

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

**PRODUCTION AMÉLIORÉE, RÉCUPÉRATION ET APPLICATION D'UNE
PROTÉASE ALCALINE PRODUITE EN UTILISANT LES BOUES
D'ÉPURATION COMME SUBSTRAT**

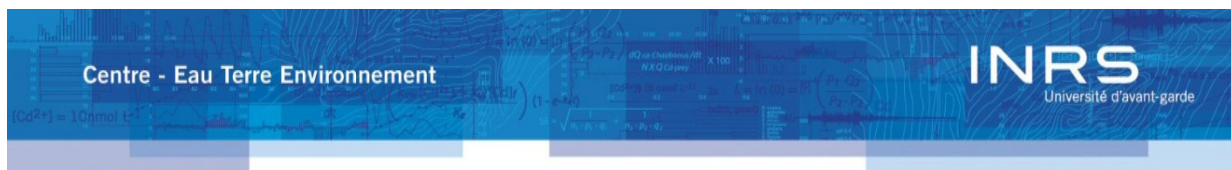
Par
Jyothi Bezawada

Thèse présentée
Pour l'obtention du grade de Doctorat ès sciences (Ph.D) en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Examineurs externes	Prof. T. James Agbebavi (UQTR) Prof. J. Peter Jones (Université de Sherbrooke)
Examineur interne	Prof. Patrick Drogui (INRS-ETE)
Directeur de recherche	Prof. Rajeshwar D. Tyagi (INRS-ETE)

©Droits réservés de *Jyothi Bezawada*, 2010



ACKNOWLEDGEMENTS

It is indeed my proud privilege to express my deep sense of gratitude and indebtedness to my revered teacher and research director, **Prof. R.D. Tyagi**, for his immense help, co-operation, scholarly inspiration and valuable guidance that he has extended to me for the successful completion of this thesis.

I also take the opportunity to thank my **examiners (Prof. T.J. Agbebavi, Prof. J.P. Jones and Prof. P. Drogui)** for acceptance in judging and evaluating my thesis, and their valuable comments to improve the quality of the dissertation.

My heartfelt thanks to **Dr. P. Ellaiah** and **Dr. K. Adinarayana** who actually the inspirers and provided me a chance to pursue my PhD at INRS-ETE, Université du Quebec.

I express my sincere thanks to **Dr. S. Yan, Dr. S.K. Brar, Dr. P.J. Rojan and Dr. P. Bhunia** for their immense helps and valuable suggestions in my research. I also thank **Mr. Mathieu Drouin, Mr. Jean Philippe Chenel** and **other colleagues** for their co-operation, and for the help they gave me in the lab and other things. I would like to equally thank **Rimeh, Francois, Amine, Mathieu and Fatma** for translating my report into French.

I also thank **Mrs. Suzanne Dussault** for her help and instructions in all administrative works and **Johanne Desrosiers** for her help in many things related to research. **Mr. Stéphane Prémont, Mrs. Michelle G. Bordeleau. Mr. René Rodrigue. Mr. Sébastien Duval, Ms. Anissa Bensadoune** for their help in lab techniques.

My special and warm thanks to **Mrs. Nirmala Tyagi** who has always given me moral support and love throughout this journey.

Heartful thanks to my husband (**Ravi kiran Chintapalli**) for his moral support and encouragement. He has been waiting patiently for me since we are married and encouraged me to finish my studies successfully. I would like to thank his parents (**Chintapalli Nageswara Rao and Rajeswari**) and his sister's family for their love and affection towards me.

I am greatly beholden and owe a deep sense of honor to my beloved my parents (**Bezawada Venkateswarlu and Akkalakshmma**), and express my feelings of gratitude to my sisters (**Latha and Nagendram**), brother-in-laws (**Siva and Adinarayana**), my aunt and uncle (**Ramanaidu and Anuradha**) for their love and encouragement, which they have bestowed upon me and for their unfailing support throughout the course of the investigation.

Finally, I wish to express my sincere thanks for all those who helped me directly or indirectly in completing this work.

Jyothi Bezawada

AVANT-PROPOS

PUBLICATIONS/ MANUSCRIPTS DANS CETTE THÈSE

1. **Bezawada J.**, Yan S., Tyagi R.D., surampalli R. Y. (2009) Isolation and Characterization of Protease Producing Bacteria from Quebec Soil and Water samples. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*. 13 (2): 126-134.
2. **Bezawada J.**, Yan S., Tyagi R.D., Surampalli R. Y. (2010a) Comparison of protease activities in different *Bacillus licheniformis* strains using wastewater sludge and synthetic soy medium as raw material. *Environmental Technology* 31 (1): 63-72.
3. **Bezawada J.**, Yan S., Rojan P.J., Tyagi R.D. Surampalli R.Y. (2010b) Augmentation of protease production by supplementing carbon and nitrogen sources to wastewater sludge medium. *Journal of residuals science and technology* 7 (3): 161-172.
4. **Bezawada J.**, Yan S., Rojan P.J., Tyagi R.D. Surampalli R.Y. (2010c) Recovery of *Bacillus licheniformis* alkaline protease from supernatant of fermented wastewater sludge using ultrafiltration and its characterization. Submitted to *Process Biochemistry*.

CONGRÈS ET CONFÉRENCES

[1] **Bezawada J.** proceedings of IWA specialist conference moving forward wastewater biosolids sustainability: technical, managerial, and public synergy. June 24-27, Moncton, New Brunswick, Canada. 2007.

[2] **Bezawada J.**, Mathieu, D, Tyagi, R.D. Isolation of alkaline protease producing bacterial strains from lakes and rivers. 22nd Eastern Canadian Symposium on water quality research, Montreal, Canada, Nov 3rd. 2006.

CONFIDENTIAL REPORTS

[1] **Bezawada J.** (2010) Production of *Lactobacillus fermentum* (*L.fermentum*), a probiotic bacterium using cheese whey powder as raw material. *Submitted report to Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environment, Quebec, Canada.*

[2] **Bezawada J.** (2010) Capability of new *Kluyeromyces fragilis* strains for ethanol production in cheese whey medium. *Submitted report to Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environment, Quebec, Canada.*

RÉSUMÉ

La demande pour les protéases alcalines a augmenté de par leur utilisation dans les domaines des détergents, de l'industrie alimentaire et pharmaceutique. Les espèces de *Bacillus* sp. sont considérées comme de prolifiques producteurs de protéases alcalines, largement employées dans l'industrie des détergents. L'emploi d'enzyme dans les détergents devrait s'accroître, puisque les enzymes permettent d'augmenter le pouvoir détachant des détergents sur une large gamme de température.

Au Canada, de sérieux problèmes se posent quand à la disposition des grands volumes de boues d'épuration produits annuellement. Les méthodes conventionnelles de disposition des boues (incinération, épandage et enfouissement) entraînent la prolifération de pathogènes et la production de polluants secondaires tels que les métaux lourds et les composés organiques toxiques. Ainsi, une solution alternative et souhaitable consiste à réutiliser les boues. Les biotechnologies peuvent constituer un outil intéressant pour donner une valeur ajoutée aux procédés impliqués dans le traitement et la réutilisation des eaux usées et des boues d'épuration. Il est permis de penser que la complexité des boues d'épuration pourra stimuler et augmenter la production de protéases aux propriétés intéressantes. La réutilisation des boues à des fins de production de protéases pourra contribuer à en diminuer la quantité à gérer, et les protéases produites pourront remplacer les produits chimiques employés dans de nombreuses industries.

Les protéases sont parmi les enzymes les plus employées en industrie, leur vente comptant pour 60% de toutes les ventes d'enzymes au niveau mondial. De celles-ci, les protéases alcalines sont employées principalement comme additifs dans les formulations de détergents. Les protéases d'origine bactérienne sont les plus employées, en comparaison avec les protéases fongiques d'origine végétale. Idéalement, les protéases utilisées dans les formulations de détergents devraient être hautement actives sur une large gamme de pH et de température. Il y a donc un grand intérêt au niveau industriel pour les protéases. La production de protéase par des souches de *Bacillus* d'intérêt a donc été étudiée de façon intensive, sur différents substrats de production, comme par exemple sur des milieux synthétiques contenant des farines de soya, des liqueurs de maïs et des caséines. Le substrat de production peut représenter 40% des coûts totaux de production des enzymes. Ainsi, la production de protéases à partir de boues d'épuration municipales pourrait permettre de diminuer de façon importante les coûts de production.

Cependant, l'emploi de boues d'épuration pour la production de protéases n'a pas été étudié de façon approfondie. Donc, l'objectif principal de ces travaux est d'étudier la production, la récupération et l'utilisation de protéases alcalines produites par *B. licheniformis* en utilisant les boues d'épuration comme substrat de production.

74 souches bactériennes ont été isolées de 10 échantillons de sols riches en protéines, comme les sols entourant les abattoirs, les sols riches en matières organiques en décomposition et des échantillons d'eaux boueuses. Tous les échantillons ont été recueillis dans les environs de la ville de Québec. Sur la base de la morphologie, de la grosseur des colonies et des caractéristiques microscopiques, les isolats ont été caractérisés en 33 types. Parmi ceux-ci, 5 isolats ont démontré une bonne activité protéolytique (>5), 8 isolats une activité protéolytique modérée (entre 3 et 5), 12 isolats une faible activité (entre 2 et 3) et 8 isolats une très faible activité (inférieure à 2). Les cinq souches les plus prometteuses selon le précédent classement ont été identifiées comme étant des souches de *Bacillus*, selon leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques. La production de protéases extracellulaires par différentes souches de *B. licheniformis* (ATCC 21415, ATCC 21417 et ATCC 21424) et par les 5 souches précédemment isolées a été évaluée en employant les boues d'épuration et un milieu synthétique comme milieu de culture. Ces essais ont été réalisés afin de comparer les capacités de production de protéases des différentes souches testées, et afin de comparer la capacité des milieux de culture à soutenir la production des enzymes. Toutes les souches sélectionnées ont démontré des niveaux d'activités presque similaires dans les deux types de milieu de culture. Les résultats de la sélection des souches ont démontré que la souche *B. licheniformis* ATCC 21424 a un potentiel élevé pour la production de protéases dans le milieu constitué de boues d'épuration. Ainsi, *B. licheniformis* ATCC 21424 a été choisi pour les études subséquentes. Ces observations ont de plus confirmé que les boues d'épuration peuvent être utilisées comme milieu de culture (source de nutriments) pour produire des protéases à des fins industrielles.

Des boues d'épuration ont été utilisées comme milieu de culture en y ajoutant du carbone et de l'azote sous différentes formes afin d'évaluer leur potentiel de production de protéases par *B. licheniformis* ATCC 21424. De toutes les sources de carbone et d'azote testés, l'ajout de lactose (1,5% p/v) comme supplément de carbone et de farine de soya (1,5% p/v) comme supplément d'azote ont permis d'obtenir la production de protéases la plus élevée, en erlenmeyer tout comme en fermenteur. Finalement, la récupération des enzymes a été effectuée par

technique d'ultrafiltration et le produit récupéré a été évalué selon sa capacité à détacher des tissus souillés de sang. L'optimisation des paramètres d'ultrafiltration (pression transmembranaire (TMP) et du flux d'alimentation) a été effectuée avec une membrane de 10 kDa. Une TMP de 90 kPa et un flux d'alimentation de 714 L/h/m² sont les paramètres ayant permis d'obtenir le plus haut pourcentage de récupération (83%) des enzymes du surnageant des bouillons fermentés. Les protéases produites par *B. licheniformis* ATCC 21424 sont stables sur une large gamme de pH et de température, plus actives en présence d'ions Ca²⁺ et de Mn²⁺ et démontrent une excellente compatibilité avec les différentes préparations commerciales de détergent testées. Les protéases ont donc été utilisées comme additifs aux détergents, afin d'évaluer leur capacité à augmenter leur pouvoir détachant. L'ajout d'enzymes dans le détergent (Sunlight[®]) permet d'augmenter significativement le pouvoir du détergent à détacher les tâches de sang.

ABSTRACT

The demand for alkaline proteases has been grown because of their wide spread use in detergent, leather, food, photography and in the pharmaceutical industries. *Bacillus* species are reported to be prolific producers of alkaline proteases which constitute a major source of enzymes used in detergents. The use of enzyme in detergents is expected to increase since the addition of enzymes compensative for to low efficiency of detergent washing at wide range of temperature.

Canada poses serious disposal problems of large volume sludge produced annually. The traditional methods of sludge disposal such as incineration, land application and land filling produce secondary pollutants like pathogens, heavy metals, toxic and organic compounds. Therefore, the alternate or suitable solution is reuse of sludge in an eco-friendly approach. Biotechnology is an interesting tool to add value to the processes involved in wastewater and wastewater sludge disposal/reuse. It is expected that the complexity of sludge could stimulate/enhance the protease production and their characteristics. The 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.

Proteases are one of the most important industrial enzymes accounting for nearly 60% of the total worldwide enzyme sales. Of these, alkaline proteases are employed primarily as cleansing additives. Among the various proteases, bacterial proteases are the most significant, compared to animal and fungal proteases. Ideally, proteases used in a detergent formulation should have a high level of activity over a broad range of pH and temperatures. Still there is always need for proteases with desirable properties as they have got demand in the industrial application. Alkaline proteases from high yielding *Bacillus* strains have been studied extensively using different substrates such as synthetic medium containing casein, complex medium containing soy flour, corn steep liquor and sodium caseinate. The raw material cost for fermentation products is about 40% of the overall production cost. Hence, production of protease from domestic wastewater sludge could drastically reduce the cost of enzyme production. However, protease production using wastewater sludge as raw material has not been explored fully. Therefore, the principal objective of this research is Enhanced production, recovery, and application of alkaline protease produced by *B. licheniformis* strains using wastewater sludge as raw material.

Seventy four bacteria were isolated from ten protein rich soil, such as soil near slaughter house, soil rich in decaying organic matter and muddy water samples collected from Quebec City. On the basis of colony size, morphology and microscopic characteristics, the isolates were categorized into 33 types. Among these, 5 isolates showed good proteolytic activity (>5), 8 isolates showed moderate activity (between >3 and <5), 12 isolates showed poor activity (between >2 and <3) and 8 isolates exhibited very poor activity (below 2). The five promising isolates were identified as *Bacillus* strains using morphological and biochemical characteristics. The production of extracellular protease by different *Bacillus licheniformis* strains (ATCC 21415, ATCC 21417 and ATCC 21424) and promising 5 isolates from screening programme was tested in wastewater sludge as a raw material as well as in synthetic medium. This was done to compare the capacity of protease production by different strains and to compare the capacity of the medium to provide nutrients for enzyme synthesis. All the selected strains showed almost similar activities in both media. Result from microbial selection indicated that *B. licheniformis* ATCC 21424 has high potential for protease production in terms of quantity in sludge medium. Hence *B. licheniformis* ATCC21424 has chosen for further study. The observation from this study confirmed that wastewater sludge could be used as a raw material (nutrient source) for these microbes to produce protease for industrial purpose.

Wastewater sludge supplemented with different carbon and nitrogen sources were tested for enhanced production of protease from *B. licheniformis* ATCC 21424. Lactose 1.5% (w/v) as carbon source and 1.5% (w/v) soybean meal as nitrogen source has given highest protease production in both shake flask and fermentor among all carbon and nitrogen sources tested. Finally, recovery of enzyme was carried out by using ultrafiltration techniques and application study was carried out for blood stain removal. Optimization of ultrafiltration parameters (transmembrane pressure [TMP] and feed flux) were carried out with 10 kDa membrane. TMP of 90 kPa and feed flux of 714 L/h/m² gave highest recovery (83%) of the enzyme from the centrifuged supernatant. As the protease produced by *B. licheniformis* ATCC 21424, was stable over a wide range of pH and temperature, enhanced by metal ions Ca²⁺ and Mn²⁺ and also showed excellent compatibility with various commercial detergents tested, it was used as an additive in detergent, to check the contribution of the enzyme in improving the washing performance of the detergent. The supplementation of the enzyme preparation in detergent

(Sunlight) could significantly improve the cleansing performance of the detergent towards the blood stains.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 SYNTHÈSE	1
1.1 INTRODUCTION	3
1.2 REVUE DE LITTÉRATURE	7
1.2.1 Protéases	7
1.2.1.1 Protéases Sérines	8
1.2.1.2 Protéases Cystéines	9
1.2.1.3 Aspartiques Protéases	9
1.2.1.4 Métallo protéases	10
1.2.2 Microorganismes possédant une activité protéase	10
1.2.2.1 Isolement et criblage	12
1.2.2.2 Enrichissement et sélection	13
1.2.3 Applications des protéases alcalines	17
1.2.3.1 Industrie du détergent	17
1.2.3.2 L'industrie du cuir	18
1.2.3.3 Récupération de l'argent	19
1.2.3.4 Usages médicaux	19
1.2.3.5 Industrie alimentaire	19
1.2.3.6 Traitement des déchets	20
1.2.3.7 Industrie chimique	21
1.2.4 Production des protéases alcalines	23
1.2.4.1 Développement du milieu de culture	23
1.2.4.2 Augmentation du rendement de production	24
1.2.4.3 Optimisation du milieu de culture	24
1.2.4.3.1 Source de carbone	25
1.2.4.3.2 Source d'azote	26
1.2.4.3.3 Demande en ion métallique	27
1.2.4.3.4 pH et température	27
1.2.4.3.5 L'aération et l'agitation	28
1.2.5 Production de protéase à partir de boues d'eaux usées	29
1.2.5.1 Les boues d'eaux usées domestiques	29
1.2.5.2 Composition typique des boues d'épuration	34
1.2.5.3 Caractéristiques des boues	36
1.2.6 L'isolement et la purification des protéases alcalines	37
1.2.6.1 Récupération	37
1.2.6.2 Concentration	38
1.2.6.3 Précipitation	38
1.2.6.4 Chromatographie échangeuse d'ions	39
1.2.6.5 Chromatographie d'affinité	39
1.2.6.6 Système aqueux à deux phases	40
1.2.6.7 Stabilisation	40
1.2.7 Propriétés des protéases alcalines	41
1.2.7.1 Température et pH optimal	41
1.2.7.2 Masse moléculaire	41

1.2.7.3	<i>Exigence des ions métalliques et des inhibiteurs</i>	42
1.2.7.4	<i>La spécificité du substrat</i>	42
1.3	HYPOTHÈSES, OBJECTIFS ET ORIGINALITÉ	43
1.3.1	Hypothèses	43
1.3.2	Objectifs	46
1.3.3	Originalité de la recherche	47
1.4	RÉSULTATS ET CONCLUSION	47
1.4.1	L'isolation, le dépistage et la comparaison des nouveaux isolants et souches de références	48
1.4.1.1	<i>Isolation et caractérisation des bactéries productrices de la protéase provenant des eaux et du sol du Québec</i>	48
1.4.1.2	<i>Comparaison des activités de protéase chez les souches de Bacillus licheniformis différentes en utilisant des boues d'épuration et soja synthétique milieu comme matières premières.</i>	48
1.4.2	Influence des sources de carbone et d'azote sur l'amélioration de la production de la protéase alcaline	49
1.4.2.1	<i>Augmentation de la production de la protéase par addition de sources de carbone et d'azote à un milieu des boues d'épuration</i>	49
1.4.3	Récupération et application de la protéase alcaline	50
1.4.3.1	<i>Récupération de protéase alcaline Bacillus licheniformis du surnageant de fermentation des boues d'épuration et sa caractérisation en utilisant l'ultrafiltration</i>	50
1.5	REFERENCES	51

CHAPITRE 2 L'ISOLATION, LE DÉPISTAGE ET LA COMPARAISON DES NOUVEAUX ISOLANTS ET SOUCHES DE RÉFÉRENCES **69**

Partie I Isolation et caractérisation des bactéries productrices de la protéase provenant des eaux et du sol du Québec **71**

Résumé	73
Abstract	74
1 Introduction	75
2 Material and Methods	76
2.1 Sampling	76
2.2 Isolation of Bacteria from Samples	76
2.3 Fermentations	77
2.3.1 Inoculum and Cultural Conditions	77
2.3.2 Shake flask and Fermentor Experiments	77
2.4 Characterization of Proteases from Different Strains	78
2.4.1 Optimum pH and pH Stability	78
2.4.2 Optimum Temperature and Thermostability	78
2.4.3 Effect of Metal ions	79

2.5	<i>Analytical Methods</i>	79
2.5.1	<i>Protease assay</i>	79
3	<i>Results and Discussion</i>	80
3.1	<i>Isolation of Bacteria from Samples</i>	80
3.2	<i>Fermentations</i>	81
3.2.1	<i>Shake Flask</i>	81
3.2.2	<i>Fermentor</i>	81
3.3	<i>Characterization of Proteases from Different Bacillus Strains</i>	83
3.3.1	<i>Optimum pH and pH Stability</i>	83
3.3.2	<i>Optimum Temperature and Thermostability</i>	84
3.3.3	<i>Effect of Metal ions on Enzyme Activity</i>	86
4	<i>Conclusion</i>	87
	<i>Acknowledgements</i>	87
	<i>References</i>	88

Partie II Comparaison des activités de protéase chez les souches de *Bacillus licheniformis* différentes en utilisant des boues d'épuration et soja synthétique milieu comme matières premières **99**

	<i>Résumé</i>	101
	<i>Abstract</i>	102
1	<i>Introduction</i>	103
2	<i>Materials and Methods</i>	104
2.1	<i>Chemicals</i>	104
2.2	<i>Microorganisms</i>	104
2.3	<i>Sludge samples and medium composition</i>	105
2.4	<i>Inoculum and cultural conditions</i>	105
2.5	<i>Shake flask and Fermentor operations</i>	105
2.6	<i>Analytical methods</i>	106
2.6.1	<i>Protease assay</i>	107
3	<i>Results and Discussion</i>	107
3.1	<i>Protease production in different media by different B. licheniformis strains and microbial selection</i>	108
3.1.1	<i>Growth and Protease activity production of three strains in synthetic soy medium and sludge medium in shake flask</i>	108
3.1.2	<i>Growth and protease activity comparison of three strains in synthetic soy medium vs sludge medium in fermentor</i>	109
3.2	<i>Shake flask vs. fermentor</i>	111
3.3	<i>Correlation of protease activity with viable spore count</i>	112
4	<i>Conclusions</i>	114
	<i>Acknowledgements</i>	114
	<i>References</i>	115

CHAPITRE 3 INFLUENCE DES SOURCES DE CARBONE ET D'AZOTE SUR L'AMÉLIORATION DE LA PRODUCTION DE LA PROTÉASE ALCALINE 125

Augmentation de la production de la protéase par addition de sources de carbone et d'azote à un milieu des boues d'épuration 127

Résumé	129
Abstract	130
1 Introduction	131
2 Materials and Methods	133
2.1 Chemicals	133
2.2 Microorganisms	133
2.3 Sludge samples and medium composition	133
2.4 Inoculum and cultural conditions	134
2.5 Shake flask experiments	134
2.5.1 Carbon sources	134
2.5.2 Nitrogen sources	135
2.6 Fermentor experiments	135
2.7 Analytical	136
2.7.1 Protease assay	136
2.7.2 Protein estimation	137
3 RESULTS AND DISCUSSION	137
3.1 Effect of carbon source on enzyme production	137
3.2 Effect of nitrogen source on enzyme production	139
3.3 Validation of optimal concentration of carbon and nitrogen sources for enzyme production in the shake flask and fermentor	142
4 Conclusions	144
Acknowledgements	145
References	145

CHAPITRE 4 RÉCUPÉRATION ET APPLICATION DE LA PROTÉASE ALCALINE 157

Récupération de protéase alcaline *Bacillus licheniformis* du surnageant de fermentation des boues d'épuration et sa caractérisation en utilisant l'ultrafiltration 159

Résumé	161
Abstract	162
1 Introduction	163
2 Materials and Methods	165
2.1 Bacterial strain	165
2.2 Sludge samples and composition	165
2.3 Inoculum and cultural conditions	165
2.4 Fermentation	166

2.5	<i>Techniques for recovery of alkaline protease from the fermented broths</i>	166
2.5.1	<i>Centrifugation</i>	166
2.5.2	<i>Ultrafiltration</i>	166
2.5.2.1	<i>Operating principle and washing of the filter</i>	166
2.5.2.2	<i>Membrane size</i>	168
2.5.2.3	<i>Optimization of parameters of ultrafiltration</i>	168
2.6	<i>Analysis of parameters</i>	168
2.6.1	<i>Physical parameters</i>	168
2.6.2	<i>Alkaline protease activity</i>	169
2.7	<i>Characterization of partially purified enzyme</i>	169
2.7.1	<i>Effect of pH on enzyme activity and stability of protease</i>	169
2.7.2	<i>Effect of temperature on activity and stability of protease</i>	170
2.7.3	<i>Effect of enzyme inhibitor and chelator on protease activity</i>	170
2.7.4	<i>Effect of various metal ions on enzyme activity</i>	171
2.7.5	<i>Hydrolysis of protein substrates</i>	171
2.7.6	<i>Effect of detergents on stability of protease activity</i>	171
2.8	<i>Application of alkaline protease in removing blood stains</i>	172
3	<i>Results and Discussion</i>	172
3.1	<i>Optimization of parameters of UF</i>	172
3.1.1	<i>Transmembrane pressure (TMP)</i>	172
3.1.2	<i>Feed flux</i>	174
3.2	<i>Characterization of partially purified enzyme</i>	175
3.2.1	<i>Effect of pH on enzyme activity and stability of protease</i>	175
3.2.2	<i>Effect of temperature on activity and stability of protease</i>	176
3.2.3	<i>Effect of enzyme inhibitor and chelator on protease activity</i>	177
3.2.4	<i>Effect of various metal ions on enzyme activity</i>	178
3.2.5	<i>Hydrolysis of protein substrates</i>	178
3.2.6	<i>Effect of detergents on stability of protease activity</i>	179
3.3	<i>Washing test with <i>B. licheniformis</i> protease in removing blood strains</i>	180
4	<i>Conclusions</i>	180
	<i>Acknowledgements</i>	181
	<i>References</i>	181

CHAPITRE 5	CONCLUSION ET RECOMMANDATION	195
5.1	Conclusion	197
5.2	Recommandations	198

ANNEXES	201
----------------	------------

Annexe 1

Isolation and characterization of protease producing bacteria from Quebec soil and water samples (chapitre 2, partie 1)	203
---	-----

Annexe 2

Comparison of protease activities in different <i>Bacillus licheniformis</i> strains using wastewater sludge and synthetic soy medium as raw material (chapitre 2, partie 2)	213
--	-----

Annexe 3

Augmentation of protease production by supplementing carbon and nitrogen sources to wastewater sludge medium (chapitre 3) 223

Annexe 4

Recovery of *Bacillus licheniformis* alkaline protease from supernatant of fermented wastewater sludge using ultrafiltration and its characterization (chapitre 4) 233

Annexe 5

Alkaline protease production using cheese whey as raw material with *B. licheniformis* (preliminary results) 239

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 SYNTHÈSE

Tableau 1. Classification des enzymes industrielles d'importance et microorganismes producteurs associés.	4
Tableau 2. Certaines espèces productrices protéase alcaline de <i>Bacillus</i> .	14
Tableau 3. Protéase alcaline produisant des espèces de champignons	15
Tableau 4. Micro-organismes produisant des protéases alcalines thermostables	16
Tableau 5. Les producteurs commerciaux de protéases alcalines	16
Tableau 6. Les applications actuelles d'enzymes et de leurs sources	22

CHAPITRE 2 L'ISOLATION, LE DÉPISTAGE ET LA COMPARAISON DES NOUVEAUX ISOLANTS ET SOUCHES DE RÉFÉRENCES

Partie I. Isolation et caractérisation des bactéries productrices de la protéase provenant des eaux et du sol du Québec

Table 1. Proteolytic activity of selected isolates by milk agar plate technique	91
Table 2. Maximum values of TC, VS, PA, SPA and μ_m of <i>Bacillus</i> strains in shake flask and fermentor	92
Table 3. Effect of various metal ions on PA of different <i>Bacillus</i> isolates	93

Partie II Comparaison des activités de protéase chez les souches de *Bacillus licheniformis* différentes en utilisant des boues d'épuration et soja synthétique milieu comme matières premières.

Table 1. Physical and chemical characteristics of secondary sludge	118
Table 2. Extracellular protease production of <i>B. licheniformis</i> strains in different media (Shake flask)	119
Table 3. Extracellular protease production of <i>B. licheniformis</i> strains in different media (fermentor)	120

CHAPITRE 3 INFLUENCE DES SOURCES DE CARBONE ET D'AZOTE SUR L'AMÉLIORATION DE LA PRODUCTION DE LA PROTÉASE ALCALINE

Augmentation de la production de la protéase par addition de sources de carbone et d'azote à un milieu des boues d'épuration

Table 1. Physical and chemical characteristics of secondary sludge	149
--	-----

Table 2.	Extracellular protease production of <i>B. licheniformis</i> in shake flask with supplementation of different carbon sources and different concentrations of lactose to sludge medium	150
Table 3.	Extracellular protease production of <i>B. licheniformis</i> in shake flask and fermentor with supplementation of different nitrogen sources and different concentrations of soya bean meal.	151

CHAPITRE 4 RÉCUPÉRATION ET APPLICATION DE LA PROTÉASE ALCALINE

Récupération de protéase alcaline *Bacillus licheniformis* du surnageant de fermentation des boues d'épuration et sa caractérisation en utilisant l'ultrafiltration

Table 1.	Physical and chemical characteristics of secondary sludge	185
Table 2.	Characteristics of the membrane	186
Table 3.	Maximum values of protease activity, soluble protein, total solids and suspended solids at optimum TMP and feed flux	186
Table 4.	Effect of enzyme inhibitor and chelator on protease activity	187
Table 5.	Effect of metal ions on alkaline protease activity	187
Table 6.	Activity of alkaline protease against different natural proteins	188
Table 7.	Compatibility of alkaline protease activity from <i>B. licheniformis</i> with commercial detergents	188

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 SYNTHÈSE

- Figure 1. Colonie de *Bacillus licheniformis* 12
- Figure 2. Plan d'une usine de traitement des eaux usées de la région de Québec (CUQ). 32

CHAPITRE 2 L'ISOLATION, LE DÉPISTAGE ET LA COMPARAISON DES NOUVEAUX ISOLANTS ET SOUCHES DE RÉFÉRENCES

Partie I Isolation et caractérisation des bactéries productrices de la protéase provenant des eaux et du sol du Québec

- Figure 1. Growth (TC and VS) and PA of *Bacillus* strains in shake flask 94
- Figure 2. Growth (TC and VS), DO concentration and PA of *Bacillus* strains in fermentor 95
- Figure 3. Effect of pH on activity and stability of proteases from *Bacillus* strains 96
- Figure 4. Effect of temperature on the protease activity produced by *Bacillus* strains in the absence (A) and presence (B) of 10 mM CaCl₂ 97
- Figure 5. Thermostability of proteases produced by *Bacillus* strains at different temperatures in the presence of 10 mM CaCl₂ after 2 h incubation 98

Partie II Comparaison des activités de protéase chez les souches de *Bacillus licheniformis* différentes en utilisant des boues d'épuration et soja synthétique milieu comme matières premières.

