRS-ETE, 425 p.
- Aviron-Violet, P., J.L. Baret, C. Bertrand, B. Blazy, F. Bouvier, M. Comtat, P.R. Coulet, P. Dupuy, J.F. Hervagault, A. Joyeaux, J. Laurent, P. Monsan, D. Thomas, P. Sicard et G.M.A. Van Beynun. 1982. *Les enzymes. Production et utilisations industrielles*. Borda. Paris, France. 349 p.
- Banik, R.M. and M. Prakash. 2004. "Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*". *Microbiological Research*, vol. 159, p. 135-140.

- Barnabé, S., J.-L. Sasseville, R.D. Tyagi and J.R. Valéro. 2003. « Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières? ». *Vecteur Environnement*, vol. 36 no. 2, p. 50-62.
- Barnabé, S. 2004. « Hydrolyse et oxydation partielle des boues d'épuration comme substrat pour produire *Bacillus thuringiensis* HD-1 ». Thèse de Doctorat, Québec, INRS-ETE, 235 p.
- Bauer, M., L. Driskil, W. Callen, M. Snead, E. Mathur and R. Kelly. 1999. "An endoglucanase EglA, from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* hydrolyzes α -1,4 bonds in mixed linkage (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D-glucans and cellulose". *Journal of Bacteriology*, vol. 181, p. 284-290.
- Beadle, B.M., W.A. Baase and D.B. Wilson. 1999. "Comparing the thermodynamic stabilities of a related thermophilic and mesophilic enzyme". *Biochemistry*, vol. 38, no. 8, p.2570-2576.
- Beg, Q.K., V. Sahai and R. Gupta. 2003. "Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor". *Process Biochemistry*, vol. 39, p. 203-209.
- Beg, Q.K., R.K. Saxena and G. Gupta. 2002. "De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations". *Process Biochemistry*, vol. 37, p. 1103-1109.
- Betzl, C., S. Klupsch, G. Papendorf, S. Hastrup, S. Branner and K. S. Wilson. 1992. "Crystal structure of the alkaline proteinase SavinaseTM from *Bacillus lentus* at 1.4 Å resolution". *Journal of Molecular Biology*, vol. 223, p. 427-445.
- Bezawada, J., R.D. Tyagi and R.Y. Surampalli. 2009. "Comparison of protease activities in different *Bacillus licheniformis* strains using wastewater sludge and synthetic soy medium as raw material". *Environmental Technology*, vol. xxx, p. xxx-xxx.
- Bharat, B. and G. Hoondal. 1998. "Isolation, purification and properties of thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11". *Biotechnology Letters*, vol. 20, p. 157-159.
- Bommarius, A.S. and J.M. Broering. 2005. "Established and novel tools to investigate biocatalyst stability". *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 23, no. 3-4, p. 125-139.

- Brar, S.K., M. Verma, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, S. Barnabé and J.R. Valéro. 2007. "*Bacillus thuringiensis* proteases: production and role in growth, sporulation and synergism" *Process biochemistry*, vol. 42, p. 773-790.
- Brar, S.K., M. Verma, R.D. Tyagi, J.R. Valéro and R.Y. Surampalli. 2005. "Sludge based *Bacillus thuringiensis* biopesticides: Viscosity impacts". *Water Research*, vol. 39, p. 3001-3011.
- Brar, S.K. 2004. « Études rhéologiques de boues fermentées par *Bacillus thuringiensis* et développement de formulations aqueuses et sèches ». Thèse de Doctorat (version en rédaction de 2004), Québec, INRS-ETE, 682 p.
- Brøndsted, L., M.T. Andersen, M. Parker, K. Jørgensen and H. Ingmer. 2005. "The HtrA protease of *Campylobacter jejuni* is required for heat and oxygen tolerance and for optimal interaction with human epithelial cells". *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71 no. 6, p. 3205-3212.
- Bruins, M.E., A.E.M. Janssen and R.M. Boom. 2006. "Equilibrium shifts in enzyme reactions at high pressure". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 39, p. 124-127.
- Buchner, E. 1897. "Alkoholische Gährung ohne Hefezellen : vorläufige Mitteilung ". *Berichte der Chemischen Gesellschaft*, vol. 30, p. 117-124.
- Calik, P., E. Bilir, G. Calik and T. H. Ozdamar. 2002. "Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*". *Enzyme and microbial technology*, vol. 31, p. 685-697.
- Calik, P., G. Calik, S. Takaç and T.H. Özdamar. 2000. "Metabolic flux analyses for serine alkaline protease production". *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 27, p.793-805.
- Champagne, P. 2007. "Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: A Canadian perspective". *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 50, no. 30 p. 211-230.
- Chenel, J.P., R.D. Tyagi and R.Y. Surampalli. 2008. "Production of thermostable protease enzyme in wastewater sludge using thermophilic bacterial strains isolated from sludge". *Water Science and Technology*, vol. 57, no. 5, p. 639-645.

- Chenel, J.P. 2005. « Production d'enzymes protéolytiques par des bactéries non conventionnelles isolées de boues d'épuration municipales ». Mémoire de Maîtrise, Québec, INRS-ETE, 59 p.
- Cheung, S. W. and B.C. Anderson. 1997. "Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater solids". *Bioresource Technology*, vol. 59, p. 81-96.
- Christie, P. and H.H.R. Mitchell. 2009. *Primer on bioproducts*. (page consultée en juin 2009). [en ligne]. Adresse URL : www.biocap.ca/images/pdfs/BioproductsPrimerE.pdf.
- Chu, I.M., C. Lee and T.S. Li. 1992. "Production and degradation of alkaline protease in batch culture of *Bacillus subtilis* ATCC 14416". *Enzyme Microbiology and Technology*, vol. 14, p. 755-761.
- Colins, T., C. Gerday and G. Feller. 2005. "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases". *FEMS Microbiology Letters*, vol. 29, p. 3-23.
- Corporation het. 2009. *Horizon Environnement Technologie - Produit fini*. (page consultée en août 2009). [en ligne]. Adresse URL : <http://www.corporationhet.com/Produit-fini.php>
- De Azeredo, L.A.I., D.M.G. Freire, R.M.A. Soares, S.G.F. Leite and R.R.R. Coelho. 2004. "Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil". *Enzyme and Microbial Technology*. vol. 34, p. 354-358.
- Demirijan, D., F. Moris-Varas and C. Cassidy. 2001. "Enzymes from extremophiles". *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 5, p. 144-151.
- Djekrif-Dakhmouche, S., Z. Gheribi-Aoulmi, Z. Meraihi and L. Bennamoun. 2006. "Application of a statistical design to the optimization of culture medium for a-amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder". *Journal of Food Engineering*, vol. 73, p. 190-197.
- Dobrev, G.T., I.G. Pishtiyski, V.S. Stanchev and R. Mircheva. 2006. "Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design". *Bioresource Technology*, vol. 98, p. 2671-2678.
- Drouin, M., C.K. Lai, R.D. Tyagi and R.Y. Surampalli. 2008. "*Bacillus licheniformis* proteases as high value added products from fermentation of wastewater

sludge: pre-treatment of sludge to increase the performance of the process". *Water Science and Technology*, vol. 57, no. 3, p. 423-429.