- Figure 1. Protease production by *B. licheniformis* strains using synthetic soy medium (a) and sludge (b) as raw material in shake flask. 121
- Figure 2. Protease production by *B. licheniformis* strains using synthetic soy medium (a) and sludge (b) as raw material in fermentor. 122
- Figure 3. Correlation of protease activity with viable spore count count of different media [synthetic soy medium (a) and sludge (b)] in fermentor by different *B. licheniformis* strains. 123

CHAPITRE 3 INFLUENCE DES SOURCES DE CARBONE ET D'AZOTE SUR L'AMÉLIORATION DE LA PRODUCTION DE LA PROTÉASE ALCALINE

Augmentation de la production de la protéase par addition de sources de carbone et d'azote à un milieu des boues d'épuration

- Figure 1. Effect of different carbon sources on alkaline protease production. (TC- total cell count, VS- viable spore count, PA- protease activity and SA- specific activity) 152
- Figure 2. Effect of different concentrations of lactose on alkaline protease production. (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity) 153

Figure 3.	Effect of different nitrogen sources on alkaline protease production. (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)	154
Figure 4.	Effect of different concentrations of soybean meal on protease production (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)	155
Figure 5a.	Validation of optimum carbon and nitrogen sources for alkaline protease production in the shake flask. (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)	156
Figure 5b.	Validation of optimum carbon and nitrogen sources for alkaline protease production in the fermentor. (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)	156

CHAPITRE 4 RÉCUPÉRATION ET APPLICATION DE LA PROTÉASE ALCALINE

Récupération de protéase alcaline *Bacillus licheniformis* du surnageant de fermentation des boues d'épuration et sa caractérisation en utilisant l'ultrafiltration

Figure 1.	Schematic representation of ultrafiltration process and cross section of the membrane	189
Figure 2.	Protease activity and protein concentration in the retentate at different transmembrane pressures	190
Figure 3.	Total solids (TS) and suspended solids (SS) concentration in the retentate at different transmembrane pressures	190
Figure 4.	Protease activity and protein concentration in the retentate at different feed flux rates	191
Figure 5.	Total solids (TS) and suspended solids (SS) concentration in the retentate at different feed flux rates	191
Figure 6.	Effect of pH on the activity and stability of alkaline protease in the absence and presence of 10mM CaCl ₂	192
Figure 7.	Effect of temperature profiles on activity of enzyme in the absence and presence of 10mM CaCl ₂	192
Figure 8.	Effect of temperature on stability of alkaline protease enzyme (ultrafiltrated samples) in the presence of 10mM CaCl ₂	193
Figure 9.	Washing test of alkaline protease from <i>B. licheniformis</i> ATCC 21424 in presence of detergent (Sunlight). A) Positive control, B) Negative control, C) With distilled water, D) With Enzyme alone, E) With detergent alone, and F) With enzyme + detergent.	193

LISTE DES ABRÉVIATIONS

DFP	Dy-isopropyl fluorophosphate
PMSF	Phenyl methyl sulphonyl fluoride
<i>p</i> CMB	<i>p</i> -chloromercure benzoate
TLCK	Na-tosyl- L -lysine chloromethyl ketone
EDTA	L'acide diaminetétracétique éthylène
GYA	Gélose glucose – extrait de levure – asparagine
PPYG	Milieu peptoné – extrait de levure – glucose
MRS	Méthodologie surface réponse
BEU	Boues d'Eau Usée
UTEU	Usines de traitement des eaux usées
PEG	Polyéthylène glycol
U/mL	Unité per millilitre
UI/mL	Unité internationale per millilitre
PA	Protease activity
CUQ	Communauté Urbaine de Quebec
TC	Total cell count
VS	Viable spore count
DO	Dissolved oxygen
SPA	Specific protease activity
$\mu_{\max}$	Maximum specific growth rate

CHAPITRE 1

SYNTHÈSE

1.1 INTRODUCTION

Les enzymes sont des catalyseurs solubles, colloïdaux et organiques, qui sont produites par les cellules vivantes, mais dont l'activité est indépendante des cellules. Elles sont normalement présentes en petite quantité dans les cellules bactériennes. Elles sont hydrosolubles, précipitées par les agents précipitant les protéines tels que les alcools et le sulfate d'ammonium. Elles sont amphotères, ont des points isoélectriques et ont un contenu en azote avoisinant les 16%. Dans la plupart des cas, les pH extrêmes et les hautes températures dénaturent les protéines enzymatiques et les rendent inactives. Certaines enzymes sont aussi capables de se combiner avec des groupements prosthétiques afin de former des protéines conjuguées. Certaines enzymes ne sont actives que sous forme conjuguée.

Les enzymes et coenzymes microbiennes sont largement employées dans l'industrie des détergents, alimentaire, brassicole et pharmaceutique. Elles sont aussi employées à des fins diagnostiques médicales et analytiques. Depuis longtemps, elles ont été employées dans la préparation d'aliments fermentés, particulièrement dans la culture orientale (Reed, 1975). Les enzymes liées à une matrice, ou encore retenues dans un réacteur sont utilisées de façon préférentielle car elles peuvent être réutilisées. L'utilisation la plus importante des enzymes immobilisées consiste en la synthèse ou la modification de différents produits.

Actuellement les enzymes les plus importantes au niveau économique sont les protéases de *Bacillus* sp., les glucoamylases, les amylases de *Bacillus* sp., la glucose isomérase, la présure, les amylases fongiques, les cellulases et les pectinases. Plus de 300 tonnes d'enzyme sont produites annuellement. Précédemment, certaines enzymes étaient produites en culture de surface par les microorganismes cultivés en fines couches de milieu solide ou liquide (George *et al.*, 1995). À l'heure actuelle, la plupart des enzymes sont produites en cultures submergées (Nadeem *et al.*, 2008; Guangrong *et al.*, 2008). Dans les fermentations enzymatiques, de grandes précautions se doivent d'être prises afin d'éviter la contamination par des microorganismes étrangers et des conditions aseptiques doivent donc être maintenues tout au long du procédé de fermentation. Les procédés de fermentations enzymatiques sont aussi caractérisés par une forte demande en oxygène. La plupart des enzymes d'intérêt industriel sont extracellulaires c'est-à-dire sécrétées par les cellules dans le milieu de culture ambiant, à partir duquel elles doivent être récupérées par extraction et séparation des autres particules solides.

La plupart des technologies enzymatiques tendent à être concentrées autour des procédés hydrolytiques. Le développement de procédés industriels impliquant des réactions enzymatiques plus complexes a à peine été exploré, possiblement parce que ces systèmes plus complexes nécessitent des coenzymes.

L'activité d'une enzyme est régie par de nombreux facteurs tels que la concentration d'enzyme, la concentration et la disponibilité du substrat, la concentration des cofacteurs, des effecteurs allostériques, la concentration et le type d'inhibiteur, la force ionique, le pH ou encore la température et le temps de réaction.

Classification des enzymes

Les enzymes sont globalement divisées en six groupes, basés sur leur fonction, selon la commission de l' I.U.P.A (Tableau 1).

Tableau 1. Classification des enzymes industrielles d'importance et microorganismes producteurs associés.

Enzymes	Microorganismes producteurs
Oxydoréductases Ex. Glucose oxydase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium amagasakiense</i>
Transférases Ex. α -glucosyl transférase, β -glucosyl transférase	<i>Aspergillus aureus</i> , <i>Myrothecin verrucaria</i>
Hydrolases Ex. Cellulase, penicilline acylase	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>E. coli</i>
Lyases	<i>A. niger</i>
Isomérases Ex. Glucose isomérase	<i>Bacillus coagulans</i>
Ligases Ex. ADN ligase	<i>E. coli</i>

Source des enzymes

Les enzymes peuvent être d'origine végétale, animale ou microbienne :

Origine végétale: β -amylase, peroxidases, papaïne, bromélaïne, uréase, ficine, polyphénol oxidase (tyrosinase), lipoxygénase etc.

Origine animale: Pepsine, lipase, lysozyme, rénine, trypsine, phospho-mannase, chymotrypsine etc.

Origine microbienne: α -amylase, cellulase, penicilline acylase, protéase, invertase, lactase, dextranase, pectinase, pullulanase etc.

Les enzymes d'origine végétale et animale ont longtemps été plus utilisées que celles d'origine microbienne, mais pour des considérations techniques et économiques, ces dernières prennent de plus en plus d'importance. Ainsi, des efforts considérables sont déployés pour produire de plus en plus d'enzymes par des procédés de culture microbienne.

Avantages des enzymes d'origine microbienne

- Les sources animales d'enzyme sont limitées. La grande diversité biochimique des microorganismes potentiellement producteurs d'enzyme les rend beaucoup plus attrayants.
- Faisabilité de la production d'enzyme à grand volume et facilité d'extraction des enzymes produites.
- Utilisation de milieu de culture peu dispendieux.
- Facilité à développer des méthodes de criblage simples.
- Développement de nouvelles souches plus performantes afin d'augmenter les rendements.
- Production d'enzymes d'origine animale et/ou végétale par ingénierie génétique (ex. insuline).
- Absence de variations saisonnières.

Avec les avancées biotechnologiques dans le domaine des protéines, les enzymes, jadis confinées aux procédés de biocatalyse conventionnels, ont évoluées et sont devenues des outils importants largement employées dans une panoplie de procédés industriels. Les avantages d'employer les enzymes en industrie tiennent à leur grande efficacité, leur précision et leur spécificité et leurs aspects pratique et économique. Elles remplacent ainsi les catalyseurs chimiques dans de nombreux procédés de production de produits à valeur ajoutée.

Les applications potentielles des enzymes se sont diversifiées dues aux développements des domaines suivants:

- ❖ De hauts rendements peuvent être obtenus par manipulation génétique des souches.
- ❖ Optimisation des conditions de fermentation par l'induction de la production d'enzyme, utilisation de milieux de culture de faible couts, et introduction des fermentations en fed-batch.
- ❖ Relaguage des enzymes intracellulaires par des nouvelles méthodes de lyse des parois cellulaires.
- ❖ Méthodes de purification modernes telle que la chromatographie par affinité, par échange d'ions et la précipitation.
- ❖ Développement de procédés pour l'immobilisation et la réutilisation des enzymes. La proportion des couts reliés aux enzymes devient alors minime dans certains procédés.
- ❖ Production continue d'enzyme en réacteur spécial.

Les enzymes suivantes font actuellement l'objet d'une production commerciale :

- ❖ Enzymes industrielles utilisées en industrie : amylase, protéase, pénicilline acylase, isomérase, catalases etc.
- ❖ Enzymes analytiques utilisées à des fins d'analyses: glucose oxydase, cholestérol oxydase etc.
- ❖ Enzymes utilisées en médecine: protéases, streptokinase, asparaginase etc.

L'objectif principal de cette étude consiste à évaluer le potentiel d'utilisation des boues d'épuration municipale, un substrat peu dispendieux et disponible en très grande quantité, comme milieu de culture liquide pour la production de protéases alcalines. Ces travaux

permettent aussi d'évaluer la production de produits à valeur ajoutée comme nouvelle voie de valorisation des boues d'épuration. Le succès d'un procédé microbiologique dépend du fait d'avoir le microorganisme approprié, dans un environnement physico-chimique approprié (Boopathy, 2000). Un milieu de culture optimisé pour un microorganisme en particulier maximise non seulement la production de biomasse, mais stimule également la biosynthèse des enzymes (Zhu *et al.*, 1996). La bioconversion des boues utilisant un microorganisme approprié comme moyen de traiter les boues nécessitera l'ajout d'une diversité de nutriments pour la croissance du microorganisme. Les résultats de l'ajout de nutriment dans un procédé à grande échelle peuvent probablement être prédits à partir des résultats obtenus au niveau des études à l'échelle laboratoire. L'utilisation de protéases produites par *B. licheniformis* par la fermentation des boues pourrait être d'une grande importance dans certains procédés industriels (formulation de détergent, traitement des eaux usées, tannerie).

1.2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.2.1 Protéases

Les protéases alcalines d'origine microbienne dominent le marché mondial des enzymes, plus des deux tiers étant employés dans le marché des détergents. La production de protéases est une propriété inhérente à tous les microorganismes. Cependant, seuls ceux produisant une quantité significative de protéases extracellulaires sont exploités commercialement. Parmi ceux-ci, les souches de *Bacillus* sp. dominent le secteur industriel (Gupta *et al.*, 2002a). La valeur actuelle estimée du marché mondial des enzymes est de 1 milliard \$ et les protéases occupent 60% de tout ce marché. Les protéases ont de plus été les premières enzymes à être produites en grande quantité (Manjeet *et al.*, 1998; Meenu *et al.*, 2000; Lazim *et al.*, 2009). Historiquement, les enzymes de coagulation du lait ont été utilisées pour transformer le lait en produits tels que le fromage depuis 5000 ans avant J-C. Les protéases pancréatiques ont été utilisées pour le délainage des peaux et comme agent de prélavage depuis 1910. Maintenant, les protéases pancréatiques sont largement remplacées par des protéases d'origine microbienne.

Les protéases alcalines sont physiologiquement et commercialement un important groupe d'enzymes et sont principalement utilisées comme additifs dans les détergents. Elles jouent un rôle catalytique spécifique dans l'hydrolyse des protéines. En 1994, le marché total des enzymes

industrielles comptait pour environ 400 millions \$, et de ce marché, le secteur des détergents représentait 112 millions \$ (Hodgson, 1994). Au Japon, en 1994, les ventes de protéases alcalines étaient estimées à 15 000 millions de yen (équivalent à 116 millions \$) (Horikoshi, 1996). Les protéases alcalines comptent pour 40% de toutes les ventes d'enzymes mondiales. Il est estimé que l'emploi de protéases alcalines sera à la hausse dans les années à venir.

Les protéases peuvent être sommairement divisées en deux groupes –les peptidases et les protéinases. Les peptidases hydrolysent les liens peptidiques près des extrémités N ou C terminales, i.e. hydrolysent les liens entre les acides aminés qui sont à l'extérieur. Les peptidases étaient autrefois désignées par le terme exopeptidases. Les protéinases hydrolysent les liens peptidiques à l'intérieur des chaînes protéiques ou sur d'autres chaînes. Elles étaient autrefois désignées par le terme endopeptidases.

Un système de classification plus rationnel est basé sur la comparaison des sites actifs, les mécanismes d'action et la structure tridimensionnelle des enzymes (Rawlings et Barrett, 1993).

Les protéases peuvent aussi être classifiées sur la base de :

- (a) pH
- (b) spécificité du substrat
- (c) Similarité dans le mécanisme d'action avec des enzymes bien connues et caractérisées comme la trypsine, chymotrypsine et l'élastase.
- (d) Résidu acide aminé au site actif et mécanisme catalytique.

De façon plus conventionnelle, les protéases sont classifiées en 4 grands groupes : protéases sérines, cystéines, aspartiques et les métallo-protéases.

1.2.1.1 Protéases Sérines

Les protéases sérines sont les protéases les plus répandues et distribuées dans le commerce (Salvesen et Nagase, 1989). Les enzymes de ce groupe ont un résidu sérine au niveau du site actif et sont généralement inhibées par le di-isopropyl fluorophosphate (DFP) et le phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF). La plupart de ces enzymes sont aussi inhibées par les agents thiols, tels que le *p*-chloromercure benzoate (pCMB), probablement due à la présence d'un résidu cystéine près du site actif, qui ne participe probablement pas au mécanisme catalytique de

l'enzyme. Ces protéases sont généralement actives à pH neutres et alcalins, avec un optimum se situant entre 7 et 11. Elles ont un large spectre de spécificité au substrat, incluant une activité esterolytique vis-à-vis de nombreux substrats estérifiés, et sont généralement de faible poids moléculaire (18,5-35 kDa).

1.2.1.2 Protéases Cystéines

Les protéases cystéines sont sensibles aux agents sulphydrés, tels que le pCMB, le Na-tosyl-L-lysine chlorométhyl ketone (TLCK), l'acide iodoacétique, l'iodoacétamine, les métaux lourds, et sont activées par les agents réducteurs tels que le cyanure de potassium ou la cystéine, le dithiothreitol, et l'acide diaminotétracétique éthylène (EDTA). L'occurrence des protéases cystéines a été rapportée seulement pour quelques espèces de mycètes (Kalisz, 1988). Des enzymes intracellulaires avec des propriétés similaires aux protéases cystéines ont été rapportées chez *Trichosporon spp.*, *Oidiodendron kalrai*, et *Nannizzia fulva*. Des protéases cystéines extracellulaires ont été rapportées chez *Microsporium sp.*, *Aspergillus oryzae*, et *Sporotrichum pulverulentum* (Kalisz, 1988). La plupart de ces enzymes sont actives à pH 5-8. Certaines sont stimulées par des agents réducteurs (Kalisz, 1988).

1.2.1.3 Protéases Aspartiques

Les protéases aspartiques sont caractérisées par leur activité maximum à de faibles pH (3-4) et leur insensibilité aux inhibiteurs des trois autres groupes d'enzymes (Kalisz, 1988). Elles sont largement présentes chez les mycètes, mais rarement retrouvées chez les bactéries et les protozoaires. La plupart des protéases aspartiques sont sensibles aux composés époxy et diazo-ketone en présence d'ions cuivre. Elles sont également inhibées par la pepsatine ou les inhibiteurs de pepsine de *Streptomyces*.

La plupart des protéases aspartiques ont des poids moléculaires de 30-45 kDa, et leurs points isoélectriques sont généralement compris entre 3,4-4,6. Ces enzymes ont une action spécifique envers les résidus d'acide aminés chargés ou aromatiques de chaque côté du point de clivage. L'activité catalytique implique deux résidus d'acide aspartique. Le mécanisme catalytique des protéases aspartiques requiert la liaison initiale d'une molécule d'eau au site actif avant l'attaque nucléophile sur le lien peptidique du substrat. La plupart des protéases aspartiques fongiques sont instables à des pH supérieurs à la neutralité et ne sont pas retrouvées dans les cultures réalisées à pH neutre ou alcalin.

1.2.1.4 Métalloprotéases

Les enzymes de ce groupe ont un pH optimum se situant entre 5 et 9, et sont sensibles aux agents chélatants les métaux, comme l'EDTA, mais ne sont pas affectées par les inhibiteurs de protéases sérines ou les agents sulfhydryl ((Salvesen et Nagase, 1989). Beaucoup d'enzymes ayant été inhibées par l'EDTA peuvent être réactivées par des ions tels que le zinc, le calcium et le cobalt. Elles sont largement répandues, mais seulement quelques une ont été rapportées chez les mycètes. La plupart des métalloprotéases bactériennes et fongiques contiennent du zinc, avec un atome de zinc par molécule d'enzyme. L'atome de zinc est essentiel pour l'activité enzymatique. Le calcium est requis pour stabiliser la structure de la protéine.

1.2.2 Microorganismes possédant une activité protéase

Tous les microorganismes suivent une voie de distribution basée sur la dépendance au pH pour atteindre une croissance maximale. La majorité d'entre eux sont connus pour se développer aux voisinages de valeurs de pH proches de la neutralité. Lorsque le pH n'est pas proche de la neutralité, la croissance de beaucoup de microorganismes se trouve affectée. Les bactéries alcalophiles isolées du sol représentent environ 1/10 au 1/100 de l'ensemble des bactéries neutrophiles. Cependant, certains neutrophiles sont capables de pousser à des pH extrêmes. Ceci est dû en premier lieu à l'adaptation des systèmes physiologiques et métaboliques en modifiant les propriétés de la membrane bioénergétique, des mécanismes de transport permettant ainsi aux cellules de survivre et de se multiplier sous diverses conditions (Krulwich and Guffanti, 1989; Krulwich *et al.*, 1990). Ce genre de microorganismes est qualifié d'extrémophile dépendant du pH.

Parmi les alcalophiles isolés pour diverses applications industrielles, il a été montré que des souches du genre *Bacillus* étaient prédominantes et considérées comme une source de production de protéases alcalines. La figure 1 présente des colonies typiques de *Bacillus licheniformis* et différentes souches de *Bacillus* productrices de protéases sont résumées dans le Tableau 2. Plusieurs champignons ont aussi été caractérisés pour la production de protéases alcalines dont principalement le groupe des *Aspergilli* (Chakrabarti *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2002a). Les différentes souches de champignons producteurs de protéases alcalines sont répertoriées dans le Tableau 3. De même, quelques levures ont été isolées pour la production de ces enzymes telles que les souches de *Candida* sp. qui sont considérées comme source potentielle de protéases

alcalines (Poza *et al.*, 2001). La souche *Aureobasidium pullulans* produit également des protéases (Donaghy and McKay, 1993).

Les protéases alcalines sont aussi produites par certains actinomycètes. *Kurthia spiroforme* est une bactérie Gram positive spiroforme ayant une appartenance lointaine au genre *Bacillus* a été reportée comme productrice de protéases alcalines (Steele *et al.*, 1992). Les souches de *Streptomyces* sont les sources privilégiées parmi les *Actinomycètes* (Gupta *et al.*, 2002a).

Les souches halophiles ayant été isolées pour leur production de protéases sont *Halobacterium* sp. (Ahan *et al.*, 1990), *Halobacterium* ATCC 43214 (Ryu *et al.*, 1994), et *Halomonas* sp. ES-10 (Kim *et al.*, 1991).

Les bactéries alcalopsychrotropes et alcalopsychrophiles représentent une nouvelle source de protéase alcaline (Margesin and Schinner, 1994). Ces souches sont caractérisées par leur capacité d'adaptation aux basses températures et aux conditions alcalines. Une souche alcalopsychrotrope de *Bacillus* sp. capable de produire une protéase alcaline à haute activité à de basses températures a été isolée par Margesin *et al.* (1992).

Peu d'études menées sur les protéases alcalines produites par *Bacillus* sp. rapportent la production de protéases thermostables à partir d'organismes alcalophiles. Plusieurs alcalophiles thermophiles sont capables de pousser à 60°C (Rahman *et al.*, 1994) à quelques exceptions près (Durham *et al.*, 1987; Takami *et al.*, 1989). Une liste de protéases alcalines thermostables produites à partir de thermophiles alcalophiles est rapportée dans le Tableau 4. De part l'importance industrielle et commerciale des protéases alcalines, nous avons résumé dans le Tableau 5 une liste des souches utilisées à l'échelle industrielle.

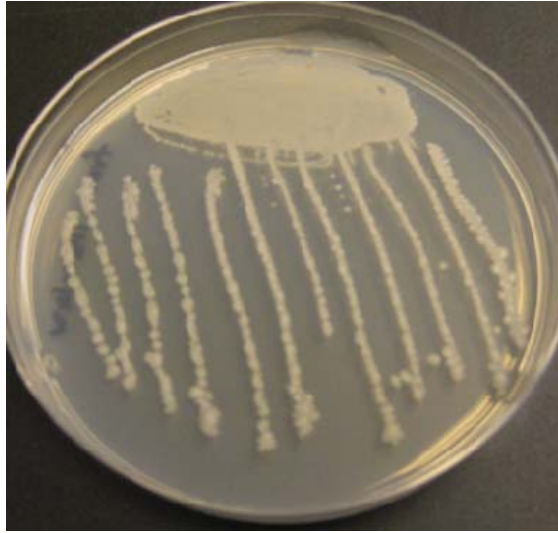


Figure 1. Colonie de *Bacillus licheniformis*

1.2.2.1 Isolement et criblage

L'isolement de souches bactériennes productrices de protéases alcalines peut être réalisé en utilisant un milieu gélosé riche contenant du lait écrémé. La formation de zone d'hydrolyse autour des colonies en raison de l'hydrolyse de la caséine est considérée comme une preuve de l'existence d'une activité protéase. Cette activité est considérée négative quand aucune zone d'hydrolyse n'est observée (Ellaiah *et al.*, 2003; Olajuyigbe *et al.*, 2005). De nos jours, plusieurs des souches de *Bacillus* productrices de protéase alcaline possèdent une grande importance industrielle principalement l'industrie du détergent (Adinarayana *et al.*, 2003; Kirk *et al.*, 2002; Jaouadi *et al.*, 2009).

Le sol normal du jardin est considéré comme une source d'isolement, probablement en raison de l'existence d'activités biologiques générant des conditions d'alcalinité transitoire dans ce genre d'environnement (Grant *et al.*, 1990).

Ces organismes sont aussi isolés à partir d'habitat non alcalins tels que les sols neutres ou acides.

La caractéristique la plus importante des alcalophiles c'est qu'ils sont capables de moduler leur environnement. Ils sont capables de convertir des milieux neutres ou hautement alcalins afin d'atteindre le pH externe optimum nécessaire pour leur croissance. Cependant, leur pH interne se situe entre 7 et 9, ce qui toujours est inférieur au pH du milieu extracellulaire. De ce fait, l'alcalophilicité est maintenue par ces microorganismes à travers les propriétés de la membrane

bioénergétique et des mécanismes de transport et ne dépendent pas nécessairement de l'activité d'enzymes intracellulaires alcali résistantes (Krulwich and Guffanti, 1983).

Dans les environnements naturels, le carbonate de sodium représente généralement la source majeure d'alcalinité. Son ajout aux milieux de d'isolement améliore la croissance des alcalophiles (Grant *et al.*, 1979). L'ajout de carbonate de sodium au milieu de culture pour l'isolement d'alcalophiles thermophiles provoque un brunissement de la couleur et un craquement de la gélose (Kitada *et al.*, 1987). À des températures supérieures à 70°C, les milieux à base d'agar perdent généralement leur pouvoir gélifiant et montrent une synérèse d'eau les rendant ainsi inutilisables (Lin and Casida, 1984). Le besoin de substances gélifiantes a permis de découvrir des agents tels que le Gelrite™ (Deming and Baross, 1986; Ishii *et al.*, 1987) et une concentration optimale d'agar bactériologique de 3% (m/v) (D'souza *et al.*, 1997).

1.2.2.2 Enrichissement et sélection

Le premier stade de développement d'un procédé de fermentation industrielle est l'isolement de souches capable de produire un produit d'intérêt à des rendements importants. Cette approche résulte en un programme de criblage intensif pour tester un large nombre de souches afin d'identifier ceux possédant d'importantes capacités de sécrétion du produit souhaité. Par convention, on entreprend de cultiver un grand nombre de souches sur des milieux gélifiés et de corréler leur croissance à leur aptitude à former des zones radiales de diffusion autour de la colonie. Dans le cadre du développement de milieux pour cribler l'activité protéase, il est essentiel qu'ils contiennent des sortes d'inducteurs du produit d'intérêt et être dépourvus de composés susceptibles de réprimer la synthèse de l'enzyme cible. Il a été prouvé que *B. licheniformis* produit des zones très étroites d'hydrolyse de la caséine malgré le fait qu'il s'agit d'un très bon producteur de protéases en cultures submergées (Mao *et al.*, 1992). Normalement, les organismes alcalophiles sont isolés par des ensemencements en surface sur des milieux hautement alcalins et criblés selon les caractéristiques recherchées. Les organismes sont ensuite cultivés sur des milieux spécifiques afin d'estimer leur activité protéolytique, en utilisant un substrat spécifique tel que le lait écrémé ou la caséine de lait. Les isolats montrant une activité importante sont isolés et maintenus en conservation sur gélose inclinée jusqu'à leur utilisation. Le milieu le plus utilisé pour la sélection des alcalophiles est celui développé par Horikoshi (1971). Plusieurs types de milieux prédéfinis pour l'isolement des alcalophiles incluant la gélose

nutritive (Joshi and Ball, 1993), gélose glucose – extrait de levure – asparagine (GYA) (Sen and Satyanarayana, 1993), milieu MYGP (Srinivasan *et al.*, 1983), milieu peptoné – extrait de levure – glucose (PPYG) (Gee *et al.*, 1980) ainsi que d'autres milieux tels que la gélose à la farine de blé (Fujiwara and Yamamoto, 1987a). La composition du milieu est variée par plusieurs auteurs afin d'isoler des organismes de choix tels que ceux possédant une activité protéolytique substantielle ou thermostables. Pour chaque type de milieu, un pH élevé est requis pour isoler les alcalophiles (Grant and Tindall, 1980).

Tableau 2. Certaines espèces productrices protéase alcaline de *Bacillus*

<i>Bacillus</i> sp. and their strains	References
<i>B. firmus</i>	(Moon and Parulekar, 1991; Landau <i>et al.</i> , 1992)
<i>B. alcalophilus</i>	(Sharma <i>et al.</i> , 1994)
<i>B. alcalophilus</i> sub sp. <i>halodurans</i> KP1239	(Takii <i>et al.</i> , 1990)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	(Malathi and Chakraborty, 1991)
<i>B. licheniformis</i>	(Ijura and Horikoshi, 1987)
<i>B. proteolyticus</i>	(Boyer and Byng, 1996)
<i>B. alcalophilus</i> ATCC 21522 (<i>Bacillus</i> sp. No. 221)	(Horikoshi, 1971)
<i>B. subtilis</i>	(Chu <i>et al.</i> , 1992)
<i>B. thuringiensis</i>	(Hotha and Banik, 1997)
<i>Bacillus</i> sp. <i>Ya-B</i>	(Tsai <i>et al.</i> , 1983)
<i>Bacillus</i> sp. <i>B21-2</i>	(Fujiwara and Yamamoto, 1987a)
<i>Bacillus</i> sp. <i>Y</i>	(Shimogaki <i>et al.</i> , 1991)
<i>Bacillus</i> sp. <i>KSM-K16</i>	(Kobayashi <i>et al.</i> , 1996)
<i>Haloalkaliphilic bacterium</i> sp. <i>AH-6</i>	(Dodia <i>et al.</i> , 2008)

Tableau 3. Protéase alcaline produisant des espèces de champignons

Fungal species	References
<i>Aspergillus flavus</i>	(Chakraborty and Srinivasan, 1993)
<i>A. fumigatus</i>	(Monod <i>et al.</i> , 1991; Larcher <i>et al.</i> , 1992)
<i>Melleus</i>	(Luisetti <i>et al.</i> , 1991)
<i>Sojae</i>	(Hayashi <i>et al.</i> , 1967)
<i>Sulphureus</i>	(Danno, 1970)
<i>Niger</i>	(Barthomeuf <i>et al.</i> , 1992)
<i>Oryzae</i>	(Nakadai <i>et al.</i> , 1973)
<i>Cephalosporium sp. KSM 388</i>	(Tsuchiya <i>et al.</i> , 1987)
<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	(Dozie <i>et al.</i> , 1994)
<i>Entomophthora coronata</i>	(Jonsson, 1968)
<i>Fusarium graminearum</i>	(Phadatare <i>et al.</i> , 1993)
<i>Penicillium griseofulvum</i>	(Dixit and Verma, 1993)
<i>Fusarium sp.</i>	(Kitano <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. lilacinus</i>	(Den Belder <i>et al.</i> , 1994)
<i>Scedosporium apiosermum</i>	(Larcher <i>et al.</i> , 1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PseA	(Mahanta <i>et al.</i> , 2008)

Tableau 4. Micro-organismes produisant des protéases alcalines thermostables

Organism	References
<i>Bacillus licheniformis</i>	(Sen and Satyanarayana, 1993; Sinha and Satyanarayana, 1991)
<i>stearothermophilus</i>	(Rahman <i>et al.</i> , 1994; Dhandapani and Vijayaragavan, 1994)
<i>B. thermoruber</i> BT2T	(Manachini and Fortina, 1998)
<i>Bacillus</i> sp. B 189	(Fujiwara <i>et al.</i> , 1993)
<i>Thermus</i> sp. Rt41A	(Ijura and Horikoshi, 1987)
<i>Thermococcus celer</i> , <i>T. stetteri</i> , <i>T. litoralis</i>	(Antranikian and Klingeberg, 1991a)
<i>Thermomonospora fusca</i>	(Desai and Dhalla, 1969)
<i>Thermoactinomyces</i> sp.	(Tsuchiya <i>et al.</i> , 1992)
<i>Staphylothermus marinus</i>	(Antranikian and Klingeberg, 1991b)
<i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i>	(Ong and Gaucher, 1976)

Tableau 5. Les producteurs commerciaux de protéases alcalines

Organism	Trade name	Manufacturer
<i>Bacillus licheniformis</i>	Alcalase	Novo Nordisk, Denmark
Protein engineered variant of alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Maxapem	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Savinase, Esperase	Novo Nordisk, Denmark
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Maxacal, Maxatase	Gist-Brocades, The Netherlands
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Opticlean, Optimase	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Proleather	Amano Pharmaceuticals Ltd., Japan
<i>Aspergillus</i> sp.	Protease P	Amano Pharmaceuticals Ltd., Japan

1.2.3 Applications des protéases alcalines

Les protéases alcalines sont des enzymes réputées pour leur robustesse et pour leur aptitude à être utilisées dans l'industrie du détergent, dans la tannerie, dans la récupération de l'argent, pour l'industrie pharmaceutique et alimentaire et les industries chimiques de même que pour le traitement des déchets. Ces enzymes contribuent au développement de produits à hautes valeurs ajoutées en exploitant leur activité de digestion partielle. Les domaines utilisant couramment les protéases dans leurs procédés sont:

1.2.3.1 Industrie du détergent

L'industrie du détergent est actuellement le principal consommateur d'enzymes hydrolytiques agissant en milieu alcalin. Un intérêt particulier a été accordé aux enzymes pour leur capacité à éliminer les tâches protéiques et de ce fait atteindre des bénéfices impossibles à obtenir avec des technologies conventionnelles de fabrication de détergent. L'utilisation des protéases dans les détergents a connu un essor grandissant surtout en application dans la formulation des détergents à usage domestique. Cet intérêt porté aux enzymes protéolytiques est dû principalement aux apports en terme de qualité du nettoyage reconnue par le consommateur, aux performances d'amélioration de la qualité des tissus et l'augmentation du rapport performance/prix en raison de la disponibilité d'enzymes de plus en plus efficaces couplée à une réduction des coûts de production industrielle.

Pour qu'une enzyme soit utilisée dans une formule de détergent, il faudrait qu'elle possède deux principales qualités : elle doit être active à des pH alcalins et doit être compatible avec les différents composants des détergents. L'utilisation principale des protéases compatibles dans les détergent concerne les formulations de lessives pour linge (Kirk *et al.*, 2002; Jaouadi *et al.*, 2009; Joo *et al.*, 2005; Genckal, 2006).

Les détergents disponibles sur le marché international tels que Dynamo, Era plus (Procter & Gamble), Tide (Colgate Palmolive) contiennent des protéases alcalines provenant principalement du genre *Bacillus*.

De plus, les fournisseurs d'enzymes et les industries des détergents sont toujours à la recherche de nouvelles activités enzymatiques répondant aux besoins d'une meilleure qualité de nettoyage, de meilleures propriétés antimicrobiennes et de protection des tissus exprimées par le

consommateur. Cependant, malgré leur importance majeure dans l'industrie des détergents, les protéases sont aussi très employées dans la formulation de détergents pour vaisselle et pour le nettoyage industriel et institutionnel. Le marché des protéases pour l'industrie des détergents a été multiplié par 10 au cours des 20 dernières années (Gupta *et al.*, 2002b).

Les préparations d'enzymes commercialisées présentement pour le nettoyage des systèmes membranaires sont Alkazym (Novodan A/S, Copenhagen, Denmark), Terg-A-Zyme (Alconox, Inc, New York, USA) et Ultrasil 53 (Henkel kGaA, Dusseldorf, Germany). De plus, les préparations pour le nettoyage des lentilles de contact contiennent une protéase alcaline produite par une bactérie marine permettant de réaliser un nettoyage à basses températures (Greene *et al.*, 1996). Gupta *et al.* (2002 b) a rapporté que les firmes Novo Nordisk et Genencor International sont les principaux fournisseurs de protéases avec une production de plus de 95% de la production totale du marché mondial.

1.2.3.2 L'industrie du cuir

L'industrie du cuir et de la tannerie fait aussi intervenir les enzymes protéolytiques pour l'épilage des peaux d'animaux. Traditionnellement, cette opération est effectuée par le traitement des peaux d'animaux par une solution de saturée de chaux et de sulfite de sodium. En plus d'être couteuse et drastique, cette technique produit un effluent très pollué. L'alternative à ce procédé est l'utilisation des enzymes pour l'épilage des peaux d'animaux. L'épilage à l'aide des enzymes est préférentiellement possible si la protéase est active en milieu alcalin (pH 11). Il serait aussi préférable qu'elle possède des activités élastolytiques et kératinolytiques.

Plusieurs essais sur un nombre d'enzymes protéolytiques ont été menés sans succès. Cependant, il a été rapporté que des protéases de certaines bactéries de nature alcalophiles étaient performantes pour l'épilage des peaux d'animaux (Nilegaonkar *et al.*, 2007).

Les protéases alcalines permettent d'accélérer l'opération d'épilage. En effet, en milieu alcalin, les racines capillaires gonflent ce qui facilite l'attaque des follicules capillaires par les protéases entraînant le décollement aisé des poils (Gupta *et al.*, 2002b). Hameed *et al.* (1999) a utilisé la protéase alcaline de *B. subtilis* K2 dans le confitage et la tannerie. L'utilisation de la protéase de *B. subtilis* IIQD32 pour l'épilage des poils de peaux de mouton a été rapportée par Varela *et al.* (1997).

1.2.3.3 Récupération de l'argent

Les protéases alcalines sont aussi employées dans les bioprocédés utilisant les films de rayons X usagés pour la récupération de l'argent. En effet, ces pellicules contiennent approximativement 1.5 à 2% (m/m) d'argent dans leurs couches de gélatine. La pratique conventionnelle de récupération de l'argent consiste à brûler les films ce qui provoque des problèmes de pollution environnementale. Pour cela l'utilisation des enzymes hydrolytiques permet de recycler non seulement l'argent mais aussi la base de polyester du film.

La protéase alcaline de *Bacillus* sp. B21-1 (Fujiwara and Yamamoto, 1987b) et *B. coagulans* PB-77 (Gajju *et al.*, 1996) a décomposé le revêtement gélatineux des films de rayons X usagés à partir desquels l'argent a été récupéré. De plus, la mise en place d'un procédé de récupération de l'argent en continu a été rapportée par Fujiwara *et al.* (1989).

1.2.3.4 Usages médicaux

Les collagénases à activité protéasique sont de plus en plus utilisées en thérapeutiques dans les formulations de médicaments à libération lente.

Une nouvelle protéase semi alcaline avec une importante activité collagénolytique a été produite par *Aspergillus niger* LCF9. L'enzyme a permis l'hydrolyse de différents types de collagènes sans libération d'acides aminés mais plutôt des peptides à faible poids moléculaire possédant un potentiel thérapeutique (Barthomeuf *et al.*, 1992). De plus, *Bacillus* sp. a été reconnu en tant qu'organisme sans danger pour les humains (De Boer and Diderichsen, 1991) et une protéase alcaline ayant une activité fibrinolytique a été utilisée comme agent thrombolytique (Kim *et al.*, 1996).

1.2.3.5 Industrie alimentaire

Les protéases microbiennes ont beaucoup été exploitées dans l'industrie alimentaire. Ces enzymes ont été utilisées dans la préparation d'hydrolysats de protéines à haute valeur nutritionnelle. Les hydrolysats de protéines jouent un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et sont employés dans les formulations des aliments pour enfants, dans les produits diététiques et pour l'enrichissement des jus de fruits et des boissons non alcoolisées (Neklyudov *et al.*, 2000).

Une protéase alcaline de *B. amyloliquefaciens* a permis la production d'hydrolysats de protéine riche en méthionine à partir de protéines de pois chiche (George *et al.*, 1997). Les hydrolysats de protéine produit de la caséine, les protéines du lactosérum et des protéines de soja sont majoritairement utilisés dans les formulations d'aliments hypoallergéniques pour enfants (American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition, 1989; Reddy *et al.*, 2008a).

De plus, des hydrolysats de protéines possédant une activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I ont été produits par traitement du muscle de sardine par la protéase alcaline de *B. licheniformis*. Ces hydrolysats pourraient être utilisés efficacement dans le développement d'aliments fonctionnels jouant un rôle important dans la régulation de la pression artérielle (Matsui *et al.*, 1993).

Les protéases jouent aussi un rôle prédominant dans l'attendrissage de la viande de bœuf. Une élastase alcaline (Takagi *et al.*, 1992) et une protéase alcaline thermostable (Wilson *et al.*, 1992) ont montré leurs efficacités à attendrir la viande puisqu'elles possèdent la capacité d'hydrolyser les tissus connectifs ainsi que les fibres protéiques des muscles.

Une méthode potentielle utilise une combinaison spécifique de protéases neutres et alcalines pour l'hydrolyse de la viande crue. L'hydrolysats de viande produit montre d'excellentes propriétés organoleptiques et peut être utilisé en tant qu'additif aromatique dans les concentrés de soupe. Une hydrolyse d'environ 20% n'a pas montré d'amertume lorsque cette combinaison d'enzyme est utilisée. Ceci pourrait être dû au fait qu'une spécificité préférentielle a été favorable quand les métalloprotéinases et les sérines protéinases ont été utilisées simultanément (Pedersen *et al.*, 1994).

1.2.3.6 Traitement des déchets

Les protéases alcalines trouvent beaucoup d'applications dans le domaine de la gestion des déchets domestiques et des industries agro-alimentaires. Les protéines fibreuses de poils, de cheveux, d'ongles ou encore de plume sont des déchets très abondants dans la nature. Ceux-ci peuvent être transformés en biomasse, en concentrés protéiques ou en acides aminés en utilisant l'action des protéases de certains microorganismes (Anwar and Saleemuddin, 1998).

Dalev (1994) a rapporté un procédé enzymatique utilisant une protéase alcaline de *B. subtilis* dans le traitement de déchets de plumes provenant de l'industrie avicole. Le produit final

consistait en une poudre dense et grisâtre riche en protéines, pouvant de ce fait être utilisée en tant qu'additif dans l'alimentation humaine.

Similairement, beaucoup d'autres protéases alcalines kératinolytiques ont été utilisées dans l'alimentation humaine (Chandrasekharan et Dhar, 1986; Bockle et Miller, 1997), pour la production d'acides aminés ou de peptides (Kida *et al.*, 1995), pour la dégradation des rejets kératineux (Mukhopadhyay and Chandra, 1992) et en tant qu'agents dépilatoires pour éliminer les restes de cheveux dans les drains sanitaires responsables de l'émission d'odeurs nauséabondes (Takami *et al.*, 1992).

1.2.3.7 Industrie chimique

Il est maintenant bien établi que les enzymes dans les milieux organiques rendent possible d'utiliser la biocatalyse dans le domaine de la synthèse chimique. Cependant, une conséquence majeure de cette approche est que l'activité enzymatique soit réduite sous des conditions de déshydratation assez poussée. De ce fait, il serait important de découvrir un moyen de garder l'activité enzymatique à son maximum dans un milieu organique.

Certaines études ont montré la possibilité d'utiliser la protéase alcaline pour catalyser la synthèse de peptides en milieu organique (Chen *et al.*, 1991a; Nagashima *et al.*, 1992; Gololobov *et al.*, 1994). De plus, plusieurs travaux ont été réalisés pour synthétiser des peptides par des enzymes immobilisées sur des supports insolubles (Wilson *et al.*, 1994).

Une synthèse d'un polyester-saccharose a été effectuée en présence de pyridine et catalysée par une protéase alcaline Proleather produite par *Bacillus* sp. (Patil *et al.*, 1991). Proleather catalyse aussi la transesterification du D-glucose avec plusieurs donneurs de groupements acyles dans un milieu pyridine (Watanabe *et al.*, 1995).

Aussi, l'enzyme Alacalase a été utilisée pour catalyser la résolution des esters d'acides aminés (Chen *et al.*, 1991b) et il a été montré que des protéases alcalines de *Conidiobolus coronatus* étaient capables de remplacer la subtilisine Carlsberg dans la synthèse des mélanges racémiques de DL-phénylalanine et de DL-phénylglycine (Sutar *et al.*, 1992).

Tableau 6. Les applications actuels d'enzymes et de leurs sources

Enzyme	Source	Region of application
Dextranase	<i>Penicillium</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	Dental hygiene (cosmetic / health care)
Proteases (Papain)	Papaya latex	Meat tenderization (food industry)
Latex of ficus	Latex of <i>Ficus carica</i>	Dissolves scrap film to recover the silver.
Trypsin	Beef pancreas	Mucolytic action, wound cleaning (therapeutics)
Chymotrypsin	Beef pancreas	Along with trypsin treatment
Pepsin	Beef stomach	Digestive agent (therapeutics)
Renin	Beef stomach Bacterial- <i>B. subtilis</i> Fungal - <i>A. oryzae</i>	Curdling of milk for cheese manufacture (food & food processing)
Pectinases	<i>A. niger</i> , <i>A. wentii</i>	Fruit juices (food & drink industry)
Lipases	<i>Rhizopus</i> sp., <i>Candida lipolytica</i> .	Fat synthesis (food & drink industry)
Penicillin acylase	<i>E. coli</i> , <i>Penicillium</i> sp.	In the preparation of semi synthetic penicillin
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Confectionary (food & drink industry)
Cellulase	<i>A. niger</i> , <i>Trichoderma reesei</i>	Cellulase production (food industry)
Glucose Oxidase	<i>A. niger</i> , <i>P. amagasakiense</i>	Blood glucose estimation (diagnostics), antioxidant (food & drink industry)
Amylases	<i>B. amyloliquifaciens</i> <i>B. subtilis</i> , <i>B. polymyxa</i>	Maltose production, baking (food processing) Paper making, alcohol production (chemical industry)
Glucose isomerase	<i>Bacillus</i> sp., <i>B. coagulans</i> , <i>Actinoplanes</i> sp.	Fructose production (food & drink industry)

1.2.4 Production des protéases alcalines

Dans le développement industriel des souches, le potentiel de chaque souche est facteur principal mais pas le seul à prendre en considération. En effet, en absence d'un régime régulé du procédé de fabrication, il est probable d'avoir une bonne souche mais des conditions de fermentation médiocres qui font chuter la production. Il est donc nécessaire de considérer tous les paramètres nutritionnels et environnementaux durant la croissance.

1.2.4.1 Développement du milieu de culture

La sélection appropriée des composés du milieu, basée sur les aspects de régulation et d'économie est l'objectif même du développement des milieux de culture devant fournir les besoins nutritionnels essentiels pour assurer une bonne croissance. Les critères de performance sont donc les concentrations élevées en nutriments et la production rapide du milieu de culture à l'échelle industrielle.

De plus, des essais de fermentation doivent être réalisés a priori pour pouvoir développer un procédé à grande échelle. Ainsi il serait possible d'obtenir de nouveaux mutants plus performants sous des conditions spécifiques au procédé. Ainsi dans toute production d'enzyme, l'objectif principal est la minimisation du coût de production en optimisant le procédé de récupération après fermentation afin de maximiser la production industrielle.

De ce fait, il est essentiel de considérer que le développement de souches industrielles nécessite une approche triangulaire d'interaction entre l'amélioration des souches, le développement du milieu et l'optimisation du procédé. Chaque amélioration faite dans un de ces 3 domaines offrira une multitude d'opportunités dans les deux autres (Holt and Saunders, 1986). Cette interaction triangulaire représente un cycle sans fin. Le résultat d'un tel cycle sera l'amélioration de la productivité, la réduction des coûts de production et un meilleur approvisionnement en produits pharmaceutiques.

La plupart des microorganismes alcalophiles produisent des protéases alcalines. De ce fait, l'intérêt est limité à ceux pouvant les sécréter à des rendements élevés. Il est capital que ces organismes soient placés dans les conditions optimales de croissance pour en tirer le maximum d'enzymes. Les conditions de culture promouvant la production de protéases se sont avérées significativement différentes des conditions de culture favorables à la production de biomasse

(Moon and Parulekar, 1991). Au cours de la production industrielle des protéases alcalines, les milieux de culture synthétiques à des concentrations élevées (de carbohydrates, de protéines etc.) sont habituellement utilisés (100–150 g/L poids sec/L). Dans l'optique de produire une technologie économiquement fiable, les efforts de recherche sont concentrés sur : l'amélioration des rendements d'enzyme et l'optimisation des conditions de fermentation et des milieux de culture.

1.2.4.2 Augmentation du rendement de production

L'amélioration des souches joue un rôle clé dans le développement commercial de procédés de fermentation microbienne. Il est généralement admis que les souches sauvages produisent des quantités limitées d'enzymes d'intérêt pour être utilisées à l'échelle industrielle (Glazer and Nikaido, 1995). Beaucoup d'études ont été menées afin d'améliorer le rendement en protéases alcalines. Des approches récentes font intervenir le criblage de souches hyper-productrices, en recourant éventuellement au clonage, au mode fed-batch, à la fermentation en continu et à l'optimisation des milieux de culture (Gupta *et al.*, 2002b).

1.2.4.3 Optimisation du milieu de culture

La principale étape sur laquelle devrait reposer l'amélioration de la sécrétion des protéases est l'optimisation du milieu de culture pour la fermentation (Johnevelsy and Naik, 2001; Haki and Rakshit, 2003) puisque la production est très influencée par la composition du milieu. L'optimisation des conditions environnementales et nutritionnelles en adoptant la méthode classique du changement d'une variable (nutriments, anti mousses, pH, température etc.) tout en maintenant les autres fixes pourrait s'avérer fastidieuse et coûteuse. Les méthodes basées sur la méthodologie surface réponse (MRS) pour l'optimisation des conditions environnementales et nutritionnelles pourrait constituer une bonne alternative aux méthodes classiques (Bull *et al.*, 1990; Hicks, 1993; Adinarayana *et al.*, 2002; Chauhan and Gupta, 2004).

Wei-Hua chu (2007) a étudié l'optimisation des protéases alcalines extracellulaires de *Bacillus* sp. APP1 qui a mené à une production maximale en activité enzymatique de 2560 U/ml après 48h d'incubation, en présence de 1,5% de tourteau de soja comme source d'azote et 3% de farine de blé comme source de C, à une température de 50°C et pH-9. Reddy *et al.* (2008b) a étudié l'optimisation de la production de protéase alcaline par *Bacillus* sp. RKY3 en utilisant la méthodologie de surface réponse. Une augmentation de 2,3 fois a été obtenue avec le milieu de

culture optimisé. L'activité enzymatique a significativement augmenté de 417 U/ml (milieu non optimisé) à 939 U/ml (milieu optimisé).

Le rendement de protéase alcaline produite par *B. mojavensis* a été amélioré plus que 4 fois en faisant opérer la fermentation en semi-batch et en fed-batch en séparant la biomasse de l'enzyme produite (en procédant à une répression – induction intermittentes durant la croissance de la souche).

Les protéases alcalines sont en général produites par fermentation submergée. De plus, les procédés de fermentation en phase solide ont été étudiés pour la production de ces enzymes (Chakraborty and Srinivasan, 1993; George *et al.*, 1995). Les efforts de la recherche ont été principalement menés vers l'évaluation des effets de différentes sources de C et de N sur le rendement enzymatique et de leurs coûts, les besoins en métaux bivalents dans le milieu de culture et vers l'optimisation des paramètres environnementaux de fermentation tels que le pH, la température, l'aération et l'agitation. De plus, il n'existe aucun milieu bien établi pour obtenir la meilleure production en protéases alcalines de différentes souches. Chaque organisme possède ses propres conditions spécifiques pour une production optimale.

1.2.4.3.1 Source de carbone

Des études ont indiqué une réduction de la production de protéase due à la répression catabolique par le glucose (Kole *et al.*, 1988a; Frankena *et al.*, 1986; Gessesse *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2005). Zamost *et al.* (1990) quant à eux, ont corrélé les bas rendements de production de protéase avec la diminution du pH causé par la croissance rapide des microorganismes. En industrie, des concentrations élevées d'hydrate de carbone répriment la production d'enzymes. Par conséquent, la source de carbone a été ajoutée en continu ou en petites aliquotes durant toute la fermentation pour permettre à la flore de consommer la source de carbone avant qu'elle s'accumule. Ceci a également pour effet de maintenir le volume de la fermentation en plus de réduire la consommation d'énergie. (Aunstrup, 1980).

De plus hauts rendements de protéases alcalines ont été rapportés dans la littérature en employant différents sucres, tels que le lactose (Rahman *et al.*, 2005; Mabrouk *et al.*, 1999), le maltose (Tsuchiya *et al.*, 1991), le sucrose (Phadatare *et al.*, 1993; Oskouie, 2008), et le fructose (Sen et Satyanarayana, 1993; Joshi *et al.*, 2007). Cependant, une diminution du rendement dans la synthèse de l'enzyme a été observée avec ces sources de carbone à des concentrations élevées.

Le lactosérum, un sous-produit de l'industrie laitière, contenant principalement du lactose et des sels, a été démontré comme substrat potentiel pour la production de protéase alcaline (Donaghy et McKay, 1993). Divers acides organiques, tels que l'acide acétique (Ikeda *et al.*, 1974), l'acétate méthylique (Kitada et Horikoshi, 1976), et l'acide citrique ou le citrate de sodium (Takii *et al.*, 1990; Kumar, 1997) se sont montrés efficaces pour augmenter la production des protéases à pH alcalin. L'utilisation de ces acides organiques était intéressante en raison de leur prix aussi bien que pour leur capacité à contrôler les variations de pH.

1.2.4.3.2 Source d'azote

Dans la plupart des microorganismes, les formes organiques et inorganiques d'azote sont métabolisées pour produire des acides aminés, des acides nucléiques, des protéines, et des composantes de mur cellulaire. La protéase alcaline est composée d'azote à 15.6% et sa production dépend de la disponibilité des sources de carbone et d'azote dans le milieu (Kole *et al.*, 1988b). Bien que des sources complexes d'azote soient habituellement employées pour la production de protéase alcaline, les besoins particuliers pour un supplément spécifique d'azote diffèrent d'un microorganisme à un autre. De bas niveaux de production de protéase alcaline ont été rapportés avec l'utilisation de source d'azote inorganique dans le milieu (Nadeem *et al.*, 2008; Shika *et al.*, 2007; Anbu *et al.*, 2008). La synthèse d'enzymes s'est avérée réprimée par des sources d'azote rapidement assimilable telles que des acides aminés ou des concentrations élevées en ion d'ammonium dans le milieu (Frankena *et al.*, 1986; Johnvisesly *et al.*, 2001), répression expliquée par l'inhibition de l'activité protéase par les sels d'ammonium (Nehete *et al.*, 1986; Patel *et al.*, 2005).

Sinha et Satyanarayana (1991) et Oskouie (2008) ont observé une augmentation de production de protéase par l'addition du sulfate d'ammonium et de nitrate de potassium. Également, le nitrate de sodium (0.25%) stimule la production de protéase alcaline (Banerjee et Bhattacharyya, 1992). Plusieurs rapports ont cependant démontré que l'utilisation des sources d'azote organiques mène à une production plus élevée d'enzymes que celle des sources inorganiques d'azote. Laxman *et al.* (2005) ont enregistré des rendements d'enzymes très élevés en utilisant une combinaison de poudre graine de soya après l'extraction d'huile à 2% et d'extrait de malt, de glucose, d'extrait de levure et de peptone.

La liqueur de maïs moulue s'est avérée une source d'azote bon marché et approprié comme démontré dans la littérature (Sen et Satyanarayana, 1993; Malathi et Chakraborty, 1991; Singh *et al.*, 2008). Le tryptone (2%) et la caséine (1-2%) servent également comme excellentes sources d'azote (Phadatare *et al.*, 1993; Ong et Gaucher, 1976). L'addition de certains composés aminés s'est avérée efficace dans la production des enzymes extracellulaires par des bacilles alcalophile. (Ijura et Horikoshi, 1987). Cependant, la glycine semble avoir des effets inhibiteurs sur la production d'amylase et de protéase. Des acides aminés de caséines hydrolysées se sont également avérés inhibiteurs de la production de protéase (Ong et Gaucher, 1976). Des résidus solides provenant de l'extraction d'huiles (comme source d'azote) se sont avérés stimulateurs de la production d'enzymes dans certaines études (Shika *et al.*, 2008) tandis qu'ils ont eu l'effet contraire dans d'autres (Sen et Satyanarayana, 1993; Sinha et Satyanarayana, 1991).

1.2.4.3.3 Demande en ion métallique

Les ions métalliques divalents tels que le calcium, le cobalt, le cuivre, le bore, le fer, le magnésium, le manganèse, et le molybdène sont nécessaires dans le milieu de fermentation pour la production optimale de protéases alcalines. Cependant, la demande pour des ions métalliques spécifiques dépend de la source de l'enzyme. L'ajout d'AgNO₃ à une concentration de 0.05 mg/100 ml ou de ZnSO₄ à une concentration de 0.125 mg/100 ml a augmenté l'activité de protéase produite par *Rhizopus oryzae* (Banerjee et Bhattacharyya, 1992). Le phosphate de potassium a été employé en tant que source de phosphate dans la majorité des études (Mao *et al.*, 1992; Moon et Parulekar, 1991; Chauhan and Gupta, 2004). Ce composé se trouve également à apporter un pouvoir tampon au milieu. Le phosphate à une concentration de 2 g/L a été rapporté pour être optimal pour la production de protéase. Cependant, de plus grandes quantités de cet élément ont montré une inhibition dans la croissance des cellules et de la production de protéase (Moon et Parulekar, 1991). Lorsque la concentration en phosphate atteignait 4 g/L, le milieu précipitait lors de la stérilisation à l'autoclave (Moon et Parulekar, 1993). Cette précipitation, cependant, pouvait être empêchée par l'ajout d'EDTA au milieu (Chaloupka, 1985). Dans au moins un cas, les sels n'ont eu aucun effet sur les rendements de protéase (Phadatare, 1993).

1.2.4.3.4 pH et température

La caractéristique principale de la plupart des microorganismes alcalophiles est leur dépendance forte au pH extracellulaire pour la croissance cellulaire et la production d'enzymes. La synthèse

de protéase influence fortement la production de protéase (Puri *et al.*, 2002). Pour une production de protéase accrue par ces alcalophiles, le pH du milieu doit être maintenu au-dessus de 7.5 durant toute la fermentation (Aunstrup, 1980; Olajuyigbe *et al.*, 2005). Le pH du milieu affecte également fortement les processus enzymatiques et le transport de divers composants à travers la membrane cellulaire (Moon et Parulekar, 1991). Lors d'ajout d'ions ammonium, le milieu devient acide, alors qu'il devient alcalin lorsque l'azote est sous forme organique, tel que pour les acides aminés ou les peptides (Moon et Parulekar, 1993). La chute de pH peut également être due à la production d'acides (Moon et Parulekar, 1991). En vue d'établir un lien entre la production d'enzyme et la source d'azote utilisée, la variation de pH pourrait donner une idée sur la cinétique de production de protéases, telle que le début et la fin de la production de protéases.

1.2.4.3.5 L'aération et l'agitation

Durant la fermentation, l'aération contrôle indirectement le niveau d'oxygène dissous dans le bouillon de fermentation. Différents profils d'oxygène dissous peuvent être obtenus par: (i) la variation du taux d'aération; (ii) La variation de la vitesse d'agitation du bioréacteur; ou (iii) L'utilisation de gaz riche ou pauvre en oxygène (mélanges appropriés d'oxygène ou d'air-azote) comme source d'oxygène (Moon et Parulekar, 1991; Michalik *et al.*, 1995). La variation dans la vitesse d'agitation des erlenmeyers ou du bioréacteur influence l'efficacité du mélange et donc modifie également le temps de contact avec les nutriments.

Des rendements optimaux de protéase alcaline sont produits à 200 rpm avec *Bacillus subtilis* ATCC 14416 (Chu *et al.*, 1992) et *Bacillus licheniformis* (Sen et Satyanarayana, 1993; Potumarthi *et al.*, 2007). Les vitesses optimales d'agitation étaient de 100 rpm pour *Bacillus* I18 et 180 rpm pour *Bacillus* L18 et L21 (Genckal, 2006). Dans une étude, le *Bacillus* sp. B21-2 a produit de grandes quantités d'enzymes avec une agitation 600 rpm et avec une aération de 0.5 volume d'air par minute par volume de fermentation (vvm) (Fujiwara et Yamamoto, 1987a). *Bacillus firmus*, quant à lui, a produit un rendement d'enzyme maximum à un taux d'aération de 7 L/min (Mao *et al.*, 1992) et avec une agitation de 360 rpm. Cependant, la diminution du taux d'aération à 0.1 L/min a causé une réduction rapide des rendements en protéases (Moon et Parulekar, 1991). Ceci indique qu'une réduction dans le débit d'oxygène est un facteur limitant important pour la croissance ainsi que la synthèse de protéases.

1.2.5 Production de protéase à partir de boues d'eaux usées

Dû à la quantité limitée de terres agricoles et à l'augmentation rapide de la production d'eaux usées, le traitement et le rejet des boues seront parmi les questions environnementales importantes auxquelles le gouvernement canadien aura à faire face. Par conséquent, beaucoup de recherche sont réalisées afin de réutiliser et d'utiliser des boues pour la bioconversion en produits à valeur ajoutée afin de réduire le coût de gestion des boues.

Plusieurs recherches ont démontré que les Boues d'Eaux Usées (BEU) domestiques sont composées de carbone à 32%, de phosphore à 3.8%, d'azote à 1.6%, de magnésium à 0.05%, de potassium à 0.15% et d'une quantité suffisante d'éléments traces pour être employés en tant que matière première pour la production des produits à valeur ajoutée tels que les acides organiques, les carburants, les biosolides, les biopesticides, les biofertilisants et beaucoup de types de biocatalyseurs (Lourdes *et al.*, 2001; Alam *et al.*, 2003; Lachhab *et al.*, 2001; Jamal *et al.*, 2005; Barnabé *et al.*, 2003). La production de protéases comme enzymes protéolytiques en employant différentes sources de matières premières renouvelables telles que les boues d'eaux usées a été démontrée dans le passé. Tyagi *et al.* (2002) ont démontré qu'une souche de *Bacillus* sp. produit des enzymes protéolytiques et que certaines espèces de *Bacillus thuringiensis* produisent un métabolite secondaire qui peut être utilisé en tant qu'insecticide. Il a également été démontré que les champignons peuvent produire certaines enzymes (Szekeres *et al.*, 2004). Les eaux usées et les BEU sont riches en éléments nutritifs tels que le carbone, l'azote, le potassium (Barnabé *et al.*, 2003) et peuvent supporter la croissance de divers microorganismes pour produire beaucoup de bioproduits intéressants.

1.2.5.1 Les boues d'eaux usées domestiques

Le *Clean Water Act* de 1977, réglemente la façon dont les municipalités doivent traiter et rejeter les eaux usées pour qu'il n'y ait aucun risque pour l'environnement aux États-Unis. Lorsque les eaux usées sont traitées, un sous-produit semi-solide et riche en nutriment est produit et connu sous le nom de boue. Historiquement appelé, boue d'épuration, on le nomme maintenant biosolides pour souligner la nature recyclable de ce matériau, principalement pour l'usage en l'agriculture (Walker, 1998). Ils contiennent habituellement 93 à 99 pour cent d'eau, en plus des solides et des substances dissoutes dans l'eau usée ou ajoutée pendant le processus de traitement des eaux usées.

Dans les usines de traitement des eaux usées (UTEU), avant d'être rejetées dans l'environnement, les eaux usées subissent un traitement préliminaire, un primaire, un secondaire et dans certains cas, un tertiaire (Bastian, 1997). La quantité et les caractéristiques des boues produites dépendent de la composition des eaux usées, du type de traitements appliqué aux boues. Même au sein d'une même usine, les caractéristiques des boues produites peuvent changer annuellement, de façon saisonnière, ou même quotidiennement en raison des variations du produit entrant et des traitements que subissent les eaux usées (Metcalf et Eddy, 2003).

Le traitement et la gestion des boues d'épuration posent des problèmes économiques et environnementaux considérables. C'est un problème croissant dans le monde entier puisque la production de boues continue à augmenter et que de nouveaux standards de qualités environnementaux plus strictes sont établis. Avec certains traitements traditionnels arrivant à saturation, et que le rejet à la mer ne peut plus être utilisé, le défi des gestionnaires de traitements des boues est de trouver des solutions rentables et innovatrices tout en répondant aux règles environnementales. La réutilisation et l'utilisation des BEU sont les options privilégiées par le développement durable.

Au Canada, 387 166 tonnes de BEU sèches sont produites annuellement au cours du traitement des eaux usées municipale et industrielle. À cause de l'accumulation de boues et l'augmentation de la population dans les prochaines années, le Canada fera face à un problème important de production toujours croissante de BEU qui est habituellement rejeté dans des secteurs préétablis (Barnabé *et al.*, 2003). La pratique actuelle est d'en disposer avec d'autres déchets solides dans des sites d'enfouissement ou par rejet direct dans des fossés peu profonds (Zain *et al.*, 2001). Cependant, en raison des quantités limitées de terres agricoles et de l'augmentation rapide de la production de boues, des traitements devront être mis sur pieds pour être conformes aux normes environnementales et ceci est l'un des défis majeurs auquel fait face le gouvernement canadien. L'utilisation des BEU en tant que matière première pour en faire des produits à valeurs ajoutées tel que des biopesticides, des biofertilisateurs, des bioplastiques et des enzymes est une approche de développement durable en ce qui a trait à la gestion des BEU (Barnabé, 2007).

Le traitement des eaux usées municipales a comme conséquence la production de grandes quantités de boues qui doivent être disposées d'une façon à respecter l'environnement. Les modes de gestions de rejet des boues actuels, à savoir l'enfouissement, l'incinération et leur

utilisation sur des terres agricoles comportent des inconvénients multiples et montrent un manque dans la gestion durable des BEU municipales. Le recyclage des boues a été stimulé par la démonstration qu'elles peuvent être utilisées en tant que milieu de culture peu coûteux intéressant. Les boues, désignées par le terme biosolides par l'agence de protection de l'environnement des États-Unis, serviront de matière première pour développer de nouveaux procédés pour la production de divers produits à valeur ajoutée comme des briques, des adsorbants, des bioplastiques, des biosurfactants, des biopesticides, des enzymes, etc. (Tay et Show, 1992; Pan et Tseng, 2001; Tyagi *et al.*, 2002).