- Drouin, M. 2005. « Étude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat ». Mémoire de Maîtrise, Québec, INRS-ETE, 103 p.
- Durham, D.R., D.B. Stewart and E.J. Stellwag. 1987. "Novel alkaline and heat stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX6638". *Journal of Bacteriology*, vol. 169, p. 2762-2768.
- Egmont, M.R. 1997. "Application of proteases in detergents". *Surfactant Science Series*, vol. 69, p. 61- 74.
- Everly, C. and J. Alberto. 2000. "Stressors, stress and survival: overview". *Frontiers in Bioscience*, vol. 5, p. 780-786.
- Farrera, F., F. Perez-Guevara and M. De La Torre. 1998. "Effect of the media composition on the growth parameters and biological properties of *Bacillus thuringiensis* HD-73". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 49, p. 758-765.
- Ferrero, M.A., G.R. Castro, C.M. Abate, M.D. Baigorì and F. Siñeriz. 1996. "Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 45, p. 327-332.
- Fonseca, M.J.V. and S. Said. 1994. "The pectinase produced by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectin or orange pulp pellets as inducers". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 42, p. 32-35.
- Frankena, J., G.M. Koningstein, H.W. van Verseveld and A.H. Stouthamer. 1986. "Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, p. 106-112.
- Gershenson, A., J. A. Schauerte, L. Giver, and F. H. Arnold. 2000. "Tryptophan fluorescence study of enzyme flexibility and unfolding in laboratory evolved thermostable esterases". *Biochemistry*, vol. 39, p. 4658-4665.
- Gessesse, A. 1997. "The use of nug meal as a low-cost substrate for the production of alkaline protease by the alkaliphilic *Bacillus* sp. AR-009 and some properties of the enzyme". *Bioresource technology*, vol. 62, p. 59-61.

- Gomes, J. and A. S. Menawat. 2000. "Precise control of dissolved oxygen in bioreactors } a model-based geometric algorithm". *Chemical Engineering Science*, vol. 55, p. 67-78.
- Gomez, E., V.E. Santos, A. Alcon and F. Garcia-Ochoa. 2006. "Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: Effect on growth and BDS capability". *Chemical Engineering Science*, vol. 61, p. 4595-4604.
- Gouvernement du Canada. Ministère de la justice. 2009. *Loi Canadienne sur la protection de l'environnement. Loi DORS/89-501*. (page consultée en juin 2009). [en ligne]. Adresse URL : <http://lois.justice.gc.ca/fr/showtdm/cs/C-15.31///fr?noCookie>
- Guffanti, A.A., M. Mann, T.L. Sherman and T. Krulwich. 1984. "Patterns of electrochemical proton gradient formation by membrane vesicles from an obligately acidophilic bacterium". *Journal of Bacteriology*, vol. 159, p. 448-452.
- Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, V.K. Goswami and B. Chauhan. 2003. "Microbial α -amylases: a biotechnological perspective". *Process Biochemistry*, vol. 38, p. 1599-616.
- Gupta, R., Q.K. Beg and P. Lorenz. 2002. "Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 59, p. 15-32.
- Hadad, D., S. Geresh and A. Sivan. 2005. "Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*". *Journal of Applied Microbiology*, vol. 98, p. 1093-1100.
- Hadj-Ali, N.E., R. Agrebi, B. Ghorbel-Frikha, A. Sellami-Kamoun, S. Kanoun and M. Nasri. 2007. "Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1". *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, no. 4, p. 515-523.
- Hagani, Z.S. and S. Soltanali. 2008. "Modeling of air stripping from volatile organic compounds in biological treatment processes". *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 5, no. 3, p. 353-360.
- Hameed, A., T. Havarz and C.S. Evans. 1999. "Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of

- Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 74, p. 5-8.
- Han, J. and J.J. Zhong. 2003. "Effects of oxygen partial pressure on cell growth and ginsenoside and polysaccharide production in high density cell cultures of *Panax notoginseng*". *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 32, p. 498-503.
- Hart, H.E., M.E. Parish, J.K. Burns and L. Wicker. 1991. "Orange finisher pulp as substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*". *Journal of Food Science*, vol. 56, no. 2, p. 480-483.
- Hei, D.J. and D.S. Clark. 1994. "Pressure stabilization of proteins from extreme thermophiles". *Applied Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 3, p. 932-939.
- Herbert, R. and R. Sharp. 1992. *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. New York: Chapman and Hall, 331 p.
- Horikoshi, K. 1971. "Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* no. 221". *Agricultural Biology and Chemistry*, vol. 36, p. 1407-1414.
- Horton, H., L. Moran, R. Ochs, J. Rawn. et K. Scrimgeour. 1994. *Principes de biochimie*. Italie: DeBoeck Université, 720 p.
- Huang, X., B. Tian, Q. Niu, J. Yang, L. Zhang and K. Zhang. 2005. "An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes". *Research in Microbiology*, vol. 156, p. 719-727.
- Huang, T.K, P.M. Wang and W.T. Wu. 2001. "Cultivation of *Bacillus thuringiensis* in an airlift reactor with wire mesh draft tubes". *Biochemistry Engineering Journal*, vol. 7, p. 35-39.
- Hunter-Cevera, J.C. 1998. "The value of microbial diversity". *Current Opinion in Microbiology*, vol. 1, p. 278-285.
- Illanes, A. 2008. *Enzyme biocatalysis*. Chapter 3: Homogeneous enzyme kinetics. Chile: Springer, p. 107-153.
- Jaillet, C., F. Lézaud et C. Marzin. 2003. *La biofiltration - Les principaux biofiltres brevetés en France*. (page consultée en août 2009). [en ligne]. Adresse URL : <http://ruisseau.oieau.fr/eaudoc/pdf/Les%20biofiltres.pdf>

- Johnvesly, B. and G.R. Naik. 2001. "Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium". *Process Biochemistry*, vol. 37, p. 139-144.
- Joo, H.-S. and C.-S. Chang. 2005. "Production of protease from a new alkaliphilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties". *Process Biochemistry*, vol. 40, p. 1263-1270.
- Junker, B., J. Moore, M. Sturr, K. Mcloughlin, J. Leporati, S. Yamazaki, M. Chartrain and R. Greasham. 2001. "Pilot-scale production of intracellular and extracellular enzymes". *Bioprocess and biosystems engineering*, vol. 24, no. 1, p. 39-49.
- Khan, T., S.H. Hyun and J.K. Park. 2007. " Production of glucuronan oligosaccharides using the waste of beer fermentation broth as a basal medium". *Enzyme and microbial technologie*, vol. 47, p. 89-92.
- Klass, D. 2004. *Biomass for renewable energy and fuels*. Encyclopedia of energy, Elsevier Inc. 5373 p.
- Kobayashi, T., Y. Hakamada, S. Adachi, J. Hitomi, T. Yoshimatsu, K. Koike, S. Kawai and S. Ito. 1995. "Purification and properties of an alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. KSM-K16". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 43, p. 473-481.
- Kohilu, U., P. Nigam, D. Singh and K. Chaudhary. 2001. "Thermostable, alkaliphilic and cellulase free xylanases production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C". *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 28, p. 606-610.
- Kocabiyik, S. and H. Özel. 2007. "An extracellular—Pepstatin insensitive acid protease produced by *Thermoplasma volcanium*". *Bioresource Technology*, vol, 98. p. 112-117.
- Kulkarni, N., A. Shendye and M. Rao. 1999. "Molecular and biotechnological aspects of xylanases". *FEMS Microbiology Letters*, vol. 23, p. 411-456.
- Kumar, S. and R. Nussinov. 2001. "How do thermophilic proteins deal with heat? A review". *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 58, p. 1216-1233.
- Kumar, C.G. and H. Takagi. 1999. "Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint". *Biotechnology Advances*, vol. 17, p. 561-594.