Il y a un intérêt croissant en recherche pour des matières premières à haut rendement présentes en grandes quantités et qui sont rentables en tant que substrat de fermentation. Beaucoup de déchets/sous-produits ont été étudiés afin de produire des biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* (Tirado-Montiel *et al.*, 2001). L'utilisation du BEU comme matière première pour la production de Bt a beaucoup d'avantages, entre autres, une entomotoxicité plus élevée avec une basse concentration en spores, un bas coût pour la matière première, une entomotoxicité plus élevée de la protéine cristallisée que celle produite à partir d'un milieu synthétique, en plus d'une basse variabilité dans les nutriments des boues pour la culture de *Bacillus thurengiensis*, une disponibilité continue du substrat et une contribution significative vers le développement durable (Sachdeva *et al.*, 2000; Barnabé, 2004; Yezza *et al.*, 2005).

Figure 2. Plan d'une usine de traitement des eaux usées de la région de Québec (CUQ).

Tyagi *et al.* (2002) ont étudié la production simultanée de biopesticides et de protéases à partir de *B.thurengiensis* utilisant un milieu synthétique et des eaux usées comme matière première. Les études ont été réalisées dans des erlenmeyers sous agitation et dans des fermenteurs d'une capacité de 15 L. Le dosage des spores, de l'entomotoxicité et de l'activité protéase présente dans le biopesticide a été réalisé. Une plus grande quantité de spores et de protéases étaient produites dans le milieu synthétique à base de soya, mais une meilleure entomotoxicité ainsi qu'une meilleure activité protéase a été démontré dans les BEU. Les BEU sont une meilleure matière première que le milieu commercial de soja pour la production de biopesticides et d'enzymes. L'activité maximale d'entomotoxicité et de protéase observée dans le fermenteur était de 9332 IU/ μ L et 4.58 IU/ml, respectivement. Les protéases produites par *B. thuringiensis* ont également été caractérisées. Deux types de protéases ont été détectés, les protéases neutres avec un pH optimal se situant près de 7 et les protéases alcalines avec un pH optimal se situant entre 10 et 11. De plus, deux autres types de protéases alcalines ont été détectés, une ayant un pH optimal de 10 et une température optimale de 50°C, tandis que l'autre avait un pH optimal de 11 et une température optimale de 70°C. La stabilité thermique de cette protéase a augmenté en présence de CaCl₂, ce qui indique qu'il s'agit d'une métalloprotéase.

Yezza *et al.* (2006) ont étudié la production de *Bacillus thuringiensis* en employant les BEU à différentes concentrations en solides totaux comme matière première dans des fermenteurs de table. La quantité de spores et l'entomotoxicité étaient meilleures lorsque les boues étaient composées de 20 à 25 g/L de solide en suspension. L'activité protéase maximale augmente également avec la concentration en solides, cependant, elle a diminué après avoir atteint une valeur maximale après environ 36 H. L'activité protéase maximale (2.3-2.8 IU/ml) obtenue à 25 et 20 g/L de solides en suspension dans les boues était 1.75 et 1.5 fois plus élevés que l'activité maximale obtenue à 15 g/L. Indépendamment de la concentration des boues en solides en suspension, l'activité protéase (jusqu'à son maximum) a montré un rapport exponentiel avec le compte total de cellules et un rapport linéaire avec le pouvoir d'entomoxité. Une corrélation exponentielle a été également établie entre la concentration en spore et l'entomotoxicité. Les corrélations examinées en utilisant un modèle de régression étaient fortement significatives.

Drouin *et al.* (2007) ont démontré que les BEU peuvent être un milieu approprié pour supporter la croissance et la production de protéase par le *B. licheniformis*. En fait, l'activité protéolytique

était comparable lors de la fermentation des boues et du milieu synthétique conventionnel dans les fermenteurs. Les caractéristiques des boues, spécifiquement les nutriments présents, jouent un rôle important dans la performance du procédé. La concentration de solides en suspension des boues ne peut être augmentée indéfiniment. Des boues contenant beaucoup de solides en suspension contribuent à la réduction de l'activité enzymatique due à l'inhibition par le substrat ou à la faible capacité du milieu de culture à faire le transfert d'oxygène dû à la haute viscosité des boues à cette concentration (Brar *et al.*, 2004).

Meunier *et al.* (1999) ont testé différentes souches pour la production des protéases alcalines en utilisant les BEU et Chenel *et al.* (2008) ont évalué les différentes conditions optimales pour la production des protéases thermostables par des souches thermophiles isolées d'échantillons de boue d'épuration et de BEU en utilisant des boues secondaires comme matière première.

1.2.5.2 Composition typique des boues d'épuration

Les BEU sont produites par le traitement des eaux d'égout ou des eaux usées industrielles et agricoles. Le présent travail sera effectué sur des boues d'épuration qui sont obtenues à partir d'usine de traitement des eaux usées. Les différentes sources d'eau de cette usine sont l'eau usée d'égout, donc qui provient de débordements suite à des tempêtes, d'eaux usées résidentielles, commerciales et parfois industrielles. Dans ce type d'usine, les eaux usées subissent généralement le criblage, la filtration, le traitement primaire et les traitements secondaires qui sont des traitements à caractère physique, biologique et/ou chimique. Après les traitements primaires et secondaires, les résidus plus concentrés en solides que l'eau usée à l'entrée de l'usine (solides en suspensions, dépôts, sédiments et masses visqueuses) sont considérés comme des boues. Les BEU contiennent une charge organique comportant des éléments dissouts et suspendus (le carbone sous forme de polymères tels que l'amidon ou sous forme monomérique telle que le glucose, l'azote contenu dans l'ammonium ou des les acides aminés et dans des polymères tels que des protéines) et des éléments inorganiques (P, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Al^{3+} et S). Ces éléments inorganiques sont la plupart du temps contenus dans des molécules organiques de cellule vivante, de fragments de cellules ou de matrice extracellulaire. La charge organique contient également des oligoéléments tels que le Cd, le Cr, le Mo, le Ni, le Pb, etc. et certains facteurs de croissance tels que des vitamines. Les facteurs principaux influençant la composition et la charge organiques de BEU sont : (i) la configuration et

l'emplacement de l'usine; (ii) la population desservie et les activités générales ou spécifiques qui y sont réalisées (domestique, touristique et agricole (iii) la nature et le contenu des effluents industriels relâchés dans les égouts peuvent changer selon les activités de ces industries (c'est-à-dire la charge industrielle des eaux usées) ; (iv) les variations saisonnières du traitement des eaux usées provoqué par la pluie, la fonte de la neige, les inondations, le sel qui est utilisé sur les routes l'hiver, les feuilles tombées; (v) la variation quotidienne et annuelle de charge organique et inorganique dans l'affluent; (vi) le type de traitement d'eaux usées primaire et secondaire aussi bien que les conditions climatiques; (vii) le traitement et l'âge des boues ainsi que les conditions de manipulation et de stockage des boues.

Le potentiel nutritif des boues d'épuration est lié à sa charge organique. La charge organique vient des excréments humains et contient un mélange complexe de polysaccharides (sucres, cellulose, lignine), d'azote (des protéines et des acides aminés), d'azote inorganique (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-), de phosphore organique et inorganique (PO_4^{3-}), de graisses (pétroles, lipides et acides gras), de métaux ainsi que de matériaux humiques, fulviques et lignocellulosiques. Les composantes organiques peuvent être dégradées chimiquement par des processus abiotiques comme l'hydrolyse, la biodégradation et la volatilisation. Une grande proportion de ce matériel organique est sous forme de micro-organismes, soit morts ou vivants (bactéries, virus, protozoaires ou d'autre), unicellulaires ou sous forme de floccs, et comporte une grande surface de contact pour l'adsorption des résidus organiques hydrophobes. L'adsorption de ces composants organiques sur les micro-organismes ou sur les particules de boues peut réduire leur dégradation et les rendre moins accessibles aux micro-organismes actifs. À l'exception du nickel, qui est très soluble, très peu de métaux sont retrouvés dissous dans les boues. Normalement, ils sont sous forme de sulfites, d'oxydes, d'hydroxydes, de silicates, de phosphate, de carbonates insolubles et de sels. Ils peuvent être adsorbés ou également associés à la matière organique des boues. La distribution des métaux dépend du pH, de la température, du potentiel d'oxydation/réduction ainsi que de la présence des ligands et des minéraux. Finalement, les boues municipales contiennent différentes fractions d'eau parmi lesquelles l'eau interstitielle peut facilement être retirée par sédimentation; l'eau emprisonnée dans les floccs de boues qui peut être libérée par une force mécanique; l'eau attachée aux particules par les forces capillaires; l'eau attachée aux particules qui peut être seulement retirée par l'utilisation de produits chimiques ou lorsque la particule est brisée (lyse des cellules microbiennes).

1.2.5.3 Caractéristiques des boues

Les boues d'UTE sont constamment contaminées avec plusieurs polluants biodégradables et récalcitrants ainsi qu'avec beaucoup de différents microbes pathogènes. Les boues peuvent être divisées en boues non traité, primaire et secondaire (après traitement biologique). Les boues primaires ont une odeur particulière, comportant des solides et des microbes pathogènes, et peuvent rarement être étalées sur des terres sans traitement antérieur. Les boues secondaires sont composées de produits organiques, de microbes pathogènes et en raison de sa nature liquide, possèdent de plus grands risques pour la santé humaine. Les boues peuvent être caractérisées en termes de leur composition physique, chimique et biologique. Les propriétés physiques principales sont l'odeur, la couleur et la quantité de solides dissouts. Les constituants chimiques comportent des produits organiques dont des hydrates de carbone, des graisses, des hydrocarbures, des pesticides, des phénols, des protéines, des polluants, des agents tensio-actifs, des composés organiques volatils et des matériaux organiques dégradés. Les composants inorganiques principaux sont les chlorures, les métaux lourds, l'azote, le phosphore, le soufre et les polluants tels que le sulfate de fer, les sulfates d'aluminium, etc. Les composantes gazeuses principales sont l'hydrogène, le méthane et l'ammoniaque. Les principaux constituants biologiques sont la matière végétale, les protistes comme les eubactéries, les archaebactéries et les virus (Metcalf and Eddy, 2003). Les contaminants importants qui sont concernés sont de grandes quantités de solides en suspension, les contaminants récalcitrants, les microbes pathogènes, les nutriments comme l'azote, le phosphore, les métaux lourds et dans certains cas, les composés inorganiques dissous qui peuvent empêcher la réutilisation des boues dans un système de revalorisation des boues. Ces contaminants font en sorte que le traitement doit être constitué d'étapes additionnelles de traitement préparatoire afin de structurer les boues avant leur conversion en produit à valeur ajoutée.

Cependant, toutes ces étapes de transformation peuvent être négligées quand le produit final a une valeur économique supérieure à la matière première et que le processus en entier nous aide à trouver des techniques pour revaloriser et recycler les déchets.

Beaucoup d'efforts ont été mis à l'amélioration de ces techniques holistiques, intégrées, qui apporte un bénéfice net et qui respecte l'environnement. Les objectifs de maximiser la

réutilisation/recyclage des ressources ont pu être vus comme de très bonnes initiatives pour faire avancer le développement durable.

1.2.6 L'isolement et la purification des protéases alcalines

À l'échelle industrielle, la considération primordiale des enzymes destinées à des fins commerciales est le coût de production par rapport à la valeur du produit final. Les préparations brutes de protéases alcalines sont généralement employées à des fins commerciales. Dans le but de développer une meilleure compréhension du fonctionnement de l'enzyme, la purification des protéases alcalines est importante (Takagi, 1993).

1.2.6.1 Récupération

Après une bonne fermentation, le milieu de fermentation des feuilles de l'environnement est exposé à un changement radical dans les conditions environnementales. L'élimination des cellules, des solides et des colloïdes du bouillon de fermentation est la première étape de transformation en aval des enzymes. Des filtres à tambour à rotation sous vide et des centrifugeuses continues à disque sont couramment utilisés. Pour éviter les pertes de l'activité enzymatique causée par la clarification ou empêcher le colmatage des filtres, il est nécessaire d'effectuer quelques prétraitements chimiques du bouillon de fermentation avant le début de la séparation (Aunstrup, 1980; Mukhopadhyay *et al.*, 1990). Les changements de pH peuvent aussi être appropriés pour une meilleure séparation des matières solides (Tsai *et al.*, 1983). En outre, le bouillon de fermentation des solides est souvent colloïdal dans la nature et est difficile à enlever directement. Dans ce cas, l'ajout de coagulants ou flocculants devient vital (Boyer et Byng, 1996). Des agents de floculation sont généralement employés pour effectuer la formation de flocs plus ou agglomérés, qui, à son tour, permet d'accélérer la séparation solide-liquide. La cellule de floculation (Bautista *et al.*, 1986) peut être améliorée par la neutralisation des charges sur la surface des cellules microbiennes, qui comprend les modifications de pH et l'ajout d'une série de composés qui modifient l'environnement ionique. Les agents de floculation, couramment utilisés sont des sels inorganiques, les hydrocolloïdes minérales, et polyélectrolytes organiques. Par exemple l'utilisation d'un polyélectrolyte Sedipur TF 5 s'est avéré un agent efficace de floculation (à 150 ppm et à un pH qui varie entre 7,0 et 9,0) et a donné un rendement de 74% de l'activité de la protéase alcaline (Sitkey *et al.*, 1992). Dans certains cas, il devient nécessaire

d'ajouter un filtre à l'aide des bioprocédés, comme la terre de diatomées, avant la filtration (Boyer and Byng, 1996; Tsuchida *et al.*, 1986).

1.2.6.2 Concentration

Vu que la quantité d'enzyme présente dans la cellule libre du filtrat est généralement faible, l'évacuation des eaux est un objectif primordial. Récemment, les procédés de séparation par membrane ont été largement utilisés pour le traitement en aval (Strathmann, 1990). Par exemple, l'ultrafiltration est un procédé à membrane qui a été largement utilisé pour la récupération des enzymes (Bohdziewicz et Bodzek, 1994; Bohdziewicz, 1996; Takac *et al.*, 2000) et constitue une méthode préférée par rapport à la technique conventionnelle d'évaporation. Ce processus est coûteux et offre une purification et une concentration (Sullivan *et al.*, 1984), aussi bien que la diafiltration, laquelle est utilisée principalement dans le cas où l'on désire obtenir un rétentat purifié, exempt de petites molécules telles que sucres et sels, éliminées dans le perméat (Boyer et Byng, 1996). Toutefois, un inconvénient qui sous-tend ce processus est l'encrassement ou le colmatage des membranes en raison du précipité qui se forme par le produit final. Cette obstruction peut généralement être atténuée ou surmontée par un traitement avec des détergents, des protéases, ou des acides et des alcalins.

Han *et al.* (1995) a utilisé une ultrafiltration sensible à la température hydrogel pour concentrer une protéase alcaline. Cet hydrogel composé de poly (N-isopropylacrylamide), qui a changé son volume de façon réversible par les changements de température. L'efficacité de séparation de l'enzyme dépend de la température et de 84% à des températures de 15°C et 20°C. Cependant, à des températures supérieures à 25°C, une diminution de l'efficacité de la séparation a été observée.

1.2.6.3 Précipitation

La précipitation est la méthode la plus couramment utilisée pour l'isolation et la récupération des protéines à partir d'un mélange biologique brut (Bell *et al.*, 1983). Le processus fait également intervenir deux étapes de purification et de concentration. Il est généralement affecté par l'ajout de réactifs tels que le sel ou un solvant organique, ce qui réduit la solubilité des protéines désirées dans une solution aqueuse. Bien que la précipitation par le sulfate d'ammonium ait été utilisée pendant de nombreuses années, elle ne représente pas l'agent de précipitation de choix pour les enzymes de détergent. Le sulfate d'ammonium a été plus utilisé à des valeurs de pH

acides et neutres il se développe en ammoniac dans des conditions alcalines (Aunstrup, 1980). Par conséquent, l'utilisation du sulfate de sodium ou un solvant organique a été le choix préféré. Malgré une meilleure qualité de précipitation de sulfate de sodium sur le sulfate d'ammonium, la faible solubilité du sel à basse température restreint son utilisation à cette fin (Shih *et al.*, 1992).

De nombreux rapports ont révélé l'utilisation de l'acétone à une concentration de volume différent: 05:03 volumes (Tsujibo *et al.*, 1990, Kim *et al.*, 1996), et de 2:5 volumes (Kumar, 1997), comme agent de précipitation primaire pour la récupération des protéases alcalines. Les précipitations ont été également rapportées par les divers intervenants à différentes concentrations d'acétone: 80% (v/v) (Kwon *et al.*, 1994), 66% (v/v) (Yamagata *et al.*, 1995), ou 44, 66, et 83% (v/v) (El-Shanshoury *et al.*, 1995), suivie d'une centrifugation et/ou séchage. La précipitation des enzymes peuvent aussi être obtenus par l'utilisation des solubles dans l'eau, des polymères neutres tels que le polyéthylène glycol (Larcher *et al.*, 1996).

1.2.6.4 Chromatographie échangeuse d'ions

Les protéases alcalines sont généralement chargées positivement et ne sont pas liées à des échangeurs d'anions (Tsai *et al.*, 1983; Kumar, 1997; Fujiwara *et al.*, 1993). Cependant, des échangeurs de cations peuvent être un choix rationnel et les molécules liées sont éluée de la colonne par l'augmentation du sel ou d'un gradient de pH.

1.2.6.5 Chromatographie d'affinité

Des rapports sur la purification des protéases alcalines par différentes méthodes d'affinités chromatographiques ont montré que l'hydroxyapatite est un adsorbant d'affinité qui a été utilisée pour séparer la protéase neutre (Keay et Wildi, 1970) ainsi que pour purifier la protéase alcaline de *Bacillus* sp. (Kobayashi *et al.*, 1996). Toutes les autres matrices d'affinité aprotinine-agarose (Petinate *et al.*, 1999), et de la caséine-agarose (Hutadilok-Towatana *et al.*, 1999), ou la phénylalanine N-benzoyloxycarbonyl sont immobilisées sur l'adsorbant agarose (Larcher *et al.*, 1996). Toutefois, les principales limites de la chromatographie d'affinité sont le coût élevé des enzymes et la nature labile de certains ligands d'affinité, ce qui les rend un recommandable à utiliser comme une échelle de processus (Gupta *et al.*, 2002a).

1.2.6.6 Système aqueux à deux phases

Cette technique a été appliquée pour la purification des protéases alcalines utilisant un mélange de polyéthylène glycol (PEG) et le dextran ou PEG et des sels tels que H_3PO_4 , $MgSO_4$ (Sharma *et al.*, 1994; Sinha *et al.*, 1996; Hotha et Banik, 1997). En outre, d'autres méthodes, telles que l'utilisation de micelles inverses pour l'extraction liquide-liquide (Rahman *et al.*, 1988), la précipitation par affinité, (Pecs *et al.*, al 1991), le fractionnement et la mousse (Banerjee *et al.*, 1993) ont également été employées pour le recouvrement des protéases alcalines.

1.2.6.7 Stabilisation

Les préparations enzymatiques utilisées dans le commerce sont impures et sont normalisées à des niveaux d'activité par l'adjonction de diluants et des transporteurs.

En outre, les conditions pour une stabilité maximale des préparations brutes peuvent être très différentes de celles des enzymes purifiées, L'expédition au client (s) et la stabilité de stockage ou d'entreposage dans les installations du client est une préoccupation majeure pour les fabricants d'enzymes parce que la perte d'activité est rencontrée lors du stockage dans l'usine. Les solutions de protéase sont soumises à la dégradation protéolytique et autolytique qui entraîne l'inactivation rapide de l'activité enzymatique. Afin de maintenir l'activité de l'enzyme et d'assurer la stabilité, l'ajout de stabilisants comme les sels de calcium, formiate de sodium, le borate, le propylène glycol, la glycérine ou la bétaine polyalcools, préparations de protéines et des composés apparentés a été couronné de succès (Eilertson *et al.*, 1985; Weijers et Van't, 1992). Aussi, pour prévenir la contamination de la préparation finale brut commercial pendant le stockage, l'ajout de chlorure de sodium à 18-20% de concentration a été suggéré (Aunstrup, 1980; Shetty *et al.*, 1993). La manipulation des enzymes secs présente un danger potentiel pour la santé et, par conséquent, il est nécessaire de maintenir les préparations enzymatiques sous forme liquide stable. La stabilisation des protéases alcalines et/ou subtilisines a également été rendue possible grâce à l'utilisation de l'ingénierie des protéines et de nombreux exemples ont été cités dans la littérature. Les piles alcalines et la stabilité thermique des BPN9 subtilisine ont été améliorées par mutagenèse aléatoire suivie par l'application de tests de dépistage appropriés (Cunningham et Wells, 1987). La mutagenèse dirigée est souvent basée sur des stratégies spécifiques de la conception de protéines, compris le changement de potentiel électrostatique (Pantaliano *et al.*, 1987; Erwin *et al.*, 1990), l'introduction de ponts disulfures (Mitchinson et

Wells, 1989; Takagi *et al.*, 1990), le remplacement de l'oxydation des résidus labiles (Estell *et al.*, 1985), la modification des interactions entre les chaînes latérales (Braxton et Wells, 1991), l'amélioration des emballages intérieurs (IMANAKA *et al.*, 1986), le renforcement des ions métalliques de liaison (Pantaliano *et al.*, 1988), la réduction dans le déroulement entropie (Pantaliano *et al.*, 1989) la substitution des résidus 1989;), ou la suppression fondée sur l'homologie (Takagi *et al.*, 1992b; Vonder *et al.*, 1993) et la modification de la spécificité de substrat (Takagi *et al.*, 1997).

1.2.7 Propriétés des protéases alcalines

Les propriétés enzymatiques et physico-chimiques des protéases alcalines de plusieurs microorganismes ont été étudiées en profondeur.

1.2.7.1 Température et pH optimal

Le pH optimum de protéases alcalines est généralement compris entre 9 et 11 à quelques exceptions près où le pH est supérieur à 11.5 (Yum *et al.*, 1994; Takami *et al.*, 1990; Gessesse *et al.*, 2003), pH entre 11 et 12 (Kumar, 1997; Tang, 2004), et le pH entre 12 et 13 (Fujiwara *et al.*, 1993).

Ils ont également des points isoélectriques élevés et sont généralement stable entre pH 6 et 12. Les températures optimales de protéases alcalines se situent entre 50°C et 70°C. En outre, l'enzyme à partir d'un *Bacillus* sp. alcalophile B18 a montré une température optimale exceptionnellement élevée de 85°C. Les protéases alcalines de *B. laterosporus*-AK1 sont assez stables à haute température de 75°C (Arulmani *et al.*, 2006) et l'ajout de Ca^{2+} améliore plus la thermostabilité des enzymes.

1.2.7.2 Masse moléculaire

Les masses moléculaires des protéases alcalines vont de 15 à 30 kDa (Kumar et Takagi 1999) avec quelques rapports de masses moléculaires plus élevés de 31,6 kDa (Freeman *et al.*, 1993), 33 kDa (Larcher *et al.*, 1996), 36 kDa (Tsujiro *et al.*, 1990., Nilegaonkar *et al.*, 2007; Reddy *et al.*, 2008a) et 45kDa (Kwon *et al.*, 1994; Nilegaonkar *et al.*, 2007). Toutefois, une enzyme de *Kurthia spiroforme* avait un poids moléculaire extrêmement faible de 8 kDa (Steele *et al.*, 1992). Dans certains *Bacillus* sp. de multiples formes électrophorétiques des protéases alcalines ont été observées (Kumar, 1997; Kobayashi *et al.*, 1996). Les multiples formes de ces enzymes ont été

le résultat d'une réaction non enzymatique, irréversible désamination de la glutamine ou asparagine résidus dans les molécules de protéines, ou d'autoprotolyses (Kobayashi *et al.*, 1996).

1.2.7.3 Exigence des ions métalliques et des inhibiteurs

Les protéases alcalines nécessitent un cation divalent comme Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou une combinaison de ces cations pour avoir une activité maximale. Ces cations ont également été trouvés pour améliorer la stabilité thermique d'une protéase alcaline de *Bacillus* (Paliwal *et al.*, 1994; Nascimento et Martins, 2004). Ces cations protègent l'enzyme contre la dénaturation thermique et jouent un rôle vital dans le maintien de la conformation active de l'enzyme à des températures élevées (Pan et Lin, 1991). En outre, des sites de liaison du Ca^{2+} qui influencent sur l'activité des protéines et la stabilité en dehors du site catalytique ont été décrites pour la protéinase K (Bajorath *et al.*, 1988). Les études d'inhibition permettent de mieux comprendre la nature de l'enzyme, la nécessité d'un cofacteur et la nature du site actif (Sigma et Moser, 1975). Dans certaines études, l'activité catalytique a été inhibée par les ions Hg^{+2} (Shimogaki *et al.*, 1991). À cet égard, l'effet inhibiteur d'enzymes par des ions de métaux lourds a été bien documenté dans la littérature (Vallée et Ulmer, 1972).

Les protéases alcalines sont complètement inhibées par le fluorure de PMSF et DFP. À cet égard, PMSF sulfonates est le résidu de sérine essentielle dans le site actif qui entraîne la perte complète de l'activité (Tang, 2004; Joshi *et al.*, 2007). Ce profil d'inhibition classe ces protéases comme la sérine hydrolases (Moriyama, 1974). En outre, certaines des protéases alcalines ont été trouvées à des ions métalliques à charge en raison de leur sensibilité aux agents chélateurs métalliques, tels que l'EDTA (Dhandapani et Vijayaragavan, 1994 al; Shevchenko *et al.*, 1995). Les inhibiteurs de thiol ont peu d'effet sur les protéases alcalines de *Bacillus* sp., bien qu'ils ne touchent les enzymes alcalines produites par *Streptomyces* sp. (Yum *et al.*, 1994; El-Shanshoury *et al.*, 1995).

1.2.7.4 La spécificité du substrat

Bien que les protéases alcalines soient actives contre de nombreux substrats synthétiques ainsi que des protéines natives, les taux de réaction sont très variables. Les protéases alcalines et subtilisines sont plus actives contre la caséine que contre l'hémoglobine ou l'albumine sérique bovine. Les protéases alcalines sont spécifiques contre les résidus aromatiques ou les résidus d'acides aminés hydrophobes comme la tyrosine, la phénylalanine, la leucine ou sur le côté

carboxyle du point de clivage, ayant une spécificité similaire, mais moins rigoureux qu'un chymotrypsine (Moriyama, 1974). Avec la β -chaîne de l'insuline comme substrat, les liens les plus fréquemment coupés par un certain nombre de protéases alcalines étaient Glu 4 - Sa 5, Ser 9 - Sa 10, 15-Leu Tyr 16, Tyr 16-Leu 17, 25-Phe Tyr 26, Tyr 26-Thr 27 et Lys 29-Ala 30 (Yamagata *et al.*, 1995; Larcher *et al.*, 1996; Peek *et al.*, 1992; Tsuchiya *et al.*, 1993). En outre, Tsai *et al.* (1984) élucide qu'une élastase alcaline de *Bacillus* sp. Ya-B clive les chaînes oxydées α -et β de l'insuline dans un bloc de manière coupée. Tsai *et al.* (1984) ont observé l'élastase alcaline de *Bacillus* sp. Ya-B a également hydrolysé les substrats spécifiques élastine et l'élastase comme la succinyl-Ala-p-nitroanilide et succinyl-Ala-Pro-Ala-p-nitroanilide à un rythme plus rapide. Cette enzyme a montré une préférence pour les résidus d'acides aminés aliphatiques, tels que l'alanine, qui est présent dans l'élastine. Il est considéré que l'élastolyse a été initié par la formation d'un complexe enzyme-substrat grâce à une interaction électrostatique entre les résidus chargés positivement de l'élastase et les résidus chargés négativement de l'élastine dans une gamme de pH ci-dessous 10,6 (Tsai *et al.*, 1984). Dans la kératine, les ponts disulfures forme un élément structurel important qui permet de prévenir la dégradation protéolytique des zones les plus compacts des substrats kératiniques. Une protéase alcaline thermostable forme un *Bacillus* sp alcalophile. no. AH-101 présentant une activité kératinolytique a montré la dégradation de la kératine des cheveux humains avec de l'acide thioglycolique 1% à pH 12 et 70°C, et les cheveux sont solubilisés dans 1 h (Takami *et al.*, 1992). De même, la dégradation de la kératine renforcée après l'ajout de la TNT a également été rapportée pour les protéases alcalines de *Streptomyces* sp. (Al Bockle *et al.*, 1995; Sinha *et al.*, 1991).

1.3 HYPOTHÈSES, OBJECTIFS ET ORIGINALITÉ

1.3.1 Hypothèses

Le respect de l'environnement, la gestion et l'élimination complète des boues d'épuration constitue un sujet de préoccupation considérable. Les techniques de traitement classiques avancées telle que la filtration sur membrane, la floculation, l'adsorption et les traitements chimiques ne sont pas capables d'éliminer complètement les contaminants des eaux usées et des boues d'épuration (Eljarrat *et al.*, 2001; Lorain *et al.*, 2001; Oudeh *et al.*, 2002). Il existe des travaux de recherche, qui se sont focalisés sur les techniques de bioconversion durables non-

dangereux, et respectant l'environnement (Cameron *et al.*, 2000) afin de trouver une solution à ce problème. Les traitements biologiques s'avèrent être des moyens prometteurs, respectant l'environnement et assurant une bonne dégradation des contaminants environnementaux (Colwell, 1994; Desai et Banat, 1997). Ces processus doivent être pris en considération pour le traitement des eaux usées et des boues d'épuration. En outre, la boue d'épuration est l'une des sources nutritives pour les micro-organismes (Mohammedi *et al.*, 2006).

En tenant en compte des questions ci-dessus et de la revue de la littérature, les faits suivants sont considérés pour formuler la première hypothèse. Selon les données de la littérature, le développement d'une culture sur un substrat peu coûteux est indispensable, pour produire la protéase alcaline à grande échelle. Dans le contexte des substrats peu coûteux, les boues issues des eaux usées domestiques, semblent être une proposition viable. L'application des boues comme substrat de fermentation a été trouvée potentiellement utile pour les procédés biotechnologiques (Lourdes *et al.*, 2001; Alam *et al.*, 2003; Lachhab *et al.*, 2001; Jamal *et al.*, 2005; Barnabé *et al.*, 2003; Tyagi *et al.*, 2002). Cela pourrait conduire à une baisse du coût de la production d'enzymes.

En ce qui concerne l'utilisation des boues d'épuration comme matières premières, de nombreux chercheurs (Lourdes *et al.*, 2001; Alam *et al.*, 2003; Lachhab *et al.*, 2001; Jamal *et al.*, 2005; Barnabé *et al.*, 2003; Tyagi *et al.*, 2002; Yezza *et al.*, 2006) ont montré que les boues des eaux usées domestiques peuvent être utilisées comme matières premières pour la production de produits à valeur ajoutée tels que les acides organiques, le carburant, les biosolides, les biopesticides, les engrais biologiques, les protéases ou de nombreux types de biocatalyseurs. Prochainement, les procédés de fermentation utilisant les boues comme matière première pourraient être développés pour la production de plusieurs produits biotechnologiques. En tenant compte de ces faits, la première hypothèse est la suivante:

Hypothèse 1: La production de protéase par des souches de *Bacillus* à partir des boues des eaux usées domestiques pourrait avoir des retombées économiques dans certaines industries. En outre, les faits suivants sont considérés pour formuler la deuxième et la troisième hypothèse. Dans ces dernières années, les chercheurs se sont focalisés sur l'application de l'approche de la bioconversion de substrat liquide pour optimiser la composition du processus de traitement des boues d'épuration. Le succès d'un processus microbien dépend de la présence du microorganisme

approprié en tenant compte des conditions environnementales (Boopathy, 2000). Les milieux de culture de microorganismes n'entraînent pas seulement une augmentation de la production de biomasse, mais stimulent aussi la synthèse des enzymes (Zhu *et al.*, 1996). L'application de la bioconversion du substrat liquide à l'aide des micro-organismes sélectionnés pour le traitement des boues des eaux usées domestiques aurait besoin d'un supplément de divers nutriments pour la croissance et la production de la protéase par ces micro-organismes. Les teneurs de carbone et d'azote qui doivent être ajoutés dans le cas des traitements à grande échelle pourraient probablement être prédits à partir des résultats des études à petite échelle.