- Kunitz, M. 1947. "Crystalline soybean trypsin inhibitor". *The Journal of General Physiology*, vol. 30, p. 291-310.
- Lachhab, K., R.D. Tyagi and J.R. Valéro. 2001. "Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration". *Process Biochemistry*, vol. 37, no. 2, p. 197-208.
- Lamontagne, E. 2004. « Caractérisation de nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* pour la production de biopesticides et d'enzymes par fermentation de boues d'épuration municipales ». Mémoire de Maîtrise, Québec, INRS-ETE, 111 p.
- Li, W., R. A. Grayling, K. Sandman, S. Edmondson, J. W. Shriver, and J. N. Reeve. 1998. "Thermodynamic stability of archaeal histones". *Biochemistry*, vol. 37, p. 10563-10572.
- Li, X., H. Ma, Q. Wang, S. Matsumoto, T. Maeda and H.I. Ogawa. 2009. "Isolation, identification of sludge-lysing strain and its utilization in thermophilic aerobic digestion for waste activated sludge". *Bioresource Technology*, vol. 100, p. 2475-2481.
- Lopez, G. 1999. "DNA supercoiling and temperature adaptation: a clue to early diversification of life". *Journal of Molecular Evolution*, vol. 46, p. 439-452.
- Malinowska-Panczyk, E., I. Kotodziejska and E Dunajsky. 2008. "Effect of high pressure on selected bacteria at subzero temperature". *Polish journal of food and nutrition sciences*, vol. 58, no. 4, p. 419-424.
- Manco, G., E. Giosue, S. D'Auria, P. Herman, G. Carrea, and M. Rossi. 2000. "Cloning, overexpression, and properties of a new thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol.373, p. 182-192.
- Maurer, K.H. 2004. "Detergent proteases". *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 15, p. 330-334.
- Mackey, B.M., C.A. Miles, S.E. Parsons and D.A. Seymour. 1991. "Thermal denaturation of whole cells and cell components of *Escherichia coli* examined by differential scanning calorimetry". *Journal of General Microbiology*, vol. 137, p. 2361-2374.

- Mayo, A.W. and T. Noike. 1996. "Effects of temperature and pH on the growth of heterotrophic bacteria in waste stabilization ponds". *Water resources*, vol. 30, no. 2, p. 447-455.
- Meunier, N. 1999. « Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales ». Mémoire de Maîtrise, Québec, INRS-ETE, 168 p.
- Misset, O. 1993. *Stability of industrial enzymes*. In: van den Tweel, W.J.J., A. Harder and R. Buitelaar (editors). *Stability and stabilization of enzymes*. Amsterdam: Elsevier, p. 111-131.
- Mtui, G. and Y. Nakamura. 2005. "Bioconversion of lignocellulosic waste from selected dumping sites in Dar es Salaam, Tanzania". *Biodegradation*, vol. 16, p. 493-499.
- Moon, S.H. and S.J. Parulekar. 1993. "Some observations on protease production in continuous suspension cultures of *Bacillus firmus*". *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 41, p. 43-54.
- Moss, G.P. 2009. *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)*. (page consultée en juillet 2009). [en ligne]. Adresse URL : <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>
- Nielsen, J., J. Villadsen and G. Lidén. 2003. *Bioreaction Engineering Principles - Chapter 10*. Second edition. Lyngby, Denmark, 554 p.
- Nobel Prize. 2009. *Eduard Buchner*. (page consultée en juin 2009). [en ligne]. Adresse URL : <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/1907/>
- Olempska-Bier, Z.S., R.I. Merker, M.D. Ditto and M.J. DiNovi. 2006. "Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 45, p. 144-158.
- Oskouie, S.F.G., F. Tabandeh, B. Yakhchali and F. Eftekhari. 2008. "Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*". *Biochemical Engineering Journal*, vol. 39, p. 37-42.
- Paavilainen, S., M. Mäkelä and T. Korpela. 1995. "Proton and carbon inventory during the growth of an alkaliphilic *Bacillus* indicates that protons are

- independent from acid anions". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 80, no. 5, p. 429-433.
- Pedersen, A.G. 1992. "Characterization and modeling of bioreactors". Ph.D. Thesis. Lyngby, Technical university of Denmark, xx p.
- Perego, P. A. Converti and M. Del Borghi. 2003. "Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolysate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*". *Bioresource Technology*, vol. 89, p. 125-131.
- Piggot, P. J. 2004. "Sporulation". In M. Schaechter (Ed). *The desk encyclopedia of microbiology*. Elsevier Academic Press, California, USA. p. 942-950.
- Rollins, M. J., S. E. Jensen, S. Wolfe and D. W. S. Westlake. 1990. "Oxygen depresses deacetoxycephalosporin C synthase and increases the conversion of penicillin N to cephamycin C in *Streptomyces clavuligerus*". *Enzyme Microbiological Technology*, vol. 12, p. 40-45.
- Saeki, K., K. Ozaki, T. Kobayashi et S. Ito. 2007. "Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 103, no. 6, p. 501-508.
- Saha, B. 2003. "Hemicellulose bioconversion". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 30, p. 279-291.
- Schnell, S. and S.M. Hanson. 2006. "A test for measuring the effects of enzyme inactivation". *Biophysical Chemistry*, vol. 125, p. 269-274.
- Singh, J., N. Batra and R.C. Sobti. 2001. "Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1". *Process Biochemistry*, vol. 36, p. 781-785.
- Sivasubramanian, S., B. Murali Manohar, A. Rajaram and R. Puvanakrishnan. 2008. "Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease". *Chemosphere*, vol. 70, p. 1015-1024.
- Smets, B.F., A. Jobbagy, R.M. Cowan and C.P.L. Grady Jr. 1996. "Evaluation of respirometric data: identification of features that preclude data fitting with existing kinetic expressions". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 33, p. 88-99.
- Sookkheo, B., S. Sinchaikul, S. Phutrakul and S.T. Chen. 2000. "Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus*

- stearothermophilus* TLS33". *Protein Expression and Purification*, vol. 20, p. 142-151.
- Subramanyan, S. and P. Prema. 2002. "Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology and application". *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 22, p. 33-64.
- Taber, H.W. 1993. "Respiratory chains". In: A.L Sonenshein, J.A. Hoch and R. Lorch. (Eds.). *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics*. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p. 199-212.
- Tari, C., H. Genckal and F. Tokatli. 2006. "Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21". *Process Biochemistry*, vol. 41, p. 659-665.
- Thanh, N.T., H.N. Murthy, K.-W. Yu, C.S. Jeong, E.-J. Hahn and K.-Y. Paek. 2006. "Effect of oxygen supply on cell growth and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*". *Journal of Plant Physiology*, vol. 163, p. 1337-1341.
- Tirado-Montiel, M.L., R.D. Tyagi and J.R.Valero. 2001. "Wastewater treatment sludge as raw material for *Bacillus thuringiensis* production". *Water Resources*, vol. 31, no. 16, p. 3807-3816.
- Topiwala, H. and C.G. Sinclair. 1971. "Temperature relationship in continuous culture". *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 13, no. 6, p. 795-813.
- Tsai, S.H., C.P. Liu and S.S. Yang. 2007. "Microbial conversion of food wastes for biofertilizer production with thermophilic lipolytic microbes". *Renewable Energy*, vol. 32, p. 904-915.
- Tsuchida, O., Y. Yamagata, T. Ishizuka, T. Arai, J. Yamada, M. Takeuchi and E. Ichishima. 1986. "An alkaline proteinase of an alkalophilic *Bacillus* sp.". *Current Opinion in Microbiology*, vol. 14, p. 7-12.
- Tyagi, R.D. 2006. *Procédés de bioréaction*. Québec : Programme des sciences de l'eau. 35 p.
- Tyagi, R.D., V.S. Foko, S. Barnabé, A.S. Vidyarthi and J.R. Valéro. 2002. "Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as raw material". *Water Science and Technology*, vol. 46, no. 10, p. 247-254.

- van Putten, A.B., F. Spitzenberger, G. Kretzmer, B. Hitzmann, M. Dors, K. Simutis and K. Schügerl. 1996. "Improvement of the production of subtilisin Carlsberg alkaline protease by *Bacillus licheniformis* by on-line process monitoring and control in a stirred tank reactor". *Journal of Biotechnology*, vol. 49, p. 83-93.
- Vardar-Sukan, F. 1998. "Foaming : Consequences, prevention and destruction". *Biotechnology Advances*, vol. 16, no. 5-6, p. 913-948.
- Vieille, C. and G. J. Zeikus. 2001. "Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability". *Microbiologie and Molecular Biology Reviews*, vol. 65, p. 1-43.
- Vidyarathi, A.S., R.D. Tyagi, J.R. Valéro and R.Y. Surampalli. 2002. "Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material". *Water Research*, vol. 36, p. 4850-4860.
- Yeza, A., R.D. Tyagi, J.R. Valéro and R.Y. Surampalli. 2006. "Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* grown in wastewater sludge". *Process Biochemistry*, vol. 41, p. 794-800.
- Yeza, A., R.D. Tyagi, J.R. Valéro and R.Y. Surampalli. 2005. "Wastewater sludge pre-treatment for enhancing entomotoxicity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*". *World Journal of Microbiology and Microbiology*, vol. 21, no. 6-7, p. 1165-1174.
- Yeza, A., R.D. Tyagi, J.R. Valéro, R.Y. Surampalli and J. Smith. 2004. "Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 31, no. 12, p. 545-552.
- Zavodszky, P., J. Kardos, A. Svingor, and G. A. Petsko. 1998. "Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, p.7406-7411.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller. 2000. "A greedy algorithm for aligning DNA sequences". *Journal of Computational Biology*, vol. 7, no. 1-2, p. 203-214.
- Zouari, N., O. Achour and S. Jaoua. 2002. "Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* and overcoming of catabolite repression by using

highly concentrated gruel and fish meal medium in 2 and 20 dm³ fermentors".
Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 77, p. 877-882.

Zouari, N and S. Jaoua. 1999. "Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki strain on gruel-based media". *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 25, p. 364-371.

Zuidweg, M. H. J., C.J.K. Bos and H. van Welzen. 1972. "Proteolytic components of alkaline proteases of *Bacillus* strains. Zymograms and electrophoretic isolation". *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 14, p. 685-714.

Zumdahl S. S. 1998. *Chimie des solutions*. Facteurs qui influencent la solubilité. 2^{ème} édition. Les Éditions CEC inc. Anjou. p. 67.

Appendice A

Protocole détaillé de l'extraction d'ADN

L'identification des souches nouvellement isolées s'est faite par séquençage mais il a tout d'abord fallu extraire l'ADN des bactéries. Une colonie pure de bactéries est ensemencée dans 150 mL de milieu Luria-Bertani (1.0% de Bacto-tryptone ; 0.5% d'extrait de levure; 1.0% de NaCl; ajuster le pH à 7 avec du NaOH 5N; stériliser à 121°C pendant 15 minutes à 15 psi) dans une fiole Erlenmeyer de 500 mL et incubée à 55°C pendant 24 heures à 200 rpm.

Voici le protocole détaillé permettant l'extraction d'ADN.

Note : Les solutions sont détaillées dans l'Appendice B.

1. Transférer 1.5 mL de culture bactérienne dans un tube Eppendorf de 2.0 mL, centrifuger à 6000 rpm à 4°C pendant 15 minutes et décanter le surnageant. Ajouter du lysozyme pour les Gram Positives.
2. Ressuspendre les cellules dans 600 µL de tampon TE à l'aide d'un vortex, ajouter 50 µL de SDS à 10% et 50 µL de protéinase K (20 mg/mL dans le tampon TE). Incuber une heure à 37°C dans un bain-marie.
3. Centrifuger le bouillon à 6000 rpm à 4°C pour 15 minutes.
4. Transférer le surnageant contenant l'ADN dans un nouveau tube stérile et extraire avec 700 µL de phénol. Extraire deux fois avec 350 µL de phénol et 350 µL de chloroforme. Extraire deux fois avec 700 µL de chloroforme. Chaque extraction est suivie d'une centrifugation à 6000 rpm à 4°C pour 10 minutes. Conserver toujours la partie supérieure.
5. Précipitez les acides nucléiques par l'addition de 25 µL de NaCl 5 M (ou acétate de sodium) et 2.2 mL d'éthanol 95%. Agiter légèrement avec le vortex et incuber minimum deux heures à -20°C.
6. Centrifuger le tube à 12 000 rpm à 4°C pour 15 minutes, jeter le surnageant et laisser le culot sécher à température pièce.
7. Ressuspendre le culot dans 100 µL de tampon TE, ajouter 5 µL de RNaseA (5 mg/mL dans un tampon TE) et incuber 30 minutes à 37°C dans un bain-marie.

8. Précipiter l'ADN avec 40 μL d'acétate de sodium 5 M (ou NH_4Ac) et 250 μL d'isopropanol et incubé 5 minutes à température pièce.
9. Centrifuger 10 minutes à 12 000 rpm à 4°C, nettoyer le culot deux fois avec de l'éthanol 70%, laisser sécher et dissoudre l'ADN dans 50 μL d'eau Mili-Q (pour séquençage), 100 μL de tampon TE (pour entreposage) ou 100 μL de Tris-Cl (pour PCR).

Afin de déterminer si l'extraction d'ADN s'est bien déroulée, il faut soumettre les échantillons à une électrophorèse sur gel d'agarose. Voici donc le protocole permettant la réalisation de cette électrophorèse.

1. Couler 70 mL d'un gel d'agarose de haute résistance (1% dans de l'eau distillée). Dissoudre l'agarose en utilisant la flamme d'un brûleur. Lors de la dissolution de l'agarose, ajouter 0.1 μL de Bromure d'éthidium (EtBr_2).
2. À part, mélanger 1 μL de colorant de charge avec 5 μL d'extrait d'ADN.
3. Lorsque le gel est bien figé, charger le avec les extraits d'ADN.
4. Mettre la solution d'électrophorèse (tampon TAE 1X) dans le bac d'électrophorèse, assez pour recouvrir le gel.
5. Débuter la migration en appliquant un voltage de 40 V. La migration dure environ 3 heures ou jusqu'à ce que le front de migration arrive à l'extrémité du gel.
6. Arrêtez le courant électrique et observer le gel sous une lampe UV. Une seule bande indique un ADN pur. Plusieurs bandes indiquent une dénaturation de l'ADN ou une mauvaise extraction.

Pour le séquençage, les échantillons sont réfrigérés et envoyés à l'équipe de séquençage du Centre Hospitalier de l'Université Laval situé à Québec.