Lorsque les enzymes sont isolées à l'échelle industrielle à des fins commerciales, la première considération à prendre en compte est le coût de production par rapport à la valeur du produit final. Les extraits bruts de protéases alcalines sont généralement employés à des fins commerciales. Les applications industrielles de la protéase comme l'industrie des détergents nécessitent des enzymes concentrées et propres afin d'obtenir de meilleures performances durant le stockage et l'application. L'enzyme est plus propre lorsque le milieu est simple et défini, ce qui n'est pas le cas des enzymes produits dans les boues. Ces enzymes contiennent de nombreuses particules de boue et autres impuretés. La concentration et la clarification des enzymes pourraient donner une plus grande activité. La récupération de l'enzyme qui pourrait être faite par ultrafiltration. La caractérisation des enzymes partiellement purifiées de *B. licheniformis* pourrait être faite par des méthodes différentes. L'efficacité de l'enzyme sécrétée par la souche *B. licheniformis* souche pourrait être comparée avec celle des détergents commerciaux.

Par conséquent, en se basant sur ces faits, la deuxième et la troisième hypothèse sont les suivantes:

Hypothèse 2: Il est connu que la croissance de micro-organismes dépend principalement des éléments nutritifs (sources de carbone, sources d'azote, etc.). L'utilisation de boues d'épuration comme milieu de culture riche en carbone et en azote pourrait renforcer sensiblement la production de la protéase.

Hypothèse 3: Sachant que la protéase produite par *B. licheniformis* serait compatible avec différents détergents commerciaux testés, elle pourrait être utilisée comme additif dans les détergents pour vérifier la contribution de l'enzyme dans l'amélioration de la performance de

lavage du détergent. L'ajout de cette protéase dans les détergents pourrait améliorer sensiblement les performances de nettoyage des taches de sang.

1.3.2 Objectifs

L'objectif principal de ce travail de recherche est de tester la production de la protéase dans un milieu synthétique de soja et un milieu de boue par différentes souches *B. licheniformis*. L'utilisation de différentes souches *B. licheniformis* permet de sélectionner la souche la plus appropriée pour la production de protéase alcaline. L'effet de l'ajout de sources de carbone et d'azote dans les boues est également étudié afin d'avoir une production maximale de protéase alcaline dans les boues fermentées par la souche préalablement criblée *B. licheniformis* ATCC 21424. En outre, il est proposé d'étudier la récupération et la caractérisation de la protéase alcaline suivie d'une évaluation de l'application de cette enzyme dans l'industrie des détergents.

En se basant sur les hypothèses mentionnées ci-dessus, les objectifs spécifiques du travail sont les suivants:

1. L'isolement et le criblage de nouvelles souches fortement productrices de protéase à partir d'échantillons collectés à partir des eaux usées, des lacs, des rivières, des sols, et d'abattoir (matière organique).
2. Production de la protéase en fermenteur par certaines souches prometteuses (B2, B4, B11, B12 et B15) et la comparaison avec des souches de *B. licheniformis*.
3. La comparaison de la production de la protéase par trois souches de type *B. licheniformis* (ATCC 21415, 21417 et 21424) dans le fermenteur, tout en utilisant les boues d'épuration et le milieu synthétique de soja comme matières premières.
4. L'évaluation de l'effet de l'ajout de sources carbone et d'azote dans les boues pour améliorer la production de protéase alcaline.
5. La récupération et la concentration de la protéase obtenus à partir d'un bouillon fermenté *B. licheniformis*
6. L'évaluation de l'application des protéases dans l'industrie détergent à lessive.

1.3.3 Originalité de la recherche

L'un des objectifs de cette étude est d'identifier des milieux de culture économique pour la croissance des micro-organismes industriels en vue lors de la production de protéases. Le laboratoire de l'Institut national de la recherche scientifique-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE) a appliqué avec succès les boues d'épuration comme matière première de substitution pour produire plusieurs produits à valeur ajoutée, à savoir bio-insecticides, agents de lutte biologique, inoculants microbiens pour la fertilisation les enzymes industrielles comme agents de blanchiment. Toutefois, afin de maximiser le rendement de protéases, le potentiel nutritif des boues d'épuration pour la croissance des micro-organismes dans la fermentation industrielle est l'un des facteurs les plus importants.

La principale originalité du travail est la pertinence d'utiliser des boues d'épuration des eaux usées domestiques à bon marché et abondantes, supplémentées de diverses sources de carbone et d'azote comme substrat liquide pour la production de protéase alcaline par la souche prometteuse *B. licheniformis*. Après production de l'enzyme, sa récupération a été réalisée par ultrafiltration et sa caractérisation a été effectuée par différentes méthodes. Nous avons constaté que l'ultrafiltration a été efficace pour la récupération de l'enzyme qui est stable à pH alcalin et à des températures élevées. Les protéases alcalines thermostables produites par la fermentation des boues par *B. licheniformis* ont été trouvées compatibles avec les détergents commerciaux. De plus, les détergents contenant l'enzyme comme additif ont réussi à enlever les taches de sang. En outre, ceci pourrait être exploré davantage pour la gestion des boues grâce à leur bioconversion en produits à valeur ajoutée.

1.4 RÉSULTATS ET CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette thèse sont présentés en 3 parties. La partie 1 présente les résultats de « l'isolement, le dépistage et la comparaison des nouveaux isolats et des souches standard » (2 articles publiés). La partie 2 présente les résultats sur "l'influence des sources de carbone et d'azote sur l'amélioration de la production de la protéase alcaline" (1 manuscrit est accepté). La partie 3 présente les résultats de "valorisation et à l'application" de l'enzyme (1 manuscrit soumis).

1.4.1 L'isolation, le dépistage et la comparaison des nouvelles souches isolées et souches de références

1.4.1.1 Isolement et caractérisation des bactéries productrices de la protéase provenant des eaux et du sol du Québec

Dans cette étude, l'isolement et la caractérisation des bactéries productrices de protéase ont été étudiés. Soixante-quatorze souches bactériennes ont été isolées à partir de dix échantillons de sol et d'eau riches en protéines provenant de la ville de Québec. En se basant sur la taille des colonies, la texture et les caractéristiques microscopiques, les souches isolées ont été classées en 33 types. Parmi elles, cinq souches bactériennes isolées ont montré une bonne activité protéolytique (ratio de la zone d'hydrolyse/zone de croissance) (>5), 8 souches isolées ont montré une activité modérée (entre >3 et <5), 12 autres bactéries ont montré une activité faible (entre >2 et <3) et 8 souches ont montré une activité très faible (inférieure à 2). Les 5 souches bactériennes isolées prometteuses ont été identifiées comme des souches de *Bacillus* produisant une quantité plus élevée de la protéase et une concentration cellulaire maximale dans les fioles agitées en moins de temps. L'enzyme produite par les 5 souches de *Bacillus* a montré une activité et une stabilité à des températures similaires. 31 et 10% de l'activité initiale des protéases a été obtenu au bout de 2 h de stockage de la protéase à des températures de 50°C et 60°C, respectivement. Toutes les activités de protéase ont été perdu à 70°C, parce que chaque enzyme a sa propre température optimale. Ainsi, des températures plus élevées que la température de dénaturation de l'enzyme entraînent une perte de l'activité enzymatique. Toutefois, le pH optimal et le pH de la stabilité des protéases est de 6 à 9 et 6 à 8, respectivement. Les activités enzymatiques ont été accélérées par l'addition de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} et Na^+ et ont été inhibées par l'ajout de Hg^{2+} et l'EDTA. Ainsi, toutes les souches microbiennes ont été évaluées pour la production de l'enzyme protéase.

1.4.1.2 Comparaison des activités de protéase chez les différentes souches de *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration et le milieu synthétique de soja comme matières premières.

L'objectif de cette étude est de choisir une souche *Bacillus* dont la production de protéase est plus élevée ce qui pourrait se traduire par un niveau de production de protéase également plus élevée pendant la fermentation dans les boues d'épuration des eaux usées. La production de la protéase extracellulaire par différentes souches de *B. licheniformis* (ATCC 21415, ATCC 21417

et ATCC 21424) a été testée dans les boues d'eaux usées en tant que matières premières ainsi que dans le milieu synthétique de soja. Ces deux milieux ont été utilisés afin de comparer la production de protéase par des souches différentes et de vérifier la capacité du milieu à fournir des nutriments pour la synthèse de l'enzyme. Toutes les souches ont montré une activité à peu près semblable dans les deux milieux. L'activité de la protéase produite dans le fermenteur a été plus élevée que celle produite dans les fioles agitées. Les résultats de criblage des microorganismes ont indiqué que *B. licheniformis* ATCC 21424 possède un grand potentiel pour la production de la protéase utilisant des boues comme milieu de croissance. Les conclusions de cette étude suggèrent que les boues d'eaux usées pourraient être utilisées comme matière première (source de nutriments) pour produire la protéase qui possède plusieurs applications industrielles.

1.4.2 Influence des sources de carbone et d'azote sur l'amélioration de la production de la protéase alcaline

1.4.2.1 Augmentation de la production de la protéase par addition de sources de carbone et d'azote à un milieu de boues d'épuration

Bien que les boues d'épuration est une bonne source de milieu nutritif pour la croissance de *B. licheniformis* et la production d'enzymes, en raison de sa nature complexe et sa non biodisponibilité et/ou la disponibilité limitée de carbone, les boues ne peuvent pas fournir une quantité suffisante de nutriments facilement disponibles pour assurer la performance des microorganismes. En outre, il est également très bien connu dans la littérature que la production de la protéase extracellulaire par les micro-organismes est fortement influencée par les composants du milieu, notamment les sources de carbone et d'azote. Ainsi, l'addition de carbone optimisée et les sources d'azote dans le milieu de boues pourraient encore renforcer la production d'enzymes. Dans cette étude, la production de la protéase alcaline par *B. licheniformis* ATCC 21424 en utilisant des boues d'épuration supplémentées par une source de carbone (glucose, maltose, le lactose, le fructose et l'amidon) et d'azote (farine de soja, acides casaamino, peptone et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a été étudiée pour améliorer sa production. L'ajout de lactose 1,5% (p/v) comme source de carbone et de tourteau de soja 1,5% (p/v) comme source d'azote a permis une meilleure production de protéase à la fois dans le fermenteur et les fioles. Les valeurs des paramètres contrôlés tels que, le nombre de cellules total, le nombre de spores, μ_{max} , l'activité de la protéase et l'activité spécifique obtenus dans le fermenteur ont plus élevés que celles dans la

fiolle agitée. L'activité de la protéase dans le fermenteur (15 UI/ml) a été 2,6 fois plus élevée que celle dans la fiole (5,7 UI/ml).

1.4.3 Récupération et application de la protéase alcaline

1.4.3.1 Récupération de protéase alcaline de *Bacillus licheniformis* du surnageant de fermentation des boues d'épuration et sa caractérisation en utilisant l'ultrafiltration

Il y a toujours un besoin pour les protéases, présentant toutes les propriétés souhaitables, pour s'habituer aux conditions d'applications et il est nécessaire également de vérifier la stabilité de l'enzyme à des températures élevées et au pH. Pour utiliser la protéase dans différents domaines d'application telles que l'industrie des détergents, on a besoin toujours d'enzymes concentrées et propres pour obtenir de bonnes performances pendant le stockage et l'application. L'enzyme est plus propre lorsque le milieu est simple et défini contrairement au cas du milieu des boues. L'enzyme obtenu après fermentation contient de nombreuses autres particules de boues et d'autres impuretés. L'enzyme doit être clarifié et concentré pour obtenir une activité plus importante. Dans cette recherche, une étude sur la récupération de la protéase alcaline de *B. licheniformis* ATCC 21424 des boues d'épuration fermentées a été réalisée par centrifugation et ultrafiltration. Une optimisation des paramètres d'ultrafiltration (pression transmembranaire [TMP] et flux RSS) a été réalisée avec une membrane de 10 kDa. La membrane utilisée était de type prep/scale spiral wound TFF-1 Module PLCC et cette membrane a été sélectionnée, car les protéases alcalines ont un poids moléculaire supérieur à celui des pores de la membrane. Un TMP de 90 kPa et un flux d'alimentation de 714 L/h/m² ont donné une récupération de 83% de l'enzyme à partir du surnageant centrifugé. L'enzyme récupérée a donné un maximum d'activité à une température de 60°C et à un pH de 10. Elle a été stable à une gamme de pH de 8 à 10 et 97% de son activité a été retenue après incubation 180 min à 60°C. L'activité enzymatique a augmenté significativement par l'ajout des ions métalliques tels que le Ca²⁺ et Mn²⁺. Les inhibiteurs de protéase comme le PMSF et DFP ont complètement inhibé l'activité enzymatique. La protéase partiellement purifiée a montré une excellente stabilité et une compatibilité avec différents détergents commerciaux. Le détergent (Lumière du soleil) supplémenté par l'enzyme (protéase alcaline produite) a enlevé complètement les tâches de sang du tissu en coton.

1.5 REFERENCES

- Adinarayana K. and Ellaiah P. (2002) Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. J. Pharmaceut. Sci., 5: 272-278.
- Adinarayana K., Ellaiah P. and Davuluri SP. (2003) Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *B. subtilis* PE-11. AAPS PharmSciTech., 4 (4): Article 56.
- Adinarayana K., Jyothi B. and Ellaiah P. (2005) Production of Alkaline Protease with Immobilized Cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in Various Matrices by Entrapment Technique. AAPS PharmSciTech., 6: 391-397.
- Ahan Y.S., Kim C.J. and Choi S.H. (1990) Production of protease by the extreme halophile, *Halobacterium* sp. J. Korean. Agric. Chem. Soc., 33: 247-251.
- Alam M.Z., Fakhrul-Razi A. and Molla A.H. (2003) Biosolids accumulation and biodegradation of domestic wastewater treatment plant sludge by developed liquid state bioconversion process using a batch fermenter. Water. Res., 37: 3569–3578.
- American academy of pediatrics committee on nutrition, hypoallergenic infant formulas (1989). Pediatrics, 83:1068-1069.
- Anbu P, Annadurai G., Leeb J-F. and Hura B-K. (2009) Optimization of alkaline protease production from *Shewanella oneidensis* MR-1 by response surface methodology. J. Chem. Technol. Biotechnol., 84: 54–62.
- Antranikian G. and Klingenberg M. (1991b) Thermostable protease from *Staphylothermus*. PCT Patent Appl WO 9119791.
- Antranikian G., and Klingenberg M. (1991a) Thermostable protease from *Thermococcus*. PCT Patent Appl. WO 9119792.
- Anwar A. and Saleemuddin M. (1998) Alkaline proteases: a review. Bioresour. Technol., 64: 175-183.
- Arulmani M., Aparanjini K., Vasanthi K., Arumugam P., Arivuchelvi M. and Kalaichelvan T. (2006) Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1. World. J. Microbiol. Biotechnol., 23: 475–481.
- Aunstrup K. (1980) Proteinases, edited by Rose A H, Economic Microbiology: Microbial enzymes and Bioconversions, (Academic Press, New York) 5: 50-114.
- Bajorath J., Hinrichs W. and Saenger W. (1988) The enzyme activity of proteinase K is controlled by calcium. Eur. J. Biochem., 176: 441-447.
- Banerjee R. and Bhattacharyya B.C. (1992) Optimization of multiple inducers effect on protease biosynthesis by *Rhizopus oryzae*. Bioprocess. Eng., 7: 225-228.
- Banerjee R., Agnihotri R. and Bhattacharyya B.C. (1993) Purification of alkaline protease of *Rhizopus oryzae* by foam fractionation. Bioprocess. Eng., 9: 245-248.
- Barnabé S., Sasseville J.-L., Tyagi R.D. and Valero J.R. (2003) Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières? Vecteur Environnement., 36: 50-62.

- Barnabé S., Yan S. and Tyagi R.D. (2007) Fate of toxic organic compounds during bioconversion of wastewater sludge to value added products. *Proceedings of IWA conference on Moving Forward: Wastewater Biosolids Sustainability: Technical, Managerial, and Public Synergy*. New Brunswick, Canada.
- Barnabé S. (2004) Bioconversion of wastewater sludge into biopesticide improving sludge nutritive potential by hydrolysis and partial oxidation for higher entomotoxicity. Ph.D. thesis, Institut National de la Recherche Scientifique, Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, Québec, Canada.
- Barthomeuf C., Pourrat H. and Pourrat A. (1992) Collagenolytic activity of a new semi-alkaline protease from *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Bioeng.*, 73: 233-236.
- Bastian R. (1997) The Biosolids (Sludge) Treatment, Beneficial Use, and Disposal Situation in the USA. *European. Wat. Pollution. Cont. J.*, 7: 62-79.
- Bautista J., Chico E. and Machado A. (1986) Cell removal from fermentation broth by flocculation sedimentation. *Biotechnol. Lett.*, 8: 315-318.
- Beg Q.K., Saxena R.K. and Gupta R. (2002a) De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. *Process. Biochem.*, 37:1103–1109.
- Bell D J., Hoare M. and Dunnill P. (1983) The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 26: 1-72.
- Bockle B. and Miller R. (1997) Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feather. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 790-792.
- Bockle B., Galunsky B. and Muller R. (1995) Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3705-3710.
- Bohdziewicz J. (1996) Ultrafiltration of technical amylolytic enzymes. *Process. Biochem.*, 31: 185-191.
- Bohdziewicz J. and Bodzek M. (1994) Ultrafiltration preparation of pectinolytic enzymes from citric acid fermentation. *Process. Biochem.*, 29: 99-107.
- Boopathy R. (2000) Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour. Technol.*, 74: 63–67.
- Boyer E.W. and Byng G.S. (1996) *Bacillus proteolyticus* species which produces an alkaline protease, US Patent No. 5518917.
- Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Valero J.R. and Surampalli R.Y. (2004) Comparative rheology and particulate size analysis of various types of *Bacillus thuringiensis* fermented sludges. *J. Residuals. Sci. Tech.*, 1: 231-237.
- Braxton S. and Wells J.A. (1991) The importance of a distal hydrogen bonding group in stabilizing the transition state in subtilisin BPN9. *J. Biol. Chem.*, 266: 11797-11800.
- Bull A.T., Huck T.A. and Bushell M. E. (1990) Optimization strategies in microbial process development and operation. In: *Microbial Growth Dynamics*, pp. 145-168 (ed. Poole, R.K., Bazin, M.J. and Keevil, C. W.), IRL Press, Oxford.

- Cameron M.D., Timofeevski S. and Aust S.D. (2000) Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54: 751–758.
- Chakrabarti S.K., Matsumura N. and Ranu R.S. (2000) Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). *Curr. Microbiol.*, 40: 239–244.
- Chakraborty R. and Srinivasan M. (1993) Production of a thermostable alkaline protease by a new *Pseudomonas* sp. by solid substrate fermentation. *J. Microb. Biotechnol.*, 8: 7-16.
- Chaloupka J. (1985) Temperature as a factor regulating the synthesis of microbial enzymes. *Microbiol. Sci.*, 2: 86-90.
- Chandrasekharan S. and Dhar S.C. (1986) Utilization of a multiple proteinase concentrate to improve the nutritive value of chicken feather meal. *J. Leather. Res.*, 4: 23-30.
- Chauhan B. and Gupta R. (2004) Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process. Biochem.*, 39: 2115–2122.
- Chen S.T., Chen S.Y., Hsiao S.C. and Wang K.T. (1991b) Kinetic resolution of N-protected amino acid esters in organic solvents catalyzed by a stable industrial alkaline protease. *Biotechnol. Lett.*, 13: 773-778.
- Chen S.T., Hsiao S.C. and Wang K.T. (1991a) Stable industrial protease catalyzed peptide bond formation in organic solvent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1: 445-450.
- Chenel J.P., Tyagi R.D. and Surampalli R.Y. (2008) Production of thermostable protease enzyme in wastewater sludge using thermophilic bacterial strains isolated from sludge. *Water. Sci. Technol.*, 57: 639-645.
- Cheng S.W., Hu H.M., Shen S.W., Takagi H., Asano M. and Tsai Y.C. (1995) Production and characterization of keratinase of a feather degrading *Bacillus licheniformis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59: 2239-2243.
- Cheng-Hsiung C. and Shang-Shyng Y. (2009) Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. *Bioresour. Technol.*, 100: 1648–1658.
- Chu I.M., Lee C. and Li T.S. (1992) Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme Microb. Technol.*, 14: 755-761.
- Chu W.-H. (2007) Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34: 241–245.
- Colwell R.R. (1994) Scientific foundation of bioremediation and gaps remaining to be filled. *Res. Microbiol.*, 145: 40-41.
- Cunningham B. C. and Wells A.W. (1987) Improvement in the alkaline stability of subtilisin using an efficient random mutagenesis and screening procedure. *Protein. Eng.*, 1: 319-325.
- D'souza D.R., Kaur R., Pajni S. and Sharma P. (1997) Isolation of thermophilic bacteria using bacteriological grade agar at temperatures above 80°C. *Biotechniques.*, 22: 1078.

- Dalev P.G. (1994) Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresour. Technol.*, 48: 265-267.
- Danno G. (1970) Crystallization and some properties of alkaline proteinase from *Aspergillus sulphureus*. *Agric. Biol. Chem.*, 34: 264-273.
- De Boer A.S. and Diderichsen B. (1991) On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 1-4.
- Deming J.W. and Baross J.A. (1986) Solid medium for culturing black smoker bacteria at temperatures to 120°C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 238-243.
- Den Belder E., Bonants P.J.M., Fitters P.F.L. and Waalwijk C. (1994) New alkaline serine protease of *Paecilomyces lilacinus*. *Eur Patent Appl EP 0623672*.
- Desai A.J. and Dhalla S.A. (1969) Purification and properties of a proteolytic enzyme from thermophilic actinomycetes. *J. Bacteriol.*, 100: 149-155.
- Desai J.D. and Banat I.M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61: 47-64.
- Dhandapani R. and Vijayaragavan R. (1994) Production of a thermophilic extracellular alkaline protease by *Bacillus stearothermophilus* AP-4. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 10: 33-35.
- Dhar S.C. and Sreenivasulu S. (1984) Studies on the use of dehairing enzyme for its suitability in the preparation of improved animal feed. *Leather. sci.*, 31: 261-267.
- Dixit G. and Verma S.C. (1993) Production of alkaline proteases by *Penicillium griseofulvin*. *Indian. J. Microbiol.*, 33: 257-260.
- Dodia M.S., Bhimani H.G., Rawal C.M., Joshi R.H. and Singh S.P. (2008) Salt dependent resistance against chemical denaturation of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Bioresour. Technol.*, 99: 6223-6227.
- Donaghy J.A. and McKay A.M. (1993) Production and properties of an alkaline protease by *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Bacteriol.*, 74: 662-666.
- Dozie I.N.S., Okeke C.N. and Unaeze N.C. (1994) A thermostable, alkaline active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 10: 563-567.
- Drouin M., Lai C.K., Tyagi R.D. and Surampalli R.Y. (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. Sci. Technol.*, 57: 423-429.
- Durham D.R., Stewart D.B. and Stellwag E.J. (1987) Novel alkaline and heat stable serine protease from alkalophilic *Bacillus* sp. Strain GX6638. *J. Bacteriol.*, 169: 2762-2768.
- Eilertson J.H., Fog A.D. and Gibson K. (1985) Liquid proteinase concentrate and method for preparation. *US Patent No. 4497897*.
- Eljarrat E., Caixach J. and Rivera J. (2001) Evaluation of dioxin contamination in sewage sludge discharges on coastal sediments from Catalonia, Spain. *Water. Res.*, 35: 2799-2803.

- Ellaiah. P., Adinarayana. K., Pardhasaradhi. S. V. and Srinivasulu. B. (2003) Isolation of alkaline protease producing bacteria from Visakhapatnam soil." Ind. J. Pathol. Microbiol., 42: 173-175.
- El-Shanshoury A.R., El-Sayed M.A., Sammour R.H. and El-Shouny W.A. (1995) Purification and partial characterization of two extracellular alkaline proteases from *Streptomyces corchorusii* ST36. Can. J. Microbiol., 41: 99-104.
- Erwin C.R., Barnett B.L., Oliver J.D. and Sullivan J.F. (1990) Effects of engineered salt bridges on the stability of subtilisin BPN9. Protein. Eng., 4: 87-97.
- Estelle D.A., Graycar T.P. and Wells J.A. (1985) Engineering an enzyme by site directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. J. Biol. Chem., 260: 6518-6521.
- Frankena J., Koningstein G.M., Van Verseveld H.W. and Stouthamer A.H. (1986) Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24: 106-112.
- Freeman S.A., Peek K., Prescott M. and Daniel R. (1993) Characterization of a chelator-resistant proteinase from *Thermus* strain Rt4A2. Biochem. J., 295: 463-469.
- Fujiwara N., Masui A. and Imanaka T. (1993) Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkalophilic and thermophilic *Bacillus* sp. J. Biotechnol., 30: 245-256.
- Fujiwara N. and Yamamoto K. (1987) Production of alkaline protease in a low cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. J. Ferment. Technol., 65: 345-348.
- Fujiwara N. and Yamamoto K. (1987) Decomposition of gelatin layers on x-ray films by the alkaline protease from *Bacillus* sp. Hakkokogaku., 65: 531-534.
- Fujiwara N., Tsumiya T., Katada T., Hosobuchi T. and Yamamoto K. (1989) Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme. Process. Biochem., 24: 155-156.
- Gajju H., Bhalla T.C. and Agarwal H.O. (1996) Thermostable alkaline proteases from thermophilic *Bacillus coagulans* PB-77. Indian. J. Microbiol., 36: 153-155.
- Gee J.M., Lund B.M., Metcalf G. and Peel J.L. (1980) Properties of a new group of alkalophilic bacteria. J. Gen. Microbiol., 117: 9-17.
- Genckal H. and Tari C. (2006) Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. Enzyme Microb. Technol., 39: 703-710.
- George S., Raju V., Krishnan M.R.V., Subramanian T.V. and Jayaraman K. (1995) Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. Process. Biochem., 30: 457-462.
- George S., Sivasankar B., Jayaraman K. and Vijayalakshmi M.A. (1997) Production and separation of the methionine rich fraction from chick pea protein hydrolysate generated by proteases of *Bacillus amyloliquefaciens*. Process. Biochem., 32: 401-404.
- Gessesse A., Hatti-Kaul R., Berhanu A.G. and Mattiasson B. (2003) Novel alkaline proteases from alkalophilic bacteria grown on chicken feather. Enzyme Microb. Technol., 32: 519-524.

- Glazer A.N. and Nikaido H. (1995) Microbial enzymes, edited by Glazer AN & Nikaido H, Microbial Biotechnology (W.H. Freeman and co, New York), pp. 24-263.
- Gololobov M.Y., Stepanov V.M., Voyushina T.L., Morozova I.P. and Adluereutz, P. (1994) Side reactions in enzymatic peptide synthesis in organic media: Effects of enzyme, solvent and substrate concentration. *Enzyme Microb. Technol.*, 16: 522-528.
- Grant W.D and Tindall B.J. (1980) The isolation of alkalophilic bacteria, edited by Gould GW, Corry JCL, microbial growth and survival in extremes of environments (London, New York: academic press), pp. 27-36.
- Grant W.D, Mwatha W.E. and Jones B.E. (1990) Alkalophiles: Ecology, diversity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.*, 75: 255-270.
- Grant W.D., Mills A.A. and Schofield A.K. (1979) An alkalophilic species of *Ectothiorhodospira* from a Kenyan soda lake. *J. Gen. Microbiol.*, 110: 137-142.
- Greene R.V, Griffin H.L. and Cotta M.A. (1996) Utility of alkaline protease from marine shipworm bacterium in industrial cleaning applications. *Biotechnol. Lett.*, 18: 759-764.
- Guangrong H., Dehui D., Weilian Hu. and Jiaxin J. (2008) Optimization of medium composition for thermostable protease production by *Bacillus* sp. HS08 with statistical method. *Afr. J. Biotechnol.*, 7: 1115-1122.
- Gupta R., Beg Q.K. and Lorenz P. (2002b) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59:15–32.
- Gupta R., Beg Q.K., Khan S. and Chauhan B. (2002a) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60: 381–395.
- Haki G.D. and Rakshit S.K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour. Technol.*, 89: 17–34.
- Hameed A., Keshavarz T. and Evans C.S. (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. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74: 5–8.
- Han J., Park C.H. and Ruan R. (1995) Concentrating alkaline protease, subtilisin, using a temperature sensitive hydrogel. *Biotechnol. Lett.*, 17: 851-852.
- Hayashi K., Fukushima D. and Mogi K. (1967) Isolation of alkaline proteinase from *Aspergillus sojae* in homogeneous form. *Agric. Biol. Chem.*, 31: 1237-1241.
- Hicks C. R. (1993) Fundamental Concepts in the Design of Experiments, 4th edition, Saunders, N.Y.
- Hodgson J. (1994) The changing bulk biocatalyst market. *Biotechnol.*, 12: 789.-790.
- Holt G. and Saunders G. (1986) In: *Comprehensive Biotechnology*, Vol.1. (M. Moo-Young Ed.) Pergamon Press., pp. 47-72.
- Horikoshi K. (1971) Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part 1. Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agric. Biol. Chem.*, 35: 1407-1414.

- Horikoshi K. (1996) Alkalophiles from an industrial point of view. FEMS Microbiol. Rev., 18: 259-270.
- Hotha S. and Banik R.M. (1997) Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H14 in aqueous two-phase systems. J. Chem. Technol. Biotechnol., 69: 5-10.
- Hutadilok-Towatana N., Painupong A. and Suntainalert P. (1999) Purification and characterization of an extracellular protease from alkalophilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719. J. Biosci. Bioeng., 87: 581-587.
- Ijura Y. and Horikoshi K. (1987) Effect of amino compounds on alkaline amylase production by alkaliphilic *Bacillus* sp. J. Ferment. Technol., 65: 707-709.
- Ikeda S., Tobe S., Niwa K., Ishizaki A. and Hirose Y. (1974) Production of alkaline protease from acetic acid. Agric. Biol. Chem., 38: 2317-2322.
- Imanaka T., Shibasaki M. and Takagi M. (1986) A new way of enhancing the thermostability of proteases. Nature., 324: 695-697.
- Ishii M., Igarashi Y. and Kodama T. (1987) Colony formation of *Hydrogenobacter thermophilus* on a plate solidified with Gerlite. Agric. Biol. Chem., 51: 3139-3141.
- Ishikawa H., Ishimi K., Sugiura M., Sowa A. and Fuziwara N. (1993) Kinetics and mechanism of enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-ray film and release of silver particles. J. Ferment. Bioeng., 76: 300-305.
- Jamal P., Alam M.Z., Salleh M.R.M. and Akib M.M. (2005) Sewage treatment plant sludge: a source of potential microorganism for citric acid production. Am. J. Appl. Sci., 2: 1236-1239.
- Jaouadi B., Ellouz-Chaabouni S., Ali M.B., Messaoud E.B, Naili B., Dhouib A. and Bejar S. (2009) Excellent Laundry Detergent Compatibility and High Dehairing Ability of the *Bacillus pumilus* CBS Alkaline Proteinase (SAPB). Biotechnol. Bioprocess. Eng., 14: 503-512.
- Johnevelsy B. and Naik G. 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. Process. Biochem., 37: 139-144.
- Jonsson A.G. (1968) Protease production by species of *Entomophthora*. Appl. Microbiol., 16: 450-457.
- Joo H.-S and Chang C.-S. (2005) Production of protease from a new alkaliphilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. Process. Biochem., 40: 1263-1270.
- Joshi A. and Ball B. (1993) Extracellular alkaline enzymes of facultative bacteria of CaCO₃ kilns near Jabalpur. Indian. J. Microbiol., 33: 179-183.
- Joshi G.K., Kumar S. and Sharma V. (2007) Production of moderately halotolerant, SDS stable alkaline protease from *Bacillus cereus* MTCC 6840 isolated from Lake Nainital, Uttaranchal state, India. Braz. J. Microbiol., 38: 773-779.
- Kalisz H.M. (1988) Microbial proteinases in advance in Biochemical Bioengineering. In: Ficthter, A., editor., Vol. 36, pp.1-65.