Appendice B

Solutions pour l'extraction d'ADN

1 M Tris-Cl (pH 8)

Dissoudre 121.1 g de Tris-base dans 800 mL d'eau.

Laisser la solution être à la température de la pièce avant d'ajuster le pH.

Ajuster le pH par l'ajout de HCl.

pH	HCl
7.4	70 mL
7.6	60 mL
8.0	42 mL

Compléter le volume à 1 litre.

Stériliser à l'autoclave.

Note : Si la solution 1 M est jaunâtre, la jeter et recommencer avec le bon grade de Tris.

Le pH du tampon Tris est dépendant de la température.

HCl (2.5 N)

Ajouter 25 mL de HCl concentré (11.6 N) à 91 mL d'eau stérile.

Entreposer la solution diluée à la température ambiante.

EDTA 0.5 M (pH 8.0)

Dissoudre 186.1 g de EDTA dans 800 mL d'eau.

Mélanger vigoureusement à l'aide d'un agitateur magnétique.

Ajuster le pH à 8.0 avec du NaOH (20 g de NaOH).

L'EDTA ne sera pas dissous tant que le pH n'atteindra pas 8.0.

Stériliser à l'autoclave.

Bromure d'éthidium (10 mg/mL)

Dissoudre 1 g de EtBr2 dans 100 mL d'eau.

Mélanger à l'aide d'un agitateur magnétique pendant plusieurs heures afin de s'assurer de la dissolution complète du colorant.

Emballer la bouteille dans du papier d'aluminium ou entreposer la solution dans une bouteille opaque à la température ambiante.

Tampon TE (pH 8)

100 mM Tris-Cl (pH 8)

10 mM EDTA (pH 8)

Stériliser le tampon 20 minutes à 15 psi et entreposer à la température ambiante.

Tampon TAE

Tableau 6 Composition des solutions de tampons TAE

Solution de base (50X)	Solution de travail (1X)
242 g de Tris-base	40 mM de Tris-acétate
57.1 mL d'acide acétique glacial	1 mM de EDTA
100 mL de EDTA 0.5 M (pH 8)	

NaOH (10 N)

Préparer les solutions dans des contenants de plastique.

Ajouter 400 g de NaOH dans 800 mL d'eau.

Agiter continuellement.

Pour plus de sûreté, garder le bécher sur la glace.

Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau.

Entreposer la solution dans un contenant de plastique à la température ambiante, la stérilisation n'est pas nécessaire.

NaCl 5 M

Dissoudre 292 g de NaCl dans 800 mL d'eau.

Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau.

Entreposer en petites quantités à température ambiante après la stérilisation.

SDS (20% p/v)

Dissoudre 200 g de SDS de grade d'électrophorèse dans 900 mL d'eau pure stérile.

Chauffer à 68°C et agiter magnétiquement pour faciliter la dissolution.

Si nécessaire, ajuster le pH avec quelques gouttes de HCl.

Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau.

La stérilisation n'est pas nécessaire, ne pas autoclaver.

Entreposer à la température ambiante.

Acétate de sodium 3 M (pH 5.2 et 7.0)

Dissoudre 408.3 g d'acétate de sodium dans 800 mL d'eau.

Ajuster le pH à 5.2 avec de l'acide acétique glacial.

Ajuster le pH à 7.0 avec de l'acide acétique dilué.

Compléter le volume à 1 litre.

Stériliser à l'autoclave.

Appendice C

Solutions tampons pour la caractérisation des protéases

pH 6 (Tampon phosphate Sorensen)

- 7.60 g KH_2PO_4
- 1.46 g Na_2HPO_4

pH 7 (Tampon borax-phosphate Kolthoff)

- 7.45 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$
- 8.30 g KH_2PO_4

pH 8.2 (Tampon borate)

- 13.60 g H_3BO_3
- 2.90 g NaCl
- 19.10 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$

pH 9 (Tampon borate Clark et Lub)

- 3.10 g H_3BO_3
- 3.73 g KCl
- 0.85 g NaOH

pH 10 (Tampon carbonate-bicarbonate Delort et King)

- 2.93 g Na_2HPO_4
- 1.90 g NaHCO_3

pH 11 (Tampon Robinson et Stokes)

- 3.55 g Na_2HPO_4
- 0.16 g NaOH

pH 12 (Tampon Robinson et Stokes)

- 3.55 g Na_2HPO_4
- 1.08 g NaOH

Tous les tampons se font dans 1 L d'eau déminéralisée.

Appendice D

Chenel et al. 2008. Copie du texte publié dans *Water science and technology*, vol. 57, no. 5, p. 639-645.

Contribution des auteurs :

Chenel, J.P. : Expérimentations, rédaction.

Tyagi, R.D. : Idée, financement.

Surampalli, R.Y. : Aucune.

Production of thermostable protease enzyme in wastewater sludge using thermophilic bacterial strains isolated from sludge.

J. P. Chenel*, R. D. Tyagi* and R.Y. Surampalli**

* Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490 de la Couronne, Québec, G1K 4Y9, CA
(E-mail : jean-philippe.chenel@ete.inrs.ca; tyagi@ete.inrs.ca)

** US EPA, P.O. Box-17-2141, Kansas City, KS 66117, USA
Phone: (418) 654 2617; Fax: (418) 654 2600

Abstract The volume of sludge produced annually is very high and poses serious disposal problems. The traditional methods of sludge disposal produce secondary pollutants. Therefore, the alternate or suitable solution is reuse of sludge in an ecofriendly approach. Biotechnology is an interesting tool to add value to the processes involved in wastewater and wastewater sludge disposal/reuse. In this context, a study was carried out on thermophilic bacterial strains that produce thermostable proteases. The bacterial strains were first isolated from municipal wastewater sludge. In contrast to the conventional strains used in industries, like *Bacillus sp.*, the new strains were Gram-Negative type. In semi-synthetic medium, a maximal protease activity of 5.25 IU/ml (International Unit per ml) was obtained at a pH of 8.2 and at a temperature of 60°C, which is higher than the stability temperature of 37°C for a similar protease obtained from the conventional producer *Bacillus licheniformis*. Moreover, growth and protease activity of the strains were tested in wastewater sludge. It is expected that the complexity of sludge could stimulate/enhance the protease production and their characteristics. In conclusion, reuse of wastewater sludge will help to reduce their quantity as well as the value-added products produced will replace chemical products used in industries.

Keywords Thermophilic strains; thermostable proteases; wastewater sludge

INTRODUCTION

The disposal of wastewater sludge (WWS) generated during the treatment of the various municipal and industrial wastewater (WW) is one of the major problems in safeguarding of the planetary environment. During the last fifty years, people believed that the discharge of WW and WWS in the rivers and the lakes was not detrimental to the environment because the latter had the capacity to self purify and regenerate themselves. However, studies during the last twenty years have contradicted these facts. At the present time, the rivers and the lakes do not have the capacity to absorb all the pollutants which are poured there (Barnabé and et al., 2003). It thus became imperative to find new methods in order to decrease and/or re-

use these wastes. Several of these new methods have been developed in recent past and others are being developed.

Traditionally, the wastewater sludge is land filled, applied to agriculture land as fertiliser or incinerated and a very small part is used for value added products. Recently, technologies have been developed or are under development to produce fuel, biopesticides, biofertilisers or many types of biocatalysts (Barnabé and al., 2003). Indeed, certain micro-organisms have the capacity to produce secondary substances at the time of their growth. Tyagi and co-workers (2002) showed that the bacterial strains of *Bacillus sp.* could produce proteolytic enzymes and that certain species as *Bacillus thuringiensis* produced a secondary metabolite to serve as insecticide. It was also shown that fungi had also the capacity to produce certain enzymes (Szekeres et al., 2004). The WW and WWS are rich in nutrients such as carbon, nitrogen, potassium (Barnabé, 2003) and can support growth of various micro-organisms to produce many interesting bioproducts.

When the sludge is not land applied, it is generally land filled. On the other hand, if these wastes are converted through microbial fermentation, it is possible to eliminate or stabilize the pathogens, helps to precipitate or degrade toxic chemical compounds (Champagne, 2006) and at the same time possibly producing useful secondary substances or value added products.

In Canada, in 2001, 16 836 968 inhabitants were served by water and wastewater treatment facilities (Champagne, 2006). Considering a production of biosolids or wastewater sludge of 0.063 kg of dry sludge per person per day, there would be a dry production of 387 166 tons of dry sludge per year. One of the best ways of sludge valorization is bioconversion into proteolytic enzymes. Indeed, in industries these enzymes (the proteases) are produced by cultivating microorganisms in synthetic medium. The cost of the culture medium corresponds to approximately 60-80% of the total production cost of the enzymes (Kumar and Takagi, 1999). The sludge is a medium that is available everywhere, in sufficient quantity and allows a good bacterial growth. Thus, the enzyme production cost using wastewater sludge as a raw material could be substantially reduced (Chenel, 2004).

The bacterial strains that conventionally used in industries are of *Bacillus sp.* They are mesophilic bacteria, having optimal growth around temperature of 35°C and the produce proteases which are stable at an average temperature of 37°C. Moreover, it is also possible to use thermophilic bacteria which have optimal growth temperature of higher than 45°C. The proteases produced by these bacteria are known as thermostable and are effective at average temperatures of 60°C. The most important advantages of these proteases are that they are more resistant and hence their effectiveness is prolonged. They better resist the changes in environmental conditions in which they are used.

The industrial enzymes represent a major part of the global enzymes market and their production is rapidly increasing. The enzyme production in 1982 was of 375 M\$, reached 720 M\$ in 1990, 1 billion \$ in 1994, 1.9 billion \$ in 1996, 2.5 billion in 2001 and approximately 2.8 billion in 2002 (Tyagi, 2004). And the proteases account approximately 60% of this market (Gupta et al., 2002).

One of the major use of alkaline proteases is in detergents. In addition to detergents, the slaughter-houses, the tanneries are the sectors for use of these proteases. They could be useful in maintenance of apparatuses like in the production of a marketable product. The production of thermostable proteases using wastewater sludge as raw material would make it possible to market them at low production cost. At the same time, it would be possible to reduce the quantity of sludge for final disposal. The use of these proteases would also make it possible to reduce the use of harmful chemicals for the environment because these chemicals can be replaced by these newly produced proteases. Thus, the objective of the present work is to demonstrate the effectiveness of the production of thermostable proteases by thermophilic bacteria using municipal wastewater sludge as a culture medium.

MATERIALS AND METHODS

Collection of sludge samples

Sludge samples were obtained from three different locations: municipal wastewater treatment plants of Jonquière, Black Lake and Communauté Urbaine de Québec. Sludge samples were stored in a cold chamber at 4°C for future use (within two weeks to minimise sludge degradation).

Isolation of new bacterial strains

The bacterial strains were isolated from three wastewater sludge: Jonquière, Black Lake and Communauté Urbaine de Québec. Each sludge sample was inoculated on nutrient agar plates and incubated at 50°C for 24 hours. All bacteria were purified on nutrient agar plates.

Determination of optimal temperature for bacterial growth, enzyme production and stability

To determine the optimal temperature for bacterial growth and enzyme production, the bacterial isolates were inoculated into 100 mL of semi-synthetic medium in 500 mL Erlenmeyer flasks and incubated for a period of 24 hours at 40, 50 and 60°C in an orbital incubating shaker at 200 rpm. Composition of semi-synthetic medium (g/L) is : Soy flour, 15; dextrose, 5; corn starch, 5; KH_2PO_4 , 1; K_2HPO_4 , 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02; CaCO_3 , 1. Samples of 0.5 mL were drawn at three hours intervals to determine viable cell count and protease activity.

To determine the optimal temperature for enzyme activity, broth samples (grown at 50°C) were drawn at the end of 24 hours. This sampling time was chosen to leave enough time for bacteria to grow and begin the production of proteases. The enzyme activity was determined at 40, 50, 60 and 70°C. The enzyme activity test was performed by the modified Kunitz method (Kunitz, 1947). In assay tubes, 5 mL of casein solution (1.2% casein in borate buffer pH 8.2) was incubated in a shaker water bath for 5 minutes. One mL of the appropriately diluted enzyme sample was added to the casein solution and incubated for 10 minutes. The reaction was terminated by adding 5 mL of trichloroacetic acid (TCA) and the solution (total volume of 11 mL) was left for 30 minutes in the water bath at same temperature. A blank (control) sample was also prepared by adding TCA prior to the enzyme addition. All samples and blanks were filtered with a vacuum pump using 0.45 µm filter. The absorbance of the filtered samples was measured at 275 nm. The temperature stability of the enzyme was tested at different temperature. It was varied from 40°C to 70°C.

Total Cell Count (TC)

Each broth sample taken from each Erlenmeyer flask or bioreactors was diluted from 10^3 to 10^7 times and 100 µL of these dilutions were inoculated on nutrient agar medium. After 24 hours of incubation at 50°C the cell count was performed as colony forming units (CFU). Only those plates were counted which contained 30 to 300 CFU with a percent error of $\pm 5\%$.

Bacterial growth and enzyme production in fermentor

Fermentation experiments were conducted in a 15 L bench scale bioreactor equipped with accessories and automatic control systems for dissolved oxygen, pH, antifoam, agitation speed, aeration rate and temperature.

The fermentation was conducted at pH 7.0 (controlled automatically by using 2N NaOH or 2N H₂SO₄) and at a temperature of 50°C for 48 hours. The dissolved oxygen level was kept above 20% of saturation by varying agitation speed (300-500 rpm) and airflow rate (2.0-5.0 L/min). This ensured that the DO level was above critical level of 20% for protease production (Beg et al., 2003).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of new bacterial strains

Two new thermophilic strains which produced thermostable proteases were isolated from municipal wastewater sludge. They showed excellent growth at 55°C on nutrient agar medium. Preliminary experiments showed that these two strains were non-spore forming Gram-negative bacteria; in contrast to conventional enzyme producing strains that are spore-forming Gram-positive bacteria (Burhan et al., 2003).

Shake flasks experiments - Growth of isolated strains

Figure 1 showed the growth profiles (total cell count - TC) of the two different strains at three temperatures (45, 55 and 65°C) for 48 hours of fermentation in semi-synthetic medium. It is evident from these results that 55°C was the optimal growth temperature. Indeed, a higher cell concentration was observed at 55°C.