- Keay L. and Wildi B.S. (1970) Protease of the genus *Bacillus*. I. Neutral proteases. *Biotechnol. Bioeng.*, 12: 179-212.
- Kida K., Morimura S., Noda J., Nishida Y., Imai T. and Otagiri M. (1995) Enzymic hydrolysis of the horn and hoof of cow and buffalo. *J. Ferment. Bioeng.*, 80: 478-484.
- Kim C.J, Kim K.C., Oh M.J. and Choi S.H. (1991) Production of alkaline proteinase by the moderate halophile, *Halobacterium* sp.es10. *J. Korean. Agric. Chem. Soc.*, 34: 307-312.
- Kim W., Choi K., Kim Y., Park H., Choi J., Lee Y., Oh H., Kwon I. and Lee S. (1996) Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2482-2488.
- Kirk O., Borchert T.V. and Fuglsang C.C. (2002) Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13: 345–351.
- Kitada M. and Horikoshi K. (1976) Alkaline protease production from methyl acetate by alkalophilic *Bacillus* sp. *Ferment. Technol.*, 54: 383-392.
- Kitada M., Wijayanti L. and Horikoshi K. (1987) Biochemical properties of a thermophilic alkalophile. *Agric. Biol. Chem.*, 51: 2429-2435.
- Kitano K., Morita S., Kuriyama M. and Maejima K. (1992) Alkaline protease gene from a *Fusarium* species. *Eur Patent Appl EP 0519229*.
- Kobayashi T., Hakamada Y., Hitomi J., Koike K. and Ito S. (1996) Purification of alkaline proteases from a *Bacillus* strain and their possible interrelationship. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45: 63-71.
- Kole M. M., Draper I. and Donald F. G. (1988a) Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen-controlled, glucose fed-batch fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 404-408.
- Kole M.M., Draper I. and Gerson D.F. (1988b) Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 41: 197-206.
- Krulwich T.A. (1986) Bioenergetics of alkalophilic bacteria. *J. Mem. Bio.*, 89: 113-125.
- Krulwich T.A. and Guffanti A.A. (1983) Physiology of acidophilic and alkalophilic bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, 24: 173-214.
- Krulwich T.A. and Guffanti A.A. (1989) Alkalophilic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 43: 435-463.
- Krulwich T.A., Guffaanti A.A. and Seto-Young D. (1990) pH homeostasis and bioenergetic work in Alkalophiles. *FEMS Microbiol. Rev.*, 75: 271-278.
- Kumar C. G. (1997) Studies on microbial alkaline proteases for use in dairy detergent, National Dairy Research Institute (Deemed University), Ph D. Thesis, Karnal, India.
- Kumar C.G., and Takagi H. (1999) Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Advan.*, 17: 561–594.

- Kwon Y.T., Kim J.O., Moon S.Y., Lee H.H. and Rho H.M. (1994) Extracellular alkaline protease from alkalophilic *Vibri metschnikovii* strain RH530. *Biotechnol. Lett.*, 16: 413-418.
- Lachhab K., Tyagi R.D. and Valero J.R. (2001) Production of *Bacillus Thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process. Biochem.*, 37: 197–208.
- Landau N. S., Egorov N. S., Gornova B., Krasovskaya S.B. and Virnik A.D. (1992) Immobilization of *Bacillus firmus* cell in cellulose triacetate fibers and films and their use in protease biosynthesis. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 28: 84-88.
- Larcher G., Cimon B., Symoens F., Tronchin G., Chabasse D. and Bouchara J.P. (1996) A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochem. J.*, 315:119-126.
- Larcher G., Bouchara J.P., Annaix V., Symoens F., Chabasse D. and Tronchin G. (1992) Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. *FEBS Lett.*, 308: 65-69.
- Laxman R.S, Sonawane A.P., Snehal V. M., Rao B.S., Rele M.V., Jogdand V.V., Deshpande V.V. and Rao M.B. (2005) Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process. Biochem.*, 40: 3152–3158.
- Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I. and Liman F. (2009) Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state- fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 531-537.
- Lin C.C. and Casida Jr L.E. (1984) Gerlite as a gelling agent in media for growth of thermophilic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 427-429.
- Lorain O., Thiebaud P., Badorc E. and Aurelli Y. (2001) Potential of freezing in wastewater treatment: soluble pollutant applications. *Water. Res.*, 35: 541–547.
- Lourdes M.D., Montile T., Tyagi R.D. and Valero J.R. (2001) Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus Thuringiensis* based biopesticides. *Water. Res.*, 35: 3807–3816.
- Lucy M., Reed E. and Bernard R. Glick. (2004) Applications of free living plant growth-promoting *Rhizobacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 86: 1–25.
- Luisetti M., Piccioni P.O., Dyne K., Donnini M., Bulgheroni A., Pasturenzi L., Donnetta A.M. and Peona V. (1991) Some properties of the alkaline proteinase from *Aspergillus mellus*. *Int. J. Tissue. React.*, 13: 187-192.
- Mabrouk S.S., Hashem A.M., El-Shayeb N.M.A., Ismail A.M.S. and Abdel-Fattah A.F. (1999) Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresour. Technol.*, 69: 155-159.
- Mahanta N., Gupta A. and Khare S.K. (2008) Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresour. Technol.*, 99: 1729-1735.
- Malathi S. and Chakraborty R. (1991) Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 712-716.

- Manachini P.L. and Fortina M.G. (1998) Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. Biotechnol. Lett., 20: 565-568.
- Manjeet K., Santhosh D., Kamia C. and Randhir S. (1998) Production, Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus polymyxa*. Indian. J. Microbiol., 38: 63-67.
- Mao W., Pan R. and Freedman D. (1992) High production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in a fed-batch fermentation using a synthetic medium. J. Ind. Microbiol., 11: 1-6.
- Margensin R. and Schinner F. (1994) Properties of cold adopted microorganisms and their potential role in biotechnology. J. Biotechnol., 33: 1-14.
- Margensin R., Palma N., Knauseder F. and Schinner F. (1992) Purification and characterization of an alkaline protease produced by a psychotropic *Bacillus* sp. J. Biotechnol., 24: 203-206.
- Matsui T., Matsufuji H., Seki E., Osajima K., Nakashima M. and Osajima Y. (1993) Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle. Biosci. Biotechnol. Biochem., 57: 922-925.
- Meenu M., Santhosh D., Kamia C. and Randhir S. (2000) Production of alkaline protease by a UV-mutant of *Bacillus polymyxa*. Indian. J. Microbiol., 40: 25-28.
- Metcalf and Eddy. (2003) Wastewater Engineering – Treatment and reuse, 4th Edition, Eds. Tchobanoglous, G., Burton, F.L. and Stensel, H.D., Mc Graw Hill Inc., New York, 888-893.
- Meunier N. E. (1999) Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales, M.Sc Thèse, INRS-ETE, University of Quebec, Canada, 1-168.
- Michalik I., Szabova E., Polakova A. and Urminska D. (1995) The selection of *Bacillus licheniformis* strains for protease production: Characterization of bacterial alkaline protease. Biologia., 50: 249-252.
- Mitchinson C. and Wells J.A. (1989) Protein engineering of disulfide bonds in subtilisin BPN9. Biochem., 28: 4807-4815.
- Mohammed S., Bala Subramanian S., Yan S., Tyagi, R.D. and Valero J.R. (2006) Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. Process. Biochem., 41: 829-835.
- Monod M., Togni G., Rahalison L. and Frenk E. (1991) Isolation and characterization of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. J. Medical. Microbiol., 35: 23-28.
- Moon S.H. and Parlekar S.J. (1993) Some observations on protease production in continuous suspension cultures of *Bacillus Firmus*. Biotechnol. Bioeng., 41: 43-54.
- Moon S.H. and Parulekar S.J. (1991) A Parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. Biotechnol. Bioeng., 37: 467-483.
- Morihara K. (1974) Comparative specificity of microbial proteinases. Adv. Enzymol., 41: 179-243.

- Mukhopadhyay A., Chakrabarti S.K. and Bajpai P.K. (1990) Treatment and clarification of fermented broth in bacterial enzyme production. *Biotechnol. Techniques.*, 4: 121-126.
- Mukhopadhyay R.P. and Chandra A.L. (1992) Application of a Streptomycete in the removal of waste keratinous materials, edited by Malik VS & Sridhar P, *Industrial Biotechnology*, (Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, New Delhi), pp. 595-597.
- Nadeem M., Qazi J.I., Baig S. and Qurat-ul-Ain. (2008) Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2. *Food. Technol. Biotechnol.*, 46: 388-394.
- Nagashima T., Watanabe A. and Kise H. (1992) Peptide synthesis by proteases in organic solvents: Medium effect on substrate specificity. *Enzyme Microb. Technol.*, 14: 842-847.
- Nakadai T., Nasuno S. and Iguchi N. (1973) Purification and properties of alkaline proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, 37: 2685-2694.
- Nascimento W.C.A.D. and Martins M.L.L. (2004) Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.*, 35: 91-96.
- Nehete P.N., Shah V.D. and Kothari R.M. (1986) Isolation of a high yielding alkaline protease variant of *Bacillus Licheniformis*. *Enzyme Microb. Technol.*, 8: 370-372.
- Neklyudov A.D., Ivankin A.N. and Berdutina A.V. (2000) Properties and uses of protein hydrolysates (review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, 36: 452-459.
- Neurath H. (1989) The diversity of proteolytic enzymes, edited by Beynon RJ & Bond JS, *Proteolytic enzymes a practical approach* (Oxford, IRL Press, UK), pp.1-13.
- Nilegaonkar S.S., Zambare V.P., Kanekar P.P., Dhakephalkar P.K. and Sarnaik S.S. (2007) Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresour. Technol.*, 98: 1238-1245.
- Olajuyigbe F.M. and Ajele J.O. (2005) Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. *Afr. J. Biotechnology.*, 4: 776-779.
- Ong P.S. and Gaucher M. P. (1976) Production, purification and characterization of thermomycolase, the extracellular serine protease of the thermophilic fungus *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*. *Can. J. Microbiol.*, 22: 165-176.
- Oskouie S.F.G., Tabande, F., Yakhchali B. and Eftekhari F. (2008) Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochem. Eng. J.*, 39: 37-42.
- Oudeh M., Khan M. and Scullion J. (2002) Plant accumulation of potentially toxic elements in sewage sludge as affected by soil organic matter level and mycorrhizal fungi. *Environ. Poll.*, 116: 293-300.
- Paliwal N., Singh S.P. and Garg S.K. (1994) Cation-induced thermal stability of an alkaline protease from a *Bacillus* sp. *Bioresour. Technol.*, 50: 209-211.
- Pan S.C. and Tseng D.H. (2001) Sewage sludge ash characteristics and its potential applications. *Water. Sci. Technol.*, 44: 261-267.
- Pan T. and Lin S. (1991) Fermentative production of alkaline protease as detergent additive. *J. Chinese. Biochem. Soc.*, 20: 49-60.

- Pantaliano M. W., Whitlow M., Wood J.F., Dodd S.W., Hardman K.D., Rollence M.L. and Bryan P.N. (1989) Large increase in general stability of subtilisin BPN9 through incremental changes in the free energy of unfolding. *Biochem.*, 28: 7205-7213.
- Pantaliano M.W., Ladner R.C., Bryan P.N., Rollence M.L., Wood J. F. and Poulos T.L. (1987) Protein engineering of subtilisin BPN9: enhanced stabilization through the introduction of two cysteines to form a disulfide bond. *Biochem.*, 26: 2077-2082.
- Pantaliano M.W., Whitlow M., Wood J.F., Rollence M.L., Finzel B.C., Gilland G.L., Poulos T.L. and Bryan P.N. (1988) The engineering of binding affinity at metal ion binding sites for the stabilization of proteins: Subtilisin as a test case. *Biochem.*, 27: 8311-8317.
- Patel R., Dodia M. and Satya Singh P. (2005) Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Process. Biochem.*, 40: 3569-3575.
- Patil D.R., Rethwisch D.G. and Dordick J.S. (1991) Enzymatic synthesis of a sucrose containing linear polyester in nearly anhydrous organic media. *Biotechnol. Bioeng.*, 37: 447-450.
- Pecs M., Eggert M. and Schugerl K. (1991) Affinity precipitation of extracellular microbial enzymes. *J. Biotechnol.*, 21: 137-142.
- Pedersen H.H., Olsen H.S., Nielsen P.M. (1994) Method for production of a meat hydrolysate and a use of the meat hydrolysate. *Pct Patent Appl* WO 94/01003.
- Peek K., Daniel R.M., Monk C., Parker L. and Coolbear T. (1992) Purification and characterization of a thermostable proteinase isolated from *Thermus* sp. strain Rt41A. *Eur. J. Biochem.*, 207: 1035-1044.
- Petinate S.D.G., Branquinha M.H., Coelho R.R.R., Vermelho A.B. and DeSimone S.G. (1999) Purification and partial characterization of an extracellular serine-proteinase of *Streptomyces cyaneus* isolated from Brazilian cerrado soil. *J. Appl. Microbiol.*, 87: 557-563.
- Phadatare S.U., Deshpande V.V. and Srinirasan M.C. (1993) High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 72-76.
- Potumarthi R., Subhakar Ch. and Annapurna J. (2007) Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. *Biochem. Eng. J.*, 34: 185-192.
- Poza M., de Miguel T., Sieiro C. and Villa T.G. (2001) Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 916-921.
- Puri S., Beg Q.K. and Gupta R. (2002) Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Curr. Microbiol.*, 44: 286-290.
- Rahaman R.S., Chee J.Y., Cabral J.M.S. and Hatton T.A. (1988) Recovery of an extracellular alkaline protease from whole fermentation broth using reversed micelles. *Biotechnol. Prog.*, 4: 218-224.
- Rahman R.N.Z.R.A., Geok L.P., Basri M. and Saleeh A.B. (2005) An organic solvent-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K, nutritional factors affecting protease production. *Enzyme Microb. Technol.*, 36: 749-757.

- Rahman R.N.Z.A., Razak C.N., Ampon K., Basri M., Yunus W. M. Z.W. and Salleh A. B. (1994) Purification and characterization of a heat stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. Appl. Microbiol. Biotechnol., 40: 822-827.
- Rawlings N.D and Barret A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. Biochem. J., 290: 205-218.
- Reddy L.V.A., Wee Y.-J and Ryu H.-W. (2008a) Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. J. Chem. Technol. Biotechnol., 83: 1526-1533.
- Reddy L.V.A., Young-Jung W., Jong-Sun Y., Hwa-Won R. (2008b) Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. Bioresour. Technol., 99: 2242–2249.
- Reed G. (1975) Enzymes in Food Processing, 2nd edition, Academic Press, Orlando.
- Ryu K., Kim J. and Dordick J.S. (1994) Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. Enzyme Microb. Technol., 16: 266-275.
- Sachdeva V., Tyagi R.D. and Valero J.R. (2000) Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. Water. Sci. Technol., 42: 211–216.
- Salvesen G. and Nagase H. (1989) Inhibition of proteolytic enzymes, edited by edited by Beynon RJ & Bond JS, Proteolytic enzymes a practical approach (Oxford, IRL Press, New York), pp. 83-103.
- Sen S. and Satyanarayana T. (1993) Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40. Indian. J. Microbiol., 33: 43-47.
- Sharma B., Khangarot P. and Ahmed S. (1994) Proceedings of Micon International 94, 9-12 November, Mysore, India, Abstract, 88.
- Shetty J.K., Patel C.P. and Nicholson M.A. (1993) Purified alkaline protease concentrate and method of preparation. Eur Patent Appl EP 0549048.
- Shevchenko L.S., Lukyanov P.A. and Mikhailov V.V. (1995) Elastolytic activity of a marine isolate of *Bacillus Pumilus*. Mikrobiologia., 64: 642-644.
- Shih Y.C, Prausnitz J.M. and Blanch H.W. (1992) Some characteristics of protein precipitation by salts. Biotechnol. Bioeng., 40: 1155-1164.
- Shikha., Sharan A. and Darmwa N.S. (2007) Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. Bioresour. Technol., 98: 881–885.
- Shimogaki H., Takeuchi K., Nishino T., Ohdera M., Kudo T., Ohba K., Iwama M. and Irie M. (1991) Purification and properties of a novel surface active agent and alkaline-resistant protease from *Bacillus* sp. Y. Agric. Biol. Chem., 55: 2251-2258.
- Sigma D.S. and Moser G. (1975) Chemical studies of enzyme active sites. Ann. Rev. Biochem., 44: 889-931.
- Singh A., Ghosh V.K. and Ghosh P. (2008) Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. Lett. Appl. Microbiol., 18:177-180.

- Sinha N. and Satyanarayana T. (1991) Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*. Indian. J. Microbiol., 31: 425-430.
- Sinha R., Singh S.P., Ahmed S. and Garg S. K. (1996) Partitioning of a *Bacillus* alkaline protease in aqueous two-phase systems. Bioresour. Technol., 55: 163-166.
- Sinha U., Wolz S.A. and Pushkaraj J.L. (1991) Two new extracellular serine proteinases from *Streptomyces fradiae*. Int. J. Biochem., 23: 979-984.
- Sitkey V., Minariik M. and Michalik P. (1992) Recovery of an alkaline proteinase from fermentation broth for cell removal. Biotechnol. Techniques., 6: 49-52.
- Srinivasan M.C., Vartak H.G., Power V.K. and Sutar I.I. (1983) High activity alkaline protease production by a *conidiobolus* sp. Biotechnol. Lett., 5: 285-288.
- Steele D.B., Fiske M.J., Steele B.P. and Kelley V.C. (1992) Production of a low molecular weight, alkaline active, thermo-stable protease by a novel spiral-shaped bacterium, *Kurthia spiroforme* sp. Enzyme Microb. Technol., 14: 358-360.
- Strathmann H. (1990) The use of membranes in downstream processing. Food. Biotechnol., 4: 253-272.
- Sullivan TGO., Epstein AC., Korehhin SR. and Beaton NC. (1984) Applications of ultrafiltration in biotechnology. Chem. Eng. Prog., 80: 68-75.
- Sutar I.I., Srinivasan M.C. and Vartak H.G. (1992) Production of an alkaline proteinase from *Conidiobolus coronatus* and its use to resolve DL-phenylalanine and DL-phenylglycine. World. J. Microbiol. Biotechnol., 8: 254-258.
- Szekeres A., Kredics L., Antal Z., Kevei F. and Manczinger L. (2004) Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol. Lett, 233: 215-222.
- Takac S., Elmas S., Calik P. and Ozdamar T.H. (2000) Separation of the protease enzymes of *B. licheniformis* from the fermentation medium by crossflow ultrafiltration. J. Chem. Technol. Biotechnol., 75: 491-9.
- Takagi H., Ohtsu I. and Nakamori S. (1997) Construction of novel subtilisin E with high specificity, activity and productivity through multiple amino acid substitutions. Protein. Eng., 10: 985-989.
- Takagi H. (1993) Protein Engineering on subtilisin. Int. J. Biochem., 25: 307-312.
- Takagi H., Arafuka S., Inouye M. and Yamasaki M. (1992b) The effect of amino acid detection in subtilisin E based on structural comparison with a microbial alkaline elastase, on its structural specificity and catalysis. J. Biochem., 111: 584-588.
- Takagi H., Kondon M., Hisatsuka T., Nakamori S., Tsai Y.C. and Yamasaki M. (1992a) Effects of an alkaline elastase from an alkalophilic *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. J. Agric. Food. Chem., 40: 2364-2368.
- Takagi H., Takahashi T., Momose H., Inouye M., Maeda Y., Matsuzawa H. and Ohta T. (1990) Enhancement of the thermostability of subtilisin E by the introduction of a disulfide bond engineered on the basis of a structural comparison with a thermophilic serine protease. J. Biol. Chem., 265: 6874-6878.

- Takami H., Akiba T. and Horikoshi K. (1989) Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol., 30: 120-124.
- Takami H., Akiba T. and Horikoshi K. (1990) Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33: 519-523.
- Takami H., Nakamura S., Aono R. and Horikoshi K. (1992) Degradation of human hair of a thermostable alkaline protease by alkalophilic *Bacillus* sp. AH-101. Biosci. Biotechnol. Biochem., 56: 1667-1669.
- Takii Y., Kuriyama N. and Suzuki Y. (1990) Alkaline serine protease produced from citric acid by *Bacillus alcalophilus* subsp. Halodurans KP123. Appl. Microbiol. Biotechnol., 34: 57-62.
- Tang X.-M., Lakay F.M., Shen W., Shao W.L., Fang H.-Y., Prior B.A., Wang Z.-X., and Zhuge J. (2004) Purification and characterisation of an alkaline protease used in tannery industry from *Bacillus licheniformis*. Biotechnol. Lett., 26: 1421-1424.
- Tay J.H. and Show K.Y. (1992) Reuse of wastewater sludge in manufacturing non-conventional construction materials/an innovative approach to ultimate sludge disposal. Water. Sci. Technol., 26: 1165-1174.
- Tirado-Montiel M.L., Tyagi R.D. and Valéro J.R. (2001) Wastewater treatment sludge as raw material for *Bacillus thuringiensis* production. Water. Res., 31: 3807-3816.
- Tsai Y.C., Yamasaki M. and Tamura G. (1984) Substrate specificity of a new alkaline elastase from an alkalophilic *Bacillus*. Biochem. Int., 8: 283-288.
- Tsai Y.C., Yamasaki M., Yamamoto Suzuki Y. and Tamura G. (1983) A new alkaline elastase of an alkalophilic *Bacillus*. Biochem. Int., 7: 577-583.
- Tsuchida O., Yamagota Y., Ishizuka J., Arai J., Yamada J., Takeuchi M. and Ichishima E. (1986) An alkaline proteinase of an alkalophilic *Bacillus* sp. Curr. Microbiol., 14: 7-12.
- Tsuchiya K., Arai T., Seki K. and Kimura T. (1987) Purification and some properties of alkaline proteinases from *Cephalosporium* sp. KSM388. Agric. Biol. Chem., 51: 2959-2965.
- Tsuchiya K., Nakamura Y., Sakashita H. and Kimura T. (1992) Purification and characterization of thermostable alkaline protease from alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. Biosci. Biotechnol. Biochem., 56: 246-250.
- Tsuchiya K., Sakashita H., Nakamura Y. and Kimura T. (1991) Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. Agric. Biol. Chem., 55: 3125-3127.
- Tsuchiya K., Seki K., Arai T. and Masui T. (1993) Substrate specificity of alkaline proteases from *Cephalosporium* sp. KSM388. Biosci. Biotechnol. Biochem., 57: 1803-1804.
- Tsujibo H., Miyamoto K., Hasegawa T. and Inamori Y. (1990) Purification and characterization of two types of alkaline serine proteases produced by an alkalophilic *actinomycete*. J. Appl. Bacteriol., 69: 520-529.
- Tyagi R.D., Sikato F., Barnabe S., Vidyarthi A.S., Valero J.R. and Surampally R.Y. (2002) Simultaneous production of biopesticide and alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. Water. Sci Technol., 46: 247-254.

- Vallee B.L. and Ulmer D.D. (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.*, 41: 91-128.
- Varela H., Ferrari M.D., Belobradjic L., Vazquez A. and Loperena M.L. (1997) Skin unhairing proteases of *Bacillus subtilis*: production and partial characterization. *Biotechnol. Lett.*, 19:755-758.
- Vonder Osten C., Branner S., Hastrup S., Hedegard L., Rasmussen M.D., Bisgard-Frantzen H., Carlsen S. and Mikkelsen J.M. (1993) Protein engineering of subtilisin to improve stability in detergent formulations. *J. Biotechnol.*, 28: 55-68.
- Walker J. (1998) Biosolids Management, Use and Disposal. In: *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*. Robert A. Meyers, Eds. John Wiley & Sons, Inc.
- Watanabe T., Matsue R., Honda Y. and Kuwahara M. (1995) Different activities of a lipase and protease towards straight and branched chain acyl donors in transesterification to carbohydrates in an organic medium. *Carbohydr. Res.*, 275: 215-220.
- Weijers S.R. and Van't Riet K. (1992) Enzyme stability in downstream processing. Part I: Enzyme inactivation, stability and stabilization. *Biotechnol. Adv.*, 10: 237-249.
- Williams S.T. and Cross T. (1971) The *Actinomycetes* In: *Methods in microbiology*. In: Booth, C. (ed), Academic Press, London, Vol. 4, pp. 295-334.
- Wilson S.A., Peek K. and Daniel R.M. (1994) Immobilization of a proteinase from the extremely thermophilic organism *Thermus* Rt41A. *Biotechnol. Bioeng.*, 43: 225-231.
- Wilson S.A., Young O.A., Coolbear T. and Daniel R.M. (1992) The use of proteases from extreme thermophiles for meat tenderization. *Meat. Sci.*, 32: 93-103.
- Yamagata Y., Ishiki K. and Ichishima E. (1995) Subtilisin Sendai from alkalophilic *Bacillus* sp.: Molecular and enzymatic properties of the enzyme and molecular cloning and characterization of the gene, *april* S. *Enzyme Microb. Technol.*, 17: 653-663.
- Yezza A., Tyagi R.D., Valero J.R. and Surampalli R.Y. (2005) Production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in batch and fed cultures using wastewater sludge as a raw material. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80: 502-510.
- Yezza A., Tyagi R.D., Valero J.R. and Surampalli R.Y. (2006) Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by *Bacillus thuringiensis var kurstaki* grown in wastewater sludge. *Process. biochem.*, 41: 794-800.
- Yum D.Y., Chung H.C., Bai D.H., Oh D.H. and Yu J.H. (1994) Purification and characterization of alkaline serine protease from an alkalophilic *Streptomyces* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 470-474.
- Zain S.M., Basri H., Suja F. and Jaafar O. (2001) Land application technique for the treatment and disposal of sewage sludge. In: *Proceedings of the International Water Association (IWA) Conference on Water and Wastewater Management for Developing Countries*, Vol. 1. 29-31 October 2001, Kuala Lumpur, pp. 401-407.
- Zamost B.L., Brantley Q.L., Elm D.D. and Beck C.M. (1990) Production and characterization of a thermostable protease produced by an asporogenous mutant of *Bacillus Stearotherophilus*. *J. Ind. Microbiol.*, 5: 303-312.

Zhu Y., Knol W., Smits J.P. and Bol J. (1996) Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. *Enzyme Microb. Technol.*, 18: 108–112.

CHAPITRE 2

L'ISOLATION, LE DÉPISTAGE ET LA COMPARAISON DES NOUVEAUX ISOLANTS ET SOUCHES DE RÉFÉRENCES

Partie 1

Isolation and characterization of protease producing bacteria from Quebec soil and water samples

Jyothi Bezawada¹, S. Yan¹, R.D Tyagi¹ and R. Y. Surampalli²

¹INRS-ETE, Université du Québec, 490, rue de la Couronne, Québec, Canada G1K 9A9

²USEPA, P.O. Box-17-2141, Kansas City, Kansas, KS 66117

(*Communication: **R.D. Tyagi**, E-mail: tyagi@ete.inrs.ca; Phone: (418) 654 2617; Fax: (418) 654-2600)

Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management

13 (2) 126-134

Isolation et caractérisation des bactéries productrices de la protéase provenant des eaux et du sol du Québec

Résumé

Soixante-quatorze isolats bactériens ont été récupérés à partir de protéines riches en dix échantillons de sol et d'eau prélevés dans la ville de Québec. Sur la base de la taille des colonies la texture et les caractéristiques microscopiques, les isolats ont été classés en 33 types. Parmi eux, cinq isolats ont montré une bonne activité protéolytique (ratio de la zone d'hydrolyse/zone de croissance) (>5), 8 isolats ont montré une activité modérée (entre > 3 et <5), 12 isolats ont montré une activité faible (entre >2 et <3) et 8 isolats ont montré une activité très faible (inférieure à 2). Les cinq isolats prometteurs ont été identifiés comme des souches de *Bacillus* produisant une quantité plus élevée de la protéase et une concentration cellulaire maximale dans le fermenteur d'agitation en moins de temps. L'enzyme produite par 5 souches de *Bacillus* a montré une activité thermique et une stabilité similaire. 31 et 10% de l'activité d'origine des protéases a été retenu au bout de 2 h à 50°C et 60°C, respectivement. Toute l'activité des protéases a été perdue à 70°C. Toutefois, le pH optimal et le pH de la stabilité des protéases de 6 à 9 et 6 à 8, respectivement. Les activités enzymatiques ont été accélérées par l'addition de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} et Na^{+} et ont été inhibées par Hg^{2+} et l'EDTA. Ainsi, tous les isolats ont été évalués à la production de la protéase.

Mots clés : *Bacillus*; le sol et les bactéries de l'eau; l'isolement; protéase alcaline; thermostabilité.

Abstract

Seventy four bacterial isolates were recovered from ten protein rich soil-and water samples collected from Quebec City. On the basis of colony size, texture and microscopic characteristics, the isolates were categorized into 33 types. Among these, 5 isolates showed good proteolytic activity (>5), 8 isolates showed moderate activity (between > 3.0 and < 5.0), 12 isolates showed poor activity (between >2.0 and < 3.0) and 8 isolates exhibited very poor activity (below 2.0). The five promising isolates were identified as *Bacillus* strains produced higher amount of protease and maximum cell concentration in fermenter than shake flask in shorter time. The enzyme produced by 5 strains of *Bacillus* showed similar thermal activity and stability. The proteases retained 31 and 10% of their original activity after 2 h at 50°C and 60°C, respectively, but lost all activity at 70°C. However, the optimum pH and pH stability of proteases from 6.0 to 9.0 and 6.0 to 8.0, respectively. The enzyme activities were accelerated by the addition of Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} and Na^{+} whereas these were inhibited by Hg^{2+} and EDTA. Thus, all evaluated isolates were suitable for the production of protease.

Keywords: *Bacillus*; Soil and water bacteria; Isolation; Alkaline protease; Thermostability.

1. Introduction

Proteases represent the class of enzymes, which occupy a pivotal position with respect to their physiological roles as well as their commercial applications (Fox *et al.* 1991). The current estimated value of the worldwide sales of industrial enzymes is \$1 billion; among them 75% are hydrolytic (Godfrey and West 1996; Kalisz 1988). The vast diversity of proteases, in contrast to the specificity of their action, has attracted worldwide attention in attempts to exploit their physiological and biotechnological applications (Fox *et al.* 1991). Proteases have a long history of application in the food and detergent industries and a relatively new development is the use of protease in the leather industry for dehairing and bating of hides to substitute currently used toxic chemicals in the leather industry (Rao and Deshpande 1998). Biotechnological production of this enzyme locally and application will reduce or replace the usage of harsh chemicals thus saving the environmental pollution. In a view to recent trend of developing environmental friendly enzymes, proteases are envisaged to have extensive applications in leather processing and in several bioremediation processes. Proteases occur ubiquitously in animals, plants and microbes. However, microbes are the goldmine of proteases production and the most significant compared with animal or plant protease (Ward 1985). Proteases from *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* have been marketed but most of the development of these works is patented. This paper deals with the selective isolation of protease-producing bacteria and identification of promising isolates. Also the characterization of protease from these promising isolates was investigated.

2. Material and Methods

2.1 Sampling

A total of 10 samples of water and soil were collected monthly during summer (June 2006–October 2006). Water samples were collected from different places of lakes, rivers and slaughter house (SH) and kept in sterilized borosilicate glass bottles at 4°C (Table 1). Soil samples were collected in the sterile screw capped tubes at the 0-10 cm depth from the different sites of fields and gardens (Table 1) and care was taken to make sure that the points of samples collection had as widely varying characteristics as possible with regard to the organic matter, moisture content, particle size, colour of soil and geographical distribution. All samples were stored at 4°C until analysis.

2.2 Isolation of Bacteria from Samples

Samples from different soils, lakes and rivers (Quebec City) were treated to obtain alkaline protease producing bacterial strains. Samples were serially diluted and plated on casein milk agar medium (Williams and Cross 1971) and incubated for 48 h at 37°C. After 48 h of incubation, the bacterial colonies with clear hydrolyzed zones around them were picked up and transferred to nutrient agar (NA) slants. A total of 74 bacterial isolates were recovered from nine protein rich soil-and water samples collected from Quebec City. On the basis of colony size, texture and microscopic characteristics, the isolates were categorized into 33 types. These isolates were tested for proteolytic activity (proteolytic activity is the ratio of hydrolysis zone and growth zone those were measured from casein agar plate) by casein-agar plate technique (Williams and Cross 1971). Among 33 isolates, 5 isolates showed the highest extracellular proteolytic activity on plates containing skimmed milk agar medium. They were maintained on NA slants at 4°C for further use. Selected isolates were examined for various morphological and biochemical

characteristics as per Bergey's Manual of determinative Bacteriology (Krieg and Halt 1984; Holt *et al.* 1994).