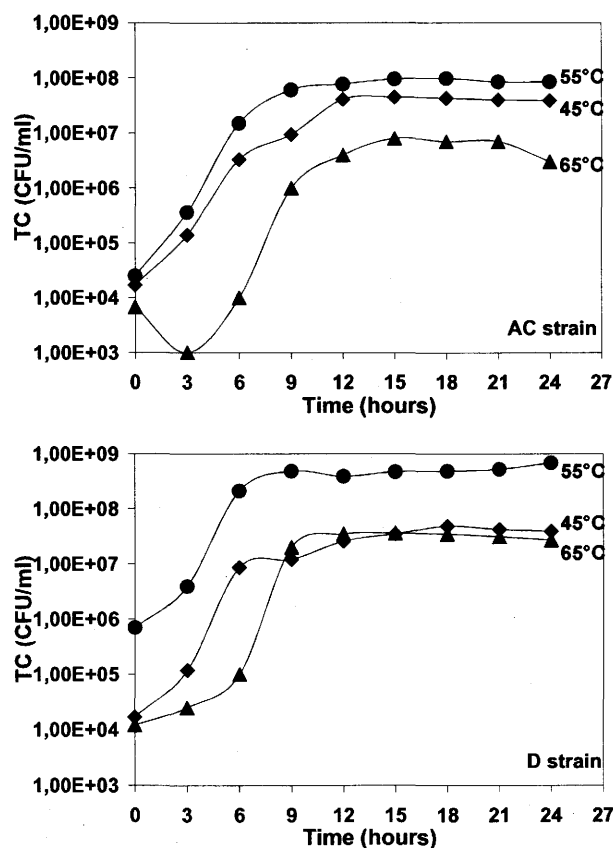


Figure 1 Growth profile for the two strains named AC and D at different temperatures (45, 55 and 65°C) in shake flask experiments employing semi-synthetic medium.

The growth profile of the strain AC at 45°C followed the same pattern as 55°C, but the total cell count (TC) was lower. Meanwhile at 65°C, there was a longer lag phase and the total cell count was lower at 10^6 at 45°C in contrast to 10^7 CFU/ml at 55°C. Normally, thermophilic bacteria can tolerate a temperature range of 45 to 70°C (Deacon, 2004), but the maximum for these isolated bacterial strains was around 55°C. High temperature can inactivate important enzymes needed in bacterial cell division, like DNA polymerase and all the enzymes used in DNA duplication (Snyder and Champness, 1997). The isolated strains were aerobic and in general required a

dissolved oxygen concentration (DO) superior to 20% of saturation. At this concentration, the growth rate was lower as there was not enough oxygen in contact with the bacteria. It is not possible to conduct shake flask experiments at controlled DO as environmental conditions are uncontrollable (van Suijdam et al., 1978). Therefore, at higher temperature (65°C), DO probably decreased below 20% due to increased demand of DO resulting from growth of the bacteria and low oxygen solubility at higher temperature (Zumdahl, 1998). Thus, lower growth of AC strain at 65°C may be due to a lack of dissolved oxygen in the medium, which should be tested in fermentor under controlled condition of DO.

Similar growth profiles were observed for D strain (Figure 1) with optimum temperature at 55°C. Growth rate and maximum total cell count were higher at this temperature than at 45 and 65°C. Also, 65°C showed the least TC of the two strains.

Shake flasks experiments - Protease activity of isolated strains

Figure 2 shows the variation of protease activity (PA) of the two isolated strains tested at different temperatures. Out of the four temperatures tested (40, 50, 60 and 70°C), 60°C was found to be the optimal for maximum enzyme activity irrespective of strain.

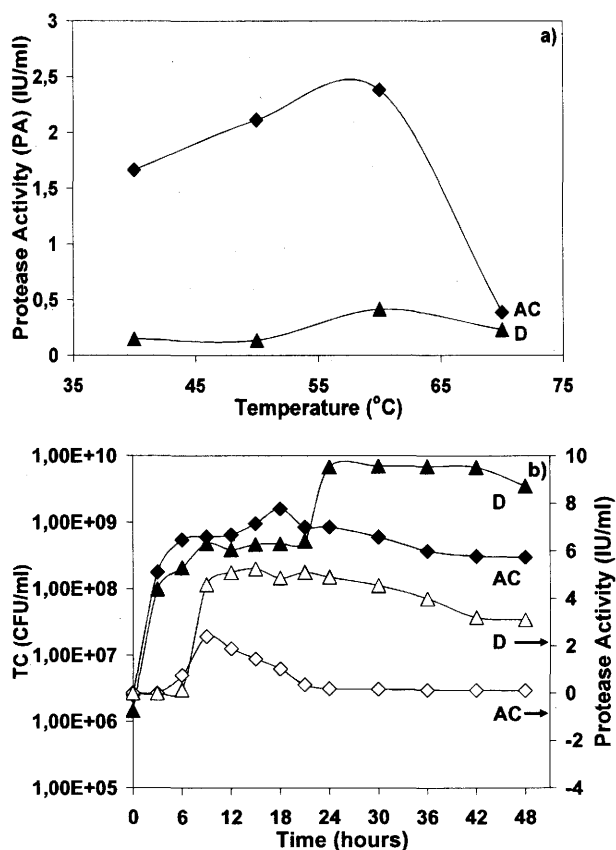


Figure 2 a) Protease activities (PA) (IU/ml) of two strains AC and D during shake flask experiments using semi-synthetic medium at different temperatures (40, 50, 60 and 70°C). **b)** Growth (55°C) and protease activity (60°C) profiles for strains AC and D in 15 L fermentor using semi-synthetic medium.

Enzymes with high thermostability are more viable and have a better efficiency (De Azeredo et al., 2004). Activity of these proteases decreased at a temperature of 50°C. At higher temperature (70°C), the protease activity was also lower. It is a well known fact that at higher temperatures, protein conformation changes or degraded (Johnvesly and Naik, 2001) and hence causing a decrease in protease activity. Thus, the optimal temperature for growth and enzyme activity for all the strains was same and could be due to similar characteristics of proteases produced by the two different strains.

Bench scale study - Semi-synthetic medium

Figure 2 b) shows profiles of TC and PA of different isolated strains obtained in bench scale fermentor study using semi-synthetic medium. The total cell count increased up to 10^9 CFU/ml for AC strain and almost 10^{10} CFU/ml for D strain.

There was a significant difference between shake flask (Figure 1) and bench scale fermentor experiments (Figure 2 b). D strain showed lower protease activity in shake flask experiments (0.3 IU/ml), however, the activity appreciably increased in fermentor (5.3 IU/ml). AC strain showed a maximum protease activity of 2.4 IU/ml in fermentor which was lower than PA activity (3.2 IU/ml) in shake flask experiments. At present we have no explanation as why the PA was lower in fermentor than in shake flask and more research is required (specifically on enzyme nature produced in fermentor and shake flask) to provide a suitable explanation. Hence, bench scale fermentor experiments were necessary to establish exact protease activity of the strains. Further, scale-up studies have shown better results (increased protease activity) due to controlled environmental conditions (Hempel and Dziallas, 1999).

Bench scale study - Sludge medium

The fermentor experiments were conducted using CUQ (Communauté Urbaine de Québec) wastewater sludge (25 g/L of total solids) as a sole raw material for growth of two isolated strains under identical conditions as those used for semi-synthetic medium. All the operation parameters were the same. Growth was conducted at 55°C and the enzyme activity was measured at 60°C. Growth and protease activity profiles of the two strains are presented in Figure 3.