2.3 Fermentations

2.3.1 Inoculum and Cultural Conditions

A loopful of bacterial growth from a NA plate was used to inoculate a 500 ml Erlenmeyer (EM) flask containing 100 ml of nutrient broth (NB). Before inoculation, NB was sterilised at 121°C for 15 min. The flask was incubated in a shaker incubator at 220 revolutions per min (Rpm) and 35°C for 12 h. A 2% (v/v) inoculum from this flask was then inoculated into 500 ml EM flasks containing 100 ml of synthetic soy medium (SSM) (Tyagi *et al.* 2002). The synthetic medium used was commercial medium based on soybean meal and contained glucose (60 g/L), soybean meal (20 g/L), CaCl₂ (0.3 g/L) and MgCl₂ (0.2 g/L). The flasks were incubated in the same way for 12 h. These actively growing cells were used as inoculum for both shake flask and fermenter experiments.

2.3.2 Shake flask and Fermenter Experiments

The selected 5 isolates were tested for extracellular alkaline protease production in shake flasks. A 2% (v/v) inoculum was used to inoculate 500 ml EM flasks containing 100 ml sterile SSM. The flasks were incubated in a shaker incubator at 220 Rpm for 60 h at 35°C. Samples were withdrawn from the EMs at regular intervals for analysis of viable total cell count (TC), spore count (VS), protease activity (PA) and specific protease activity (SPA). SPA is defined as the activity of an enzyme per CFU (unit cell number defined as colony forming units or CFU).

Also these 5 isolates were further tested for extracellular protease production in fermenter, (5L capacity, fitted with dissolved oxygen (D.O) and pH probes) containing 3L of SSM was sterilised *in situ* at 121°C for 30 min. A 2% (v/v) inoculum volume was used to inoculate the

fermenter. Temperature and pH of the fermentation medium were controlled at 35°C and 7.5, respectively. The fermenter contents were agitated at a constant speed (500 Rpm). Air flow rate was controlled automatically using a computer controlled system in order to maintain D.O concentration above 20% saturation. Samples were withdrawn from the fermenter at regular intervals for the analysis of TC, VS, PA and SPA.

2.4 Characterization of Proteases from Different Strains

After fermentation, the samples were centrifuged at 7650g (8000 rpm), 15 min at 4°C and the supernatant was collected as the crude enzyme source. These crude enzymes were used for protease characterization.

2.4.1 Optimum pH and pH Stability

The optimum pH was determined by activity assay using casein at 1.2% (w/v) as substrate in acetate buffer (pH 5.0), phosphate buffer (pH 6.0-7.0), borate buffer (pH 8.0-9.0), bicarbonate buffer (pH 10.0) and Robinson and stokes buffer (pH 11.0-12.0) at 37°C.

Stability of the enzyme was determined by incubating the reaction mixtures at various pH values using different relevant buffers (pH 5.0-12.0) for 24 h at 40°C. The residual activity after incubation was determined under standard assay conditions. Residual activities are obtained at respective pH values assuming the activity of the enzyme before the incubation is 100%

2.4.2 Optimum Temperature and Thermostability

Optimum temperature was determined by activity assay on casein at pH 8.2 from 20°C to 70°C with an interval of 10°C in the absence and presence of 10 mm CaCl₂ and relative protease activities were assayed at standard assay conditions using casein as substrate.

The thermostability of crude enzyme was measured by incubating the enzyme preparation at different temperatures 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C and 70°C for 120 min in the presence of 10 mm CaCl₂. The residual activity after incubation was determined under the standard assay conditions. Residual activities are obtained at respective temperatures assuming the activity of the enzyme before the incubation is 100%.

2.4.3 Effect of Metal ions

To study the effect of metal ions (Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Na⁺ and EDTA) on enzymes, metal salt solutions were prepared in a concentration of 10 mm and 1 ml of metal solution was mixed with 5 ml of crude enzyme and was incubated for 2 h. Enzyme activities were measured at standard assay conditions. The activity is expressed in terms of relative activity assuming that the activity of the enzyme in the absence of metal salts just before the initiation of the treatment is 100%.

2.5 Analytical Methods

The culture samples withdrawn at different intervals were analyzed for TC and VS as CFU by serial plating technique in NA plates. The appropriately diluted samples were plated on agar plates and incubated overnight at 30°C to form fully developed colonies. For spore count, the appropriately diluted samples were subjected to heat treatment at 80°C for 10 min before plating.

2.5.1 Protease Assay

PA was determined according to the modified method of Kunitz (Kunitz 1947). Samples collected after fermentation was centrifuged at 7650 g (8000 rpm) for 10 min at 4°C and the supernatant was collected as the crude enzyme source. The supernatant thus obtained was properly diluted with borate buffer, pH 8.2. PA was assayed by incubating 1 ml of properly

diluted enzyme solution with 5 ml of casein (1.2% w/v, Sigma-Aldrich Canada Inc., Canada) for 10 min at 37°C in a constant temperature water bath. The reaction was terminated by adding 5 ml of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). This mixture was incubated for 30 min in order to precipitate the total non-hydrolysed casein (the enzymatic reaction implied in the analysis of the proteolytic activity consists of hydrolysis of casein into tyrosine by the protease contained in the sample. So, it is important to precipitate unhydrolyzed casein, otherwise other oligosaccharides or small peptides present in the casein would interfere with tyrosine under UV light). At the end of the incubation period, samples as well as blanks were filtered using Whatman filter paper, 934-AH. The absorbance of the filtrate was measured at 275 nm. The validation of the results was established by treating a standard enzyme solution where activity was known, in the same way and under the same conditions. One international PA unit (IU) was defined as the amount of enzyme preparation required to liberate 1 μ mol (181 μ g) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37°C and SPA is the activity of an enzyme per CFU.

All the experiments were conducted in triplicate and the mean of the three with standard deviation (S.d) is represented.

3. Results and Discussion

3.1 Isolation of Bacteria from Samples

It is evident from the data presented in Table 1 that 5 isolates had good proteolytic activity (>5.5), 8 isolates had moderate activity (between >3.0 and <5.0), and 12 isolates had poor activity (between >2.0 and <3.0), while 8 isolates had shown very poor activity (below 2.0). Differences between the isolates from the same sample as well as from different samples were observed. Similar differences in proteolytic activity in different isolates of bacteria have been

reported earlier also (Sandhia and Prema 1998). 5 promising isolates, those showed good proteolytic activity, were identified as *Bacillus* strains using morphological and biochemical characteristics (Krieg and Halt 1984; Halt *et al.* 1994) and further tested for their enzymatic activity in shake flask and fermenter. Similarly, Ellaiah *et al.* (2002) and Olajuyigbe *et al.* (2005) reported that nine and three *Bacillus* isolates showed good proteolytic activity during their screening programme, respectively.

3.2 Fermentations

3.2.1 Shake Flask

Fig. 1 shows the results on TC, VS, PA and SPA in shake flask. The results indicate that all the isolates grew well in the medium and maximum PA and SPA was achieved after 30-48 h (Fig.1) and the figure clearly shown that initially growth and activity for all strains were increased exponentially and reached their maximum values (ascending), activity and growth entered stationary phase after attaining maximum values and then declination of activity and growth occurred (descending). During the *Bacillus* growth, cell morphology was also examined all bacterial cells appeared in vegetative form during the first 12 h, and spore production was observed not only during the stationary phase, but also during the exponential phase. The time required to attain maximum cell concentration coincided with maximum enzyme production and SPA for all the isolates except with the isolate B11. In the case of isolate B11, maximum cell concentration and enzyme production was reached at 30 and 48 h, respectively.

3.2.2 Fermenter

The results on TC, VS, D.O, PA and SPA in fermenter are presented in Fig. 2. The figure clearly shown that initially growth and activity for all strains were increased exponentially and reached their maximum values (ascending), activity and growth entered stationary phase after attaining

maximum values and then declination of activity and growth occurred (descending). Similar to shake flask, the results showed that the production of proteases was dependent on cell concentration except with the isolate B11 (Table 2). This result suggested that the proteases reached the high level after 21-42 h fermentation for all isolates (0.45 – 1.15 IU/ml). Also the D.O concentration decreased to 25% saturation during growth (Fig. 2). There was a reduction of PA and SPA after 21-42 h fermentation for all isolates (Fig. 2). The reduction in PA could be explained due to inactivation of the produced proteases. This inactivation caused by a phenomenon of co-digestion or the digestion of the extracellular proteases by certain intracellular proteases released in the medium following cellular lysis at the end of the sporulation process (Chu *et al.* 1992). Moreover many workers have suggested that at the end of the fermentation process protease production decreased when nutrients become limiting (Yezza *et al.* 2005; Beg *et al.* 2002).

Maximum cell concentration in fermenter was achieved in shorter time (12-18 h) as compared to shake flask. Similar type of result was obtained by Tyagi *et al.* (2002) that maximum cell concentration (1×10^9) was achieved in shorter time (12 h) in *Bacillus thuringiensis* sludge fermentation. The improved TC (3.4×10^8 , 3.1×10^8 , 4.3×10^8 , 6.4×10^8 , and 3.45×10^8) and VS (6.6×10^7 , 5.6×10^7 , 1.6×10^8 , 8.5×10^6 , 14×10^7) concentration in fermenter could be due to better oxygen transfer and better pH control. Aeration and agitation rates were increased and D.O was maintained above 20% (1.56 mg O₂/L) (critical value), this helps better transfer of oxygen through out the fermentation. The PA reached two times higher in fermenter in shorter period (21-42 h) than shake flask (30-48 h) for all the isolates (Table 2). This may be due to a better control of pH in fermenter (Tyagi *et al.* 2002). In shake flask, pH decreased in the initial phase of fermentation and increased during the sporulation and stationary phase of growth. The final pH

of the broth in shake flask was found to be above pH 8.0. This increased pH perhaps deactivated the protease enzyme in shake flask experiments and thus resulted in low PA (Tyagi *et al.* 2002). The results proved the limits of fermentation in shake flask and uncontrolled pH is one of the most important parameter which is unfavourable in shake flask for protease production (Calik *et al.* 2002). In shake flask, the capacity of oxygen transfer is limited. The cotton stoppers employed during fermentations in shake flask could reduce oxygen transfer (Humphrey 1998) and if oxygen demand of the microorganisms exceeds the capacity of gas-liquid transfer, then oxygen factor becomes limiting factor (Veglio 1973) and thus affects the product yield. The D.O concentration also plays an important role on protease production through affecting the metabolic pathways of the bacterium (Calik *et al.* 2000).

3.3 Characterization of Proteases from Different *Bacillus* Strains

3.3.1 Optimum pH and pH Stability

The optimum pH of proteases is shown in Fig. 3. The optimum pH was around 6.0-9.0 for enzymes produced by B2, B4, B11, B12 and B15 strains, and three proteases S, N and B from *thermophilic B. stearothermophilus* TLS33 have optimum pH values of 8.5, 7.5 and 7.0 respectively (Sookkheo *et al.* 2000). However, protease of *Bacillus pseudofirmus* AL-89 exhibited optimum activity at pH 11.0 and showed low activity at pH values below pH 10.0 and above 11.5 (Takeda *et al.* 2000). The enzyme studied by Malathi and Dhar (1987), and Manachini *et al.* (1988) had a pH optimal range of 9.0-9.5 and protease from *Bacillus* sp SS103 showed maximum activity at pH 11.0 (Myeonghwa *et al.* 2005). The results indicated that the enzyme under investigation was alkaline in nature. But the present enzymes were less alkaline compared to the protease produced by *Bacillus* No. 221 (Horikoshi 1971) and *B. licheniformis* MIR 29 (Ferrero *et al.* 1996) with an optimum pH of 11.5, 12.0 and 13.0, respectively. However

these results are compatible with the *Conidiobolus coronatus* protease (Phadatare *et al.* 1993), which showed a high level of stability up to pH 8.0, which is the pH of most commercial detergent solutions.

The pH stability of proteases is shown in Fig. 3. And it was stable over pH range 6.0-8.0 and very unstable after pH 10.0. This coincides with findings of Kumar and Takagi (1999) that AP-2 enzyme of alkalophilic *Bacillus* sp showed stability over range between 6.0 and 9.0. However in an earlier study the protease from *Thermus* sp strain Rt41A exhibited stability at least for 4 h over a pH range of 5.0-10.0 in the presence of 5 mm CaCl₂. Protease from *Bacillus* sp SS103 was stable over wide range of pH 8.0- 13.0 (Myeonghwa *et al.* 2005). Most detergent solutions are at pH 8.0 and hence, the enzyme could be promising for detergent industry application.

3.3.2 Optimum Temperature and Thermostability

In the present study, the effect of the temperature on the enzyme substrate reaction was investigated to determine the optimum temperature of the enzyme (Fig.4). It was found that the PA increased with the increase of the reaction temperature up to 40°C in the absence and presence of 10 mm CaCl₂ (Fig.4). However, a further increase in reaction temperature resulted in a loss of PA. This result is in agreement with Hossain *et al.* (2004). The maximum temperature was recorded for AP-1 was 50°C and for AP-2 was 55°C of alkalophilic *Bacillus* species and the enzyme activities for both these proteases gradually declined at temperatures beyond these (Kumar and Takagi 1999). A reduction in enzyme activity was observed above 60°C (Martins and Nascimento 2004).

Thermostability of the enzyme is important if the detergents containing protease are to be used in hot water. Thermostability of enzyme was investigated at 20 °C -70 °C in the presence of 10 mm CaCl₂ to determine the temperature stability of the enzyme (Fig.5). The Ca²⁺ is known to play a

major role in enzyme stabilization at higher temperatures and in many reports, Ca^{2+} has been shown to increase the activity and thermal stability of protease at higher temperatures (Kumar and Takagi 1999; Durham *et al.* 1987; Rahman *et al.* 1994). The enzyme was stable from 20°C to 40°C for 2 h (100%). The enzyme was stable a wide range 50°C – 60°C, retained about approximately 31 and 10% activity during this time for B2, B4, B11, B12 and B15, respectively. Similarly protease from *B. subtilis* PE-11 was almost 100% stable at 60°C even after 350 and 250 minutes of incubation and less than 50 min at 70°C and 80°C, respectively (Kunamneni *et al.* 2003) and protease from *Bacillus* sp SS103 retained about 30% of its original activity after incubation at 80°C for 30 minutes (Myeonghwa *et al.* 2005). After 2 h at 70°C, the activity was completely lost for all enzymes because of thermal inactivation (Fig. 5). Proteases from *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus claudii* lost their activities beyond 40°C (Jaya and Ayyanna 1993). Proteases from AP-1 of alkalophilic *Bacillus* sp have half life of 40 min indicating high thermal stability of the protease. Previous reports on thermostability have shown half lives of > 200 min at 50°C and 2 to 22 min at 60°C for heat stable serine proteases, and subtilisin Carlsberg, 3.4 min and for subtilisin BPN, 2.4 min at 50°C have been recorded (Durham *et al.* 1987). At present, there is considerable interest in the identification of alkaline proteases that act effectively as detergent enzymes when used at ambient temperature. This is essentially due to the energy cost involved in heating the water for washing. Detergents are commonly used at room temperatures (28°C) and hence, the enzyme could be promising for this application, in spite of being less stable to heat than the other *Bacillus* enzymes.

3.3.3 Effect of Metal ions on Enzyme Activity

Storage stability is a prominent factor in the commercialization of an enzyme and it is known that metal ions increases storage stability of enzyme. In a view to increasing the storage stability,

investigation was carried out to observe the effect of different metal ions on crude proteases from 5 different *Bacillus* isolates. These cations also have been reported to increase thermal stability of other *Bacillus* alkaline proteases (Rahman *et al.* 1994). Proteases from different isolates behaved differently in the presence of metals ions (Table 3). At a concentration of 10 mm, Fe^{2+} , Co^{2+} and Ca^{2+} increased the activity of B2 protease, whereas K^{+} and Na^{+} inhibited its activity. Cu^{2+} strongly stimulated activity of the protease produced by *Bacillus* sp. B4. Some metal ions such as Ca^{2+} , Mg^{2+} and Na^{+} slightly increased the protease activity of both the proteases (B11 and B12) of *Bacillus* species, and EDTA resulted in maximum inhibition of both the enzymes B11 and B12 by 61% and 53% respectively, indicating the presence of metal requiring proteases in the preparations. In case of B15 protease, Ca^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} increased enzyme activity whereas Hg^{2+} inhibited the enzyme activity. This phenomena indicated that the enzyme require metal ions as cofactors. These results correlate with the result of Kunamneni *et al.* (2003) who found that Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} increased enzyme activity and Hg^{2+} reduced activity and in accordance with Takeda *et al.* (2000). Other metal ions such as Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Na^{+} , Fe^{2+} , and EDTA did not shown any appreciable effect on this enzyme. It is believed that metal ions apparently protected the enzyme against thermal denaturation and played a vital role in maintaining the active confirmation of the enzyme at high temperatures (Pan and Lin 1991; Seele *et al.* 1992).

In summary, the optimal operating conditions in the reaction for *Bacillus* proteases were determined as pH 6.0-9.0, 40°C and Ca^{+2} or Mg^{2+} or Cu^{2+} or Co^{2+} of 10 mm concentration.

4. Conclusion

The results suggest that a wide variety of protease producing microorganisms distribution from the region of Quebec, Canada. The proteases produced by *Bacillus* isolates are stable over a wide

range of pH values and temperatures, and can be of considerable use in industrial processes (such as, detergent formulations, sewage treatment, leather processing). However, further studies on enzyme stability under various conditions are suggested before its industrial use.

Acknowledgements

The authors are sincerely thankful to Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grants A4984, STP235071, and Canada Research Chair) for financial support.

Notations used in this text

SH	Slaughter house
NA	Nutrient agar
EM	Erlenmeyer
NB	Nutrient broth
Rpm	Revolutions per min
SSM	Synthetic soy medium
TC	Total cell count
VS	Spore count
PA	Protease activity
SPA	Specific protease activity
CFU	Colony forming unit
IU	International unit
S.d	Standard deviation
D.O	Dissolved oxygen
TCA	Trichloroacetic acid

References

1. Beg, Q.K., Saxena, R.K., and Gupta, G. (2002). "De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed- batch operations". *Process Biochem.*, 37, 1103-1109.
2. Calik, C., Takac, C., Calik, G., and Ozdamar, T.H. (2000). "Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis* - Use of citric acid as the carbon source". *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 45-60.
3. Calik, P., Billir, E., Calik, G., and Ozdamar, T.H. (2002). "Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*". *Enzyme Microb. Technol.*, 31, 685- 697.
4. Chu, I.M., Lee, C., and Li, T.S., (1992). "Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416". *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 755-761.
5. Durham, D. R., Stewart, D. B., and Stelwag, E. G. (1987). "Novel alkaline and heat stable proteases from alkalophilic *Bacillus* species strain GX 6638". *J. Bacteriol.*, 169, 2762-2768.
6. Ellaiah, P., Adinarayana, K., Pardhasaradhi, S.V., and Srinivasulu, B. (2002). "Isolation of alkaline protease producing bacteria from Visakhapatnam soil". *Indian J. Microbiol.*, 42, 173-175.
7. Ferrero, M. A., Castro, G. R., Abate, C. M., Baigori, M. D., and Sineriz, F. (1996). "Thermo stable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 327-332.
8. Fox, J. W., Shannon, J. D., and Bjarnason, J. B. (1991). "Proteinases and their inhibitors in biotechnology. Enzymes in biomass conversion". *ACS Symp. Ser.*, 460, 62-79.
9. Godfrey, T., and West, S. (1996). "Industrial Enzymology". 2nd Edition, Macmillan Publishers Inc., New York, p. 3.
10. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stately, J.T., and Williams, St. (1994). "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 9th Edition, (eds. Williams and Wilkins Co), Baltimore, p. 787.
11. Horikoshi, K. (1971). "Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms part-I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221". *J. Agr. Biol. Chem.*, 35, 1407-1414.
12. Hossain, M.S., Iqbal, M.S., and Hoq, M.M. (2004). "Fermentative characteristics of alkaline protease by *Bacillus cereus* MZK-09". *Bangladesh J. Microbiol.*, 21, 86-89.
13. Humphrey, A. (1998). "Shake flasks to fermenter". *Biotechnol. Prog.*, 14, 3-7.

14. Jaya, R., and Ayyanna, C. A. (1993). "Comparison of immobilized protease from plant and microbial sources". In: Ayyanna, C., editor. *Trends Biotechnol.*, Tata Mcgraw-Hill, New Delhi, p. 25-30.
15. Kalisz, H. M. (1988). "Microbial proteinases in advance in Biochemical Bioengineering". In: Ficchter, A., editor., Vol. 36, p. 1-65.
16. Krieg, R.N., and Halt, G.J. (1984). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", (eds. Williams and Wilkins Co), Baltimore, London., Vol. 1, p. 964.
17. Kumar, C.G., and Takagi, H. (1999). "Microbial alkaline proteases - from a bioindustrial view point". *Biotechnol. Adv.*, 17, 561-594.
18. Kunamneni, A., Poluri, E., and Davuluri, S.P. (2003). "Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11". *AAPS Pharm. Sci.Tech.*, 4 (4), 56.
19. Kunitz, M. (1947). "Crystalline Soybean trypsin inhibitor". *J. Gen. Physiol.* 30, 291-310.
20. Malathi, S., and Dhar, S. C. (1987). "Production of extracellular protease by an *Aspergillus flavus* isolate and its application in the depilation of skins". *Leather Sci.*, 34, 67-76.
21. Manachini, P.L., and Parini, C. (1988). "Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* a new species of *Bacillus*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 409-413.
22. Martins, M.L.L., and Nascimento, W.C.A. (2004). "Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp". *Brazilian J. Microbiol.*, 35, 91-96.
23. Myeonghwa, C., Jyung, R.P., and Kyung, Y.Y. (2005). "Purification and characterisation of alkaline serine protease producing angiotensin 1- converting enzyme inhibitory peptide from *Bacillus* sp. SS103". *J. Med. Food.*, 8, 462-468.
24. Olajuyigbe, F.M., and Ajele, J.O. (2005). "Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species". *African J. Biotechnol.*, 4, 776-779.
25. Pan, T., Lin, S. (1991). "Fermentative production of alkaline protease as detergent additive". *J. Chinese Biochem. Soc.*, 20, 49-60.
26. Phadatare, S.U., Deshpande, V.V., Srinivasan, M.C. (1993). "High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents". *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 72-76.
27. Rahman, R.N.Z.A., Rzak, C.N., Ampon, K., Basri, M., Yunus, W.M.Z.W., Salleh, A.B. (1994). "Purification and characterisation of heat stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 822-827.

28. Rao, M. B., and V. V. Deshpande. (1998). "Proteases and their applications in biotechnology". In: Varna, A. (ed), *Microbes: for health, wealth and sustainable environment*, Malhotra Publishing House, New Delhi, India.
29. Sandhia, G.S., and Prema, P. (1998). "Selection of optimal growth medium for the synthesis of alkaline proteinase from *Bacillus* SGP-26". *J. Sci. Ind. Res.*, 57, 629-633.
30. Seele, D.B., Fiske, M.J., Steele, B.P., Kelley, V.C. (1992). "Production a low molecular weight, alkaline active, thermostable protease by a novel spiral- shaped bacterium". *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 358-360
31. Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., Chen, S.T. (2000). "Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearoothermophilus* TLS33". *Protein Expr. Purif.*, 20, 142-151.
32. Takeda, M., Iohara, K., Shinmaru, S., Suzuki, I., and Koizumi, J. (2000). "Purification and properties of an enzyme capable of degrading the sheath of *Sphaerotilus natans*". *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4998–5004.
33. Tyagi, R.D., "Sikato, Foko., Barnabe, S., Vidyarthi, A.S., Valero, J.R., and Surampally, R.Y. (2002). "Simultaneous production of biopesticide and alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material". *Water Sci. Technol.*, 46, 247-254.
34. Veglio, J.P. (1973). "Alkaline protease, method for its production and detergent composition". *US patent no.*, 37482335.
35. Ward, O. P. (1985). "Proteolytic enzymes". (eds. Blanc, H.W., Drew, S., Wang, D), *Comprehensive Biotechnology*, Oxford, UK, Pergamon press, Vol. 3, p. 789-818.
36. Williams, S.T., and Cross, T. (1971). "The Actinomycetes, In: *Methods in Microbiology*". In: Booth, C. (ed), Academic Press, London, Vol. 4, p. 295-334.
37. Yezza, A., Tyagi, R.D., Valero, J.R., and Surampalli, R.Y. (2005). "Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* grown in waste water sludge." *Process Biochem.*, 41, 794-800.

Table 1. Proteolytic activity of selected isolates by milk agar plate technique

Isolate No	Source	Proteolytic activity*	Isolate No.	Source	Proteolytic activity*
B1	St-Foy lake	2.8 ± 0.05	B18	Ill de Orleans (field)	2.3 ± 0.03
B2	St-Foy lake	6.1 ± 0.12	B19	Waste water from SH	2.3 ± 0.05
B3	St-Foy lake	3.0 ± 0.06	B20	Waste water from SH	1.1 ± 0.02
B4	St-Foy lake	5.6 ± 0.16	B21	Waste water from SH	4.1 ± 0.07
B5	St-Foy lake	3.7 ± 0.07	B22	Waste water from SH	1.1 ± 0.04
B6	St-Augustine lake	3.5 ± 0.09	B23	Waste water from SH	1.2 ± 0.02
B7	St-Augustine lake	3.9 ± 0.05	B24	Sludge from SH	2.4 ± 0.06
B8	St-Augustine lake	2.3 ± 0.03	B25	Sludge from SH	1.1 ± 0.03
B9	St-Augustine lake	2.9 ± 0.06	B26	Sludge from SH	1.0 ± 0.05
B10	St-Lawrence river	3.8 ± 0.08	B27	Sludge from SH	4.8 ± 0.09
B11	St-Lawrence river	6.0 ± 0.13	B28	Rhizosphere soil	1.8 ± 0.04
B12	St-Lawrence river	7.5 ± 0.17	B29	Rhizosphere soil	1.4 ± 0.01
B13	River Chaudière	2.9 ± 0.05	B30	Argen court lake and rhizosphere revere bank	2.2 ± 0.06
B14	River Chaudière	3.1 ± 0.04	B31	Argen court lake and rhizosphere revere bank	2.3 ± 0.08
B15	River Chaudière	9.5 ± 0.19	B32	119 km (chemin de la Bruce parcs de grand jardin)	1.5 ± 0.02
B16	Ill de Orleans (field)	2.8 ± 0.06	B33	119 km (chemin de la Bruce parcs de grand jardin)	2.1 ± 0.05
B17	Ill de Orleans (field)	2.6 ± 0.08			

*Hydrolysed zone (mm) / growth zone (mm) ratio on casein milk agar

Table 2. Maximum values of TC, VS, PA, SPA and μ_m of *Bacillus* strains in shake flask and fermentor

Strain	Shake flask					Fermenter				
	μ_m (h ⁻¹)	Maximum PA (IU/ml)	Maximum SPA (IU/10 ⁸ cells)	Maximum TC (CFU/ml)	Maximum VS (CFU/ml)	μ_m (h ⁻¹)	Maximum PA (IU/ml)	Maximum SPA (IU/10 ⁸ cells)	Maximum TC (CFU/ml)	Maximum VS (CFU/ml)
B2	0.33	0.3 (30h)*	0.12	2.8x10 ⁸ (30h)*	5x10 ⁷ (30h)*	0.35	0.58 (21h)*	0.15	3.4x10 ⁸ (21h)*	6.6x10 ⁷ (21h)*
B4	0.29	0.25 (30h)	0.11	2.8x10 ⁸ (30h)	4.2x10 ⁷ (30h)	0.33	0.45 (24h)	0.17	3.1x10 ⁸ (24h)	5.6x10 ⁷ (24h)
B11	0.26	0.5 (48h)	0.14	4x10 ⁸ (30h)	1.3x10 ⁸ (30h)	0.29	0.92 (42h)	0.24	4.3X10 ⁸ (24h)	1.6X10 ⁸ (24h)
B12	0.26	0.36 (30h)	0.09	4.8x10 ⁸ (30h)	6.5x10 ⁶ (30h)	0.32	0.74 (24h)	0.13	6.4X10 ⁸ (24h)	8.5X10 ⁶ (24h)
B15	0.3	0.59 (42h)	0.19	3.2x10 ⁸ (42h)	14x10 ⁷ (42h)	0.35	1.15 (36h)	0.32	3.45 x 10 ⁸ (36h)	19 x 10 ⁷ (36h)

* Optimum incubation time

Table 3. Effect of various metal ions on PA of different *Bacillus* isolates

Metal ions (10 mm)	Residual PA (%)				
	B2	B4	B11	B12	B15
Control (without metal ion)	100 ± 1.91	100 ± 1.89	100 ± 1.82	100 ± 1.73	100 ± 2.01
Zn ²⁺ (ZnSO ₄)	94 ± 1.48	89 ± 1.32	99 ± 1.98	97 ± 2.15	91 ± 1.76
Cu ²⁺ (CuCl ₂)	96 ± 2.31	138 ± 2.58	90 ± 2.06	92 ± 2.27	95 ± 2.34
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	99 ± 2.15	100 ± 2.28	107 ± 2.39	112 ± 2.25	126 ± 2.53
Hg ²⁺ (HgSO ₄)	97 ± 2.23	91 ± 2.14	95 ± 1.97	38 ± 0.84	49 ± 1.36
Co ²⁺ (CoCl ₂)	127 ± 2.15	93 ± 1.94	89 ± 1.72	89 ± 1.67	92 ± 1.99
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	135 ± 2.32	99 ± 1.91	110 ± 2.36	116 ± 2.29	138 ± 2.68
Na ⁺ (NaCl)	84 ± 1.85	100 ± 2.12	108 ± 2.41	105 ± 2.61	99 ± 2.03
K ⁺ (KCl)	71 ± 1.63	98 ± 2.05	99 ± 1.89	96 ± 1.65	94 ± 1.42
EDTA	101 ± 2.35	96 ± 1.61	39 ± 0.82	47 ± 0.69	95 ± 1.87
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	97 ± 1.99	99 ± 2.24	96 ± 1.67	98 ± 2.03	119 ± 2.12
Fe ²⁺ (FeSO ₄)	109 ± 2.15	92 ± 1.94	94 ± 1.86	91 ± 1.93	95 ± 1.53

Values are mean of three determinations with standard deviation (±)