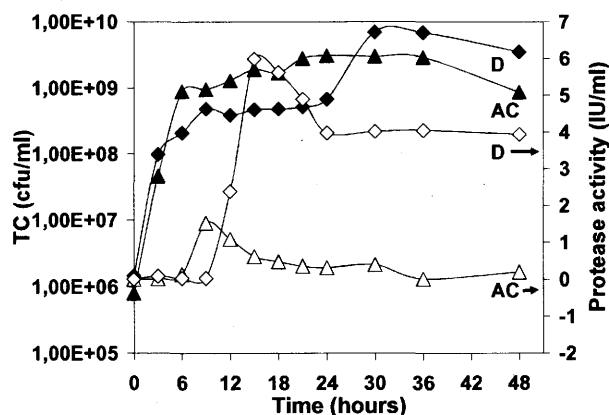


Figure 3 Growth and protease activity profiles for isolated strains AC and D in 15 L fermentor using municipal wastewater secondary sludge (25 g/L) at an optimal growth temperature of 55°C and 60°C for the protease activity.

In comparison to semi-synthetic medium (Figure 2 b) a higher cell concentration for AC strain (Figure 3) but less cells concentration for D strain was observed in wastewater sludge. For AC strain, in semi-synthetic medium, a maximum cell concentration of 1.60×10^9 CFU/ml whereas a cell concentration of 7.00×10^9 CFU/ml in wastewater sludge was observed. For the D strain, a maximum cell concentration of 7.00×10^9 CFU/ml in semi-synthetic medium and 3.10×10^9 CFU/ml in wastewater sludge was noticed.

The degradable organic compounds present in semi-synthetic medium and wastewater sludge are in different forms. The sludge contains, the so called, easily biodegradable, biodegradable and difficult to biodegrade organic matter (Tirado et al., 2001). Two bacterial strains may have different capacity to degrade these organic materials and hence may assimilate nutrient compounds differently. However, results show that in wastewater sludge, the available nutrients are easy to assimilate by AC strain because of better growth in this medium. On the contrary, for D strain, the nutrients are easier to assimilate in semi-synthetic medium in comparison to wastewater sludge.

Figure 3 shows that even if the D strain has less cell count in wastewater sludge, the protease activity produced is slightly higher. A greater secretion of enzymes in complex media (municipal wastewater sludge) could be due to poor accessibility of various nutrients, which would otherwise be easily assimilated. Further, these enzymes could break big complex molecules to simpler ones and release them in the medium (from sludge solid phase to liquid phase) enhancing accessibility. Hence, a more complex medium stimulates the bacteria to produce high enzyme activity. On the other hand, AC strain shows less protease activity in wastewater sludge. This could be due to the nature of bacterial strain itself. This bacterium may not have the metabolic capacity to produce the enzyme suitable for this type of medium. Possibly, the bacterium used all the easily biodegradable compounds in the medium for its growth but possess a less efficient enzyme production mechanism. This is why the protease activity is lower in wastewater sludge, where the nutrients are very complex, than in the semi-synthetic medium.

Banik and Prakash (2004) showed that conventional laundry detergents like Tide (Procter and Gamble) have a protease activity of 57.5 IU/g of granulated proteases. Generally, these granules are mix during formulation with powder detergents in a ratio of 2.3 miligrams of granules per grams of whole detergents. So, in each kilograms of detergent, there is 132.25 IU of proteases.

As announced in the Population Census of 2001 (Statistic Canada, 2006), the population of Canada reached 32 730 213 inhabitants and counted 8 170 805 families. Each family uses 0.5 kg of powder detergent, two times per week and 52 weeks per year. So, the Canadian population uses 4.25×10^8 kg of detergent powder during one year and knowing that in each kilogram of powder there is 132.25 IU of proteases (Banik and Prakash, 2004), there is a need of 5.62×10^{10} IU of proteases per year. In this study, 6 IU are produced in each mL of fermented sludge (with 25 g/L of suspended solids). Thus to produce 5.62×10^{10} IU per year an approximate amount of sludge required will be 9.37×10^6 litres or 234.25 tons of dry sludge.

CONCLUSION

The production of proteases or any other value-added products is possible by using wastewater sludge. Wastewater and wastewater sludge are produced everywhere on Earth and can be converted into many types of products, it depends on the location and needs of the population. The quantity of biosolids produced by treatment plants can now be reduced by reuse of them. Eventually, all biosolids can be recycled into new eco-friendly products like biopesticides, bioplastics, biocatalysers or in any kind of biogas. Therefore, pollutant chemical products should be replaced by these new bioproducts and in this way reduce the pollutants released into the environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grants A4984, STP235071, Canada Research Chair) for financial support. The views or opinions expressed in this article are those of the authors and should not be construed as opinions of the U.S. Environmental Protection Agency.

REFERENCES

- Banik R. M. and Prakash M. (2004). Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*. **159**, 135-140.
- Barnabé S., Sasseville J.-L., Tyagi R.D. and Valéro J.R. (2003). Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières? *Vecteur Environnement*. **36(2)**, 50-62.
- Beg Q. K., Sahai V. and Gupta R. (2003). Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Process Biochemistry*. **39**, 203-209.
- Burhan A., Nisa U., Gökhan C., Ömer C., Ashabil A. and Osman G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6. *Process Biochemistry*. **38**, 1397-1403.
- Champagne P. (2006). Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: A Canadian perspective. *Resources, Conservation and Recycling*. doi:10.1016/j.resconrec.2006.09.003.

Chenel J.P. (2004). *Isolation and identification of hyper-proteases producers from municipal and industrial sludge*. Mémoire M. Sc. INRS-ETE, Univ. du Québec.

Deacon, J. *The Microbial World: Thermophilic microorganisms*. (2004). Institute of Cell and Molecular Biology. The University of Edinburgh.
<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/thermo.htm> (accessed 13 March 2007)

De Azeredo L. A. I., Freire D. M. G., Soares R. M. A., Leite S. G. F. and Coelho R. R. R. (2004). Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces sp.* isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*. **34**, 354-358.

Gupta R., Beg Q. K. and Lorenz P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. **59**, 15-32.

Hempel D. and Dziallas, H. (1999). Scale-up, stirred-tank reactors. In: Flickinger, M., Drew, S. (Eds.), *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation, vol. 4. Wiley Biotechnology Encyclopedias. pp. 2314_ 2332.

Johnvesly B. and Naik G. R. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*. **37**, 139-144.

Kumar and Takagi. (1999). Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Advances*. **17**, 561-594.

Kunitz M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol*. **30**, 291-310.

Snyder L. and Champness W. (1997). Molecular genetics of bacteria. *American Society for Microbiology*. Massachusetts. 504 pp.

Statistic Canada. (2007). <http://www.statcan.ca/menu-en.htm> (accessed 13 March 2007).

Szekeres A., Kredics L., Antal Z., Kevei F. and Manczinger L. (2004). Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*. **233**, 215-222.

Tirado-Montiel M.L., Tyagi R.D. and Valero J.R. (2001). Wastewater treatment sludge as raw material for *Bacillus thuringiensis* production. *Water Res*. **31**(16), 3807-3816.

Tyagi, R.D. (2004). Production de protéases alcalines thermostables en utilisant des boues d'épuration comme substrat de fermentation et des souches de bacilles à haute activité protéolytique. *Demande de subvention stratégique- CRSNG-NSERC*.

Tyagi R.D., Sikati Foko V., Barnabé S., Vidyarthi A., and Valéro J.R. (2002). Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using wastewater as a raw material. *Water Science and Technology*. **46**, 247-254.

van Suijdam J.C., Kossen, N.W.F., Joha, A.C. (1978). Model for oxygen transfer in a shake flask. *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 1695-1709.

Zumdahl S. S. (1998). Chimie des solutions, 2^{ème} édition. *Les Éditions CEC inc.* Anjou. 442 pp.