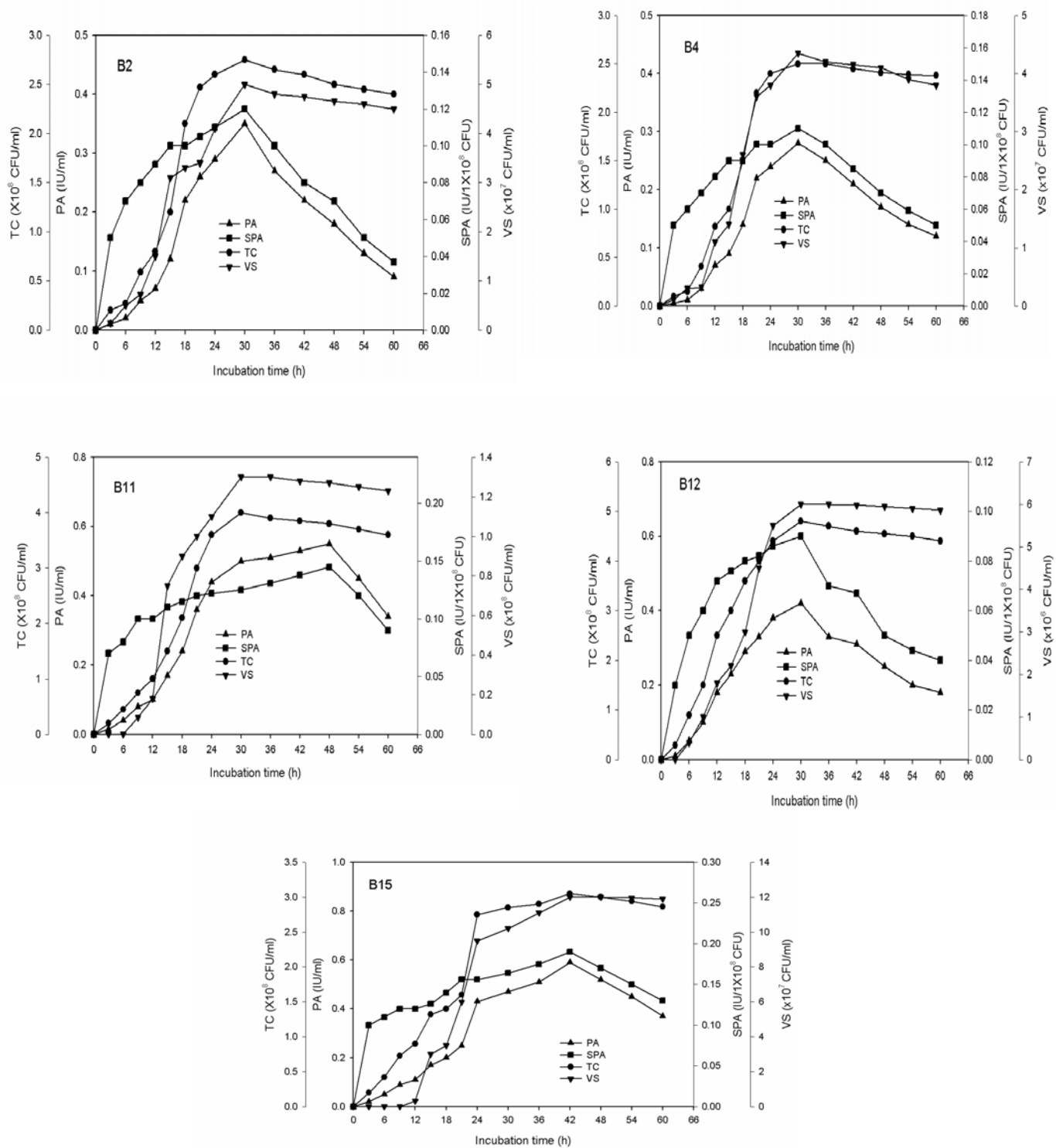


Figure 1. Growth (TC and VS) and PA of *Bacillus* strains in shake flask

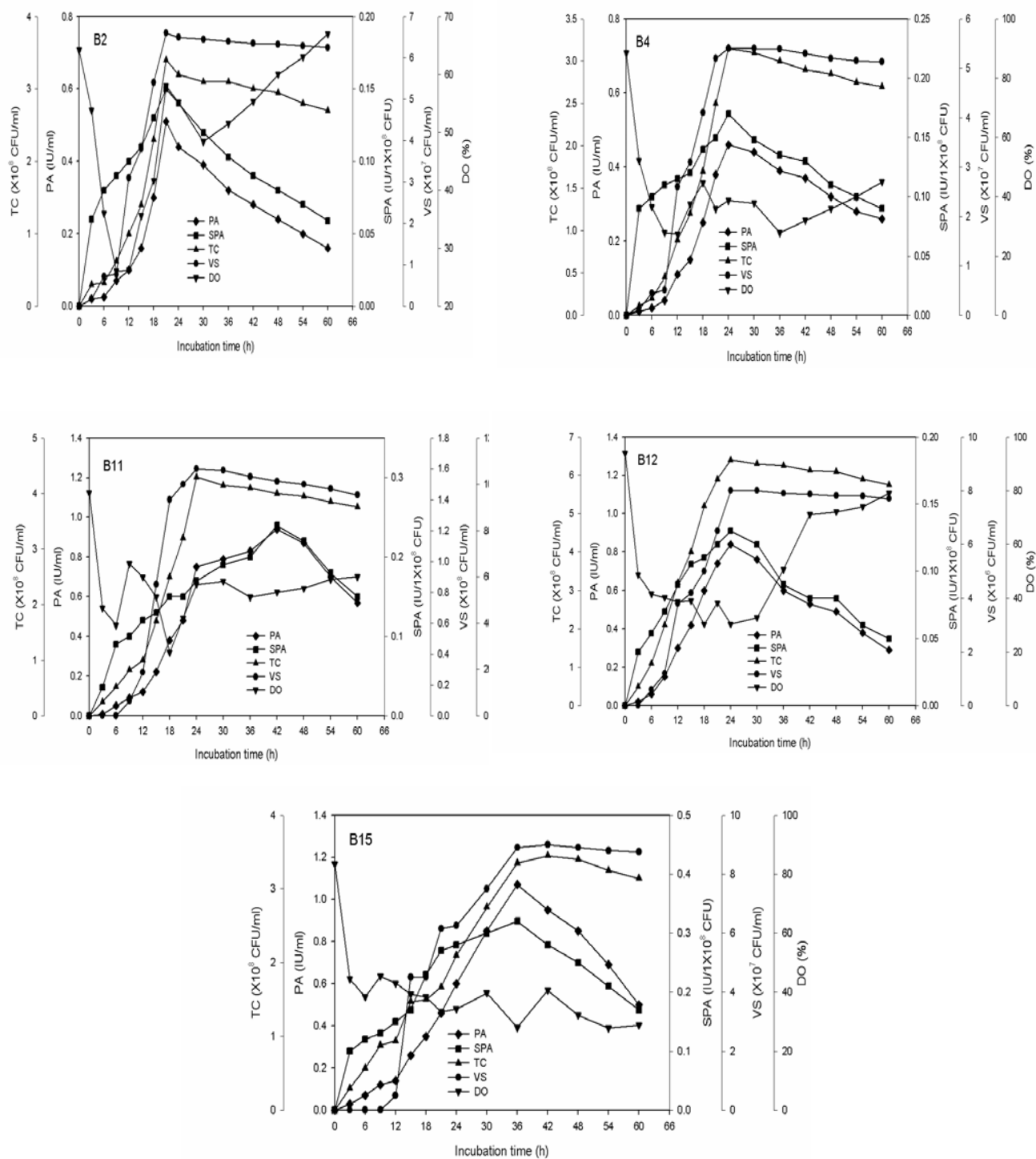


Figure 2. Growth (TC and VS), DO concentration and PA of *Bacillus* strains in fermenter

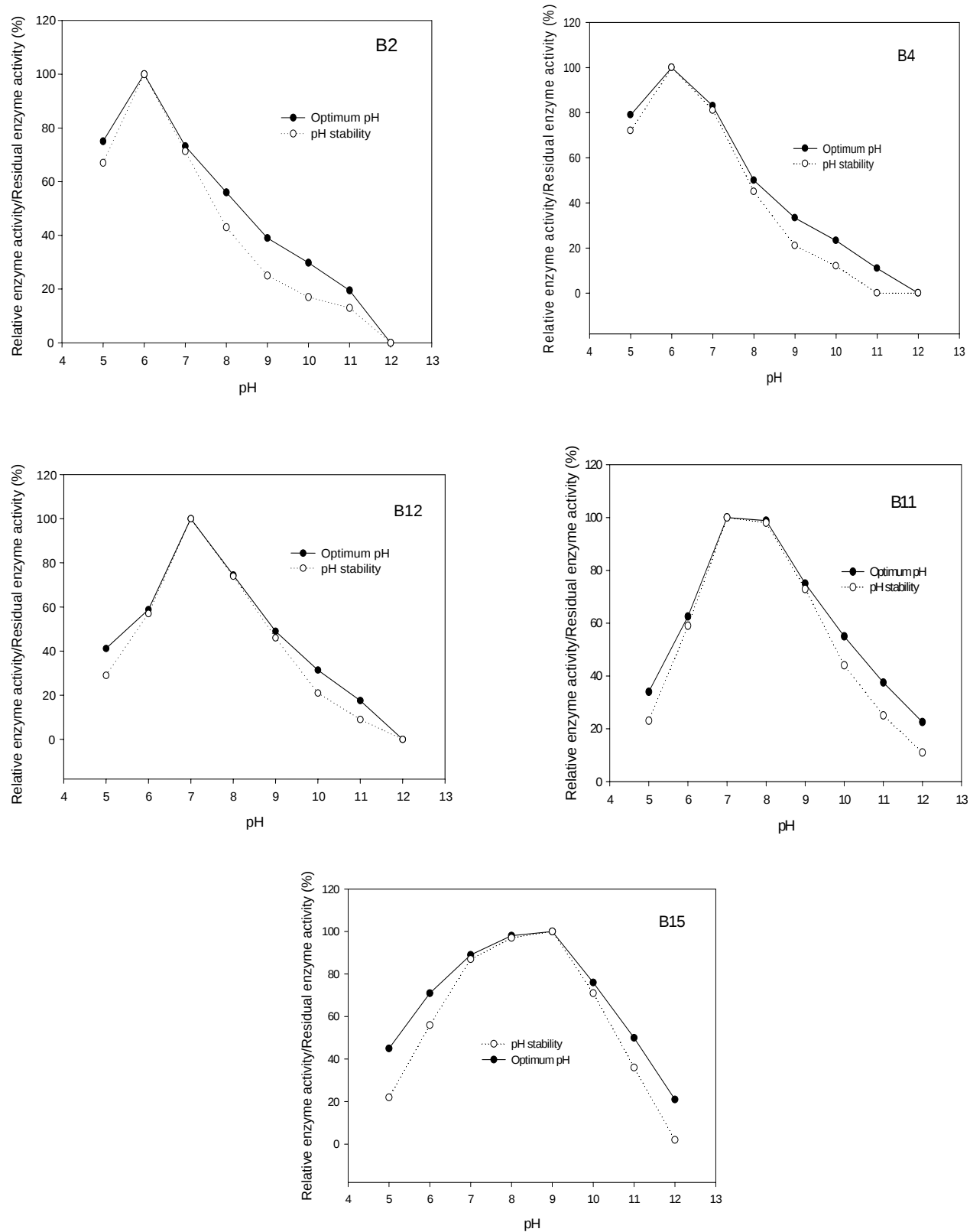


Figure 3. Effect of pH on activity and stability of proteases from *Bacillus* strains

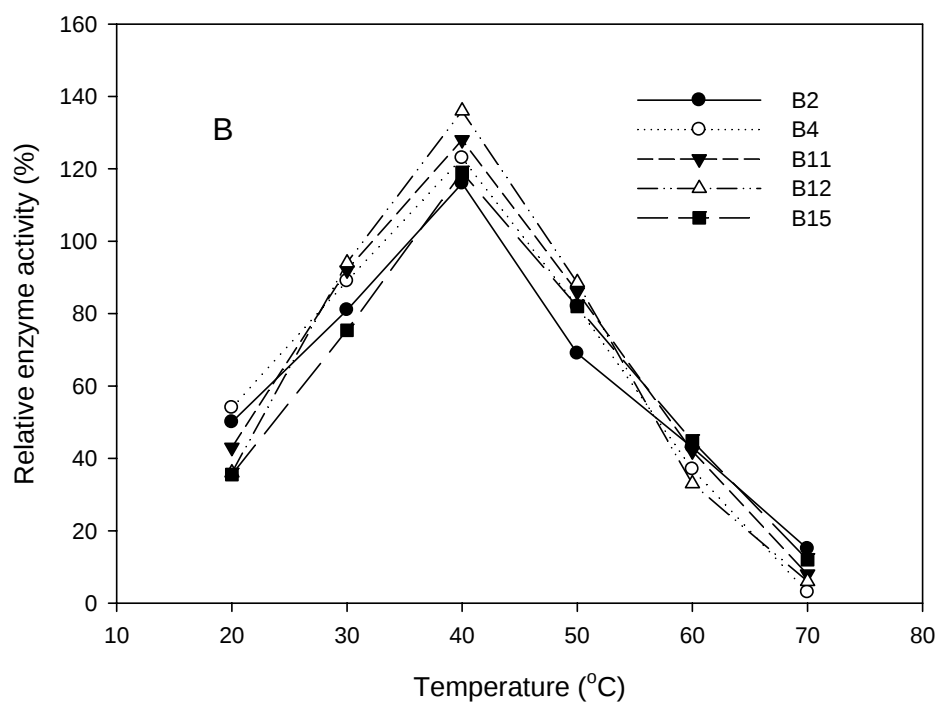
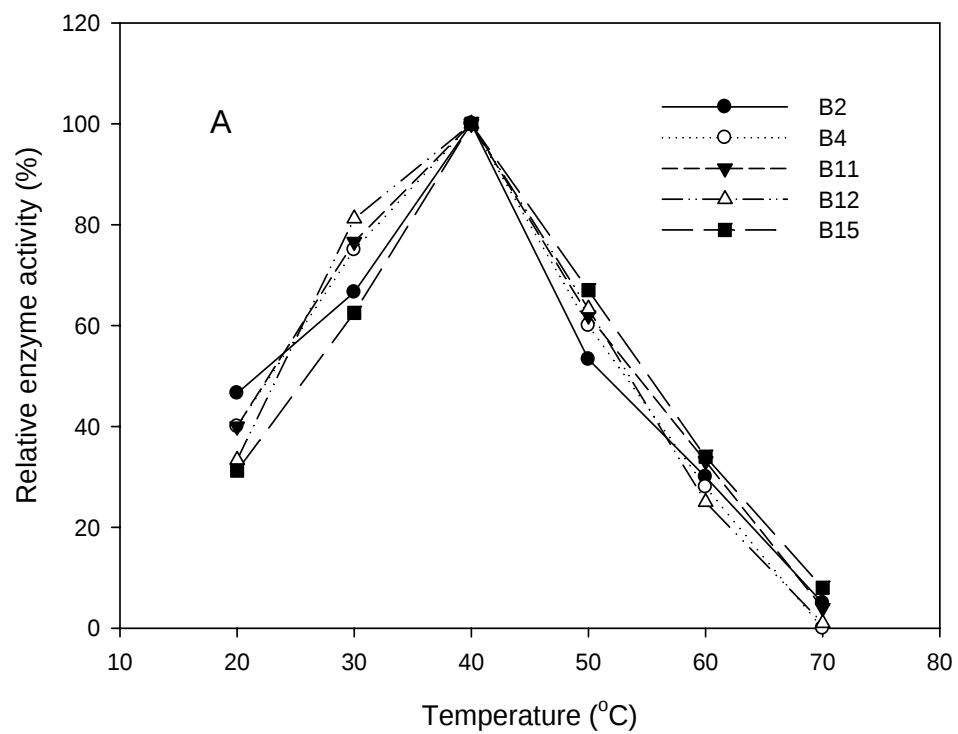


Figure 4. Effect of temperature on the protease activity produced by *Bacillus* strains in the absence (A) and presence (B) of 10 mM CaCl_2 to determine the optimum temperature of the enzyme

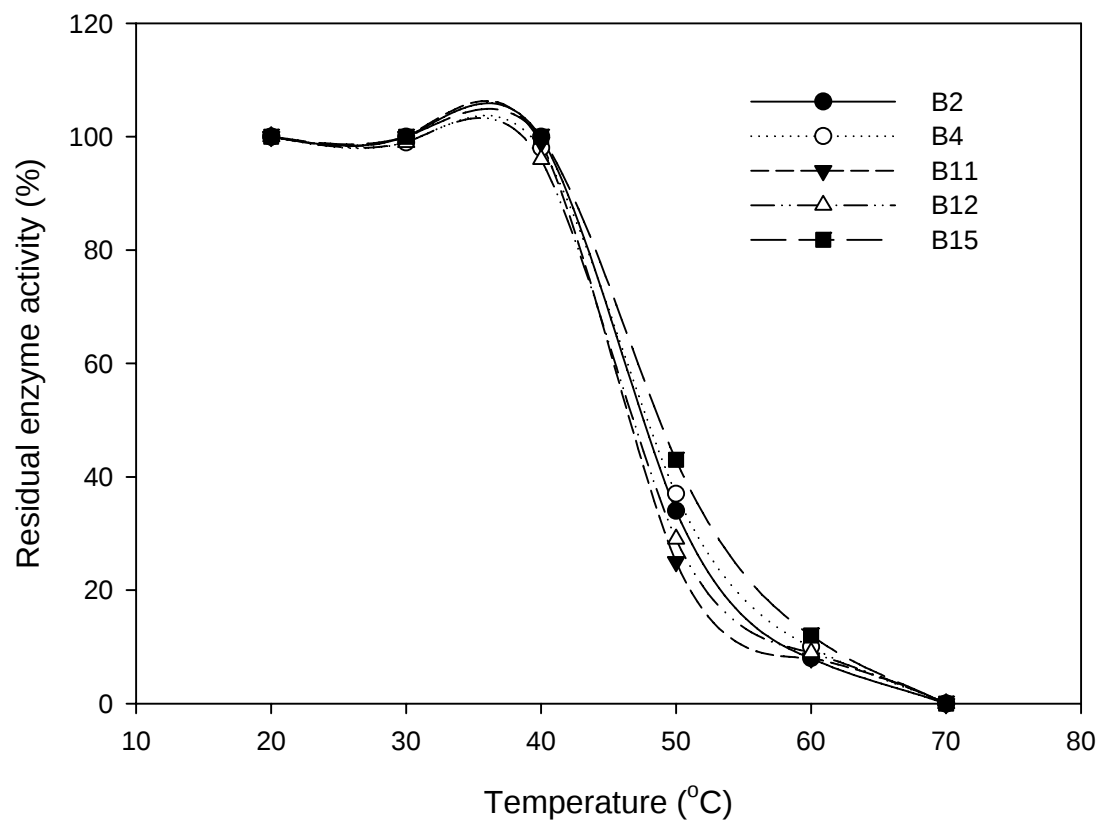


Figure 5. Thermostability of proteases produced by *Bacillus* strains at different temperatures in the presence of 10 mM CaCl_2 after 2 h incubation to determine the temperature stability of the enzyme

Partie II

Comparison of protease activities in different *Bacillus licheniformis* strains using wastewater sludge and synthetic soy medium as raw material

Jyothi bezawada¹, S. Yan¹, R.D Tyagi¹ and R. Y. Surampalli²

¹INRS-ETE, Université du Québec, 490, rue de la Couronne, Québec, Canada G1K 9A9

²USEPA, P.O. Box-17-2141, Kansas City, Kansas, KS 66117

*Communication: **R.D. Tyagi**, E-mail: tyagi@ete.inrs.ca; Phone: (418) 654 2617; Fax: (418) 654-2600

Environmental Technology

31 (1) 63-72

Comparison of protease activities in different *Bacillus licheniformis* strains using wastewater sludge and synthetic soy medium as raw material

Résumé

La production de la protéase extracellulaire par différentes souches de *B.licheniformis* (ATCC 21415, ATCC 21417 et ATCC 21424) a été testée dans les boues des eaux usées en tant que matières premières ainsi que dans le milieu synthétique de soja pour comparer la capacité de production de la protéase par des souches différentes et de comparer la capacité du milieu à fournir des nutriments pour la synthèse de l'enzyme. Toutes les souches ont montré une activité à peu près semblable dans les deux milieux. L'activité de la protéase était très élevée en fermentateur dans les deux différents milieux par rapport à celle dans les erlenmeyers agités. Les résultats de la sélection microbienne ont indiqué que *B. licheniformis* ATCC 21424 possède un grand potentiel pour la production de la protéase utilisant des boues comme milieu de croissance. Cette étude suggère que les boues d'eaux usées pourraient être utilisées comme matière première (source de nutriments) afin de produire des protéases pour des applications industrielles.

Mots clés: *Bacillus licheniformis* 21424; activité de la protéase; boues d'épuration; milieu synthétique de soja

Abstract

The production of extracellular protease by different *Bacillus licheniformis* strains (ATCC 21415, ATCC 21417 and ATCC 21424) was tested in wastewater sludge as a raw material as well as in synthetic soy medium to compare the capacity of protease production by different strains and to compare the capacity of the medium to provide nutrients for enzyme synthesis. All the strains showed almost similar activities in both media. The protease activity was very high in fermenter in both the media compared to shake flask. Results from microbial selection indicated that ATCC 21424 has high potential for protease production using sludge as growth medium. The observation from this study suggested that wastewater sludge could be used as a raw material (nutrient source) to produce protease for industrial application.

Keywords: *Bacillus licheniformis* 21424; protease activity; wastewater sludge; synthetic soy medium

1. Introduction

In Canada, domestic wastewater sludge is generated at high rate of 1 million tons of dry sludge annually during the treatment of the various municipal and industrial wastewaters [1]. In recent years with increasing population and other developments, Canada is facing and will face major problems in managing domestic wastewater sludge [2]. The present practice is either to surface disposal [3] or co-dispose it with other solid wastes at landfill sites or by direct disposal in shallow trenches [4]. However, due to limited land area and the rapid increases in sludge production, the treatment and disposal of sludge will be one of the crucial environmental issues faced by the Canadian government. Therefore, researches are being explored in order to reuse and utilize sludges through bioconversion into value added products before ultimate disposal by reducing sludge quantity and hence the management cost.

Results from many researchers have showed that sludge from domestic wastewater consists of 32% carbon, 3.8% nitrogen, 1.6% phosphorus, 0.05% magnesium, 0.15% potassium and sufficient trace elements which could be used as a raw materials for the production of value added products such as organic acids, fuel, biosolids, biopesticides, biofertilisers or many types of biocatalysts [2,5-8]. The production of proteases as proteolytic enzymes by using different wastes as renewable raw materials other than sludge had been studied in the past [9-12]. The wastewater and wastewater sludge are rich in nutrients such as carbon, nitrogen, potassium [2] and can support growth of various micro-organisms to produce many interesting bio products.

Alkaline proteases are one of the most widely studied group of enzymes because of their wide use in many industrial applications such as food, pharmaceutical and leather [13] and with two-third of share in detergent industry alone [14]. Microbial proteases are gaining more importance than conventional chemicals that cleave peptides because of the low production cost and use of

renewable resources for their production. Microbial proteases can be produced from bacteria, fungi and yeast using many processes like submerged fermentation and solid-state fermentation [15-16, 17-18]. Bacteria of the genus *Bacillus* are active producers of extracellular alkaline proteases.

Different strains of *B. licheniformis* were used for production of protease using substrates such as synthetic medium containing casein, (*B. licheniformis* MIR 29, 71.5 alkaline protease units), complex medium containing soy flour, corn steep liquor and sodium caseinate (*B.licheniformis* DSM 641, 1650 U/ml), soya bean meal medium (*B.licheniformis* UV-9, 1270.20 protease unit /ml) [19-21]. The raw material cost for fermentation product is about 40% of the overall production cost. Hence production of protease from domestic wastewater sludge could reduce the cost of enzyme production [22]. Thus, the purpose of this study was to choose potent protease producing *Bacillus licheniformis* strain that could induce higher levels of protease during wastewater sludge fermentation.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

The chemicals used as reagents for enzyme activity measurements were of analytical grade, obtained from EM Sciences (Ontario, Canada).

2.2 Microorganisms

Bacillus licheniformis strains (ATCC 21415, ATCC 21417 and ATCC 21424) were used in this study. An active culture was maintained by inoculating on nutrient agar plates and incubating at 35°C for 48 h. The plates were stored at 4°C for further use.

2.3 Sludge samples and medium composition

The wastewater secondary sludge samples collected from municipal wastewater treatment of Communauté Urbaine de Quebec (CUQ, Quebec) were used. The physical and chemical characteristics of sludge utilized are given in Table 1. The experiments were conducted at a sludge suspended solids concentration of 30 g/L. The decanted sludge was centrifuged in order to obtain higher suspended solids concentration (30 g/L). The sludge characteristics were measured according to Standard methods [23]. A synthetic soy medium [24] was also used for protease production to compare the results. Following was the composition of the synthetic soy medium [g/L]: glucose - 60; soybean meal - 20; CaCl_2 - 0.3; MgCl_2 - 0.2 with a pH of 7.0.

2.4 Inoculum and cultural conditions

A loopful of bacterial growth from a nutrient agar plate was used to inoculate a 500 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of nutrient broth. Before inoculation, nutrient broth was sterilised at 121°C for 15 min. The flask was incubated in a shaker incubator at 35°C with 220 rpm for 12 h. A 2% (v/v) inoculum from this flask was then inoculated into 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of sterilised synthetic soy medium or sterilised sludge. The flasks were incubated in the same way for 12 h. These actively growing cells were used as inoculum for shake flask and fermenter experiments.

2.5 Shake flask and Fermenter operations

B. licheniformis strains were tested for extracellular alkaline protease production in shake flasks. A 2% (v/v) inoculum was used to inoculate 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml sterilised synthetic soy medium or sterilised sludge [15]. The flasks were incubated in a shaker incubator (New Brunswick) at 220 rpm for 60 h at 35°C. Samples were withdrawn from the

Erlenmeyers at every 3 h intervals for analysis of total cell count, viable spore count, protease activity and specific protease activity. Specific protease activity is defined as the activity of an enzyme per CFU (unit cell number defined as colony forming units or CFU).

A fermenter of 7.5L capacity with 4L working volume of synthetic soy medium and sludge (sterilised at 121°C for 30 min) were separately used for extracellular alkaline protease production to compare with flask level experiments. The medium was inoculated with 2% (v/v) inoculum volume. Temperature and pH of the fermentation medium were controlled at 35°C and 7.5, respectively. To maintain dissolved oxygen concentration above 20% (1.56 mg O₂/L) saturation (critical oxygen concentration) the medium was agitated initially at a speed of 200 rpm and finally increased up to 600 rpm and air flow rate was controlled automatically using a computer controlled system. Samples were withdrawn from the fermenter at every 3 h intervals for the analysis of total cell count, viable spore count, protease activity, specific protease activity and specific growth rate.

2.6 Analytical methods

The culture samples withdrawn at every 3 h intervals were analyzed for total cell count and viable spore count as CFU by serial plating technique in nutrient agar plates. The appropriately diluted samples were plated on nutrient agar plates and incubated overnight at 30°C to form fully developed colonies. For viable spore count, the appropriately diluted samples were subjected to heat treatment at 80°C for 10 min before plating. Correlation of protease activity and viable spore count was analyzed by plotting on semi log plots. Log phase and stationary phase plotted as two separate curves on the same graph.

2.6.1 Protease assay

Protease activity was determined according to the modified method of Kunitz [25]. Samples collected after fermentation were centrifuged at 8000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatant was collected as the crude enzyme source. The supernatant thus obtained was properly diluted with borate buffer, pH 8.2. Protease activity was assayed by incubating 1 ml of properly diluted enzyme solution with 5 ml of casein (1.2% w/v, Sigma-Aldrich Canada Inc) for 10 min at 37°C in a constant temperature water bath. The reaction was terminated by adding 5 ml of 10% (w/v) trichloroacetic acid. This mixture was incubated for 30 min in order to precipitate the total non-hydrolysed casein. At the end of the incubation period, samples as well as blanks were filtered using Whatman filter paper, 934-AH. The absorbance of the filtrate was measured at 275 nm. The validation of the results was established by treating a standard enzyme solution under identical experimental settings where activity was known. One international Protease activity unit (IU) was defined as the amount of enzyme preparation required to liberate 1 μ mol (181 μ g) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37°C. All experiments were conducted in triplicate and the mean value was presented.

3. Results and Discussion

In our preliminary studies, the results indicate that strains selection may render good candidates of *B. licheniformis*, either to expand the alternative media in which these bacteria may be produced industrially, or to combine its use as an enzyme/biomass producer. These strains were selected due to their significant ability to produce proteases. For large-scale fermentation, the use of reasonably cheap raw material as production medium considerably lowers the cost of production. In this context, the secondary sludge is complex material which contains nutritive elements to support the growth of *B. licheniformis* strains and protease production. Synthetic soy

medium is also used as raw material for fermentation under identical settings to compare with sludge.

3.1 Protease production in different media by different *B. licheniformis* strains and microbial selection

To study the biosynthesis of protease by *different B. licheniformis strains*, different growth media (synthetic soy medium or sludge) for alkaline and thermostable extracellular protease production were tested.

3.1.1 Growth and Protease activity production of three strains in synthetic soy medium and sludge medium in shake flask

The results obtained on total cell count, viable spore count, specific growth rate protease activity and specific protease activity of three different *B. licheniformis* strains of both synthetic soy medium and sludge fermentations in shake flask are presented in Figure 1 and Table 2. Total cell count, viable spore count, specific growth rate, protease activity and specific protease activity values were little higher in synthetic soy medium than sludge medium for all strains such as ATCC 21415, ATCC 21417 and ATCC 21424. Maximum total cell count and viable spore count obtained in both synthetic soy medium and sludge for ATCC 21415 were at 42 h and 48 h, for ATCC 21417 were at 42 h and for ATCC 21424 were at 48 h, respectively. The specific growth rate values were almost similar in both media for all strains. The protease activity increased with fermentation time and maximum activity (Table 2) reached in both synthetic soy medium and sludge at 48 h, 42 h, and 48 h for ATCC 21415, ATCC 21417 and ATCC 21424, respectively (Figure 1). ATCC 21424 produced higher total cell count, viable spore count, specific growth rate, protease activity and specific protease activity values as compared to ATCC 21415 and 21417 in both media. The growth (cell and spore) and enzyme activity in the both media were almost same and attained their maximum value almost at the same incubation time.

3.1.2 Growth and protease activity comparison of three strains in synthetic soy medium vs sludge medium in fermenter

Results of total cell count, viable spore count, specific growth rate, protease activity and specific protease activity of three different strains in synthetic soy medium and sludge fermentations in fermenter are presented in Figure 2 and Table 3. For all 3 strains the exponential growth phase lasted approximately for 15 h. The maximum total cell count was achieved in 36-42 h and the maximum viable spore count was reached after 36-48 h of fermentation for all strains and protease activity and specific protease activity were reached higher level after 36, 42 and 48 h of ATCC 21417, ATCC 21424 and ATCC 21415, respectively. There was a reduction in protease activity and specific protease activity after 36-48 h of fermentation for all 3 strains with synthetic soy medium (Figure 2). Protease deactivation could be explained with following reasons. It has been stated in many reports that protease secretion was declined when nutrients became limiting [26-27]. Protease deactivation also due to several other factors such as autodigestion of protease and proteolytic attack by other proteases such as intracellular proteases released in the medium after cell lysis [28]. And finally, protease activity declined when protease deactivation was superior to protease production [17]. From the results, ATCC 21424 produced higher protease activity than ATCC 21415 and ATCC 21417 in synthetic soy medium (Table 3). Also, the dissolved concentration decreased to 25% saturation during growth and enzyme synthesis. Therefore, the significance of decrease of dissolved oxygen is the need for maintaining the dissolved oxygen concentration at the level of 25% of saturation during protease synthesis.

With sludge as production medium, for all three strains the exponential growth phase lasted approximately during 15 h like in synthetic soy medium (Figure 2b). The level of dissolved oxygen gradually decreased to about 21% saturation during growth. The maximum total cell and viable spore count were achieved in 36-42 and 36-48 h, respectively for all strains, like in

synthetic soy medium. Probably these bacterial strains may have different capacity to biodegrade organic materials present in the sludge [29] and hence, may assimilate nutrient compounds differently. ATCC 21424 gave higher total cell and viable spore count than other two strains. As a result, ATCC 21424 has the higher capacity to assimilate both easily biodegradable as well as difficult to biodegrade organic matters in the sludge compared to ATCC 21415 and ATCC 21417. This observation was in agreement with Chenel *et al.* [30], who also reported that the complexity of sludge could stimulate/enhance the protease production and their characteristics by thermophilic bacterial strains.

In sludge, maximum protease activity and specific protease activity were obtained after 36, 42 and 48 h of fermentation for the strains ATCC 21417, ATCC 21424 and ATCC 21415, respectively (Figure 2). Similar to synthetic soy medium, protease activity and specific protease activity were decreased after 36-42 h of fermentation for all 3 strains. Yezza *et al.* [17] also reported that maximum protease activity was attained at 36 h fermentation of *Bacillus thuringiensis* Var Kurstaki using sludge as raw material.

Protease production displayed a lag of almost 9-12 h, with a steady increase in production from 9-48 h, reaching a level of 3.3-12 IU/ml with a maximum specific protease activity ranging 1.6-3.2 (IU/10⁹ cells) in both media for all strains. The maximum total cell count, viable spore count, specific growth rate, protease activity and specific protease activity produced by ATCC 21424 followed by ATCC 21415 and ATCC 21417 in both media (Table 3). All 3 strains produced little higher total cell count, viable spore count, specific growth rate, protease activity and specific protease activity in synthetic soy medium than sludge medium. Tyagi *et al.* [15] observed similar findings in *Bacillus thuringiensis* (biopesticide) fermentation in synthetic soy medium as compared to sludge medium.

There is a slow increase in protease activity during exponential phase of growth in both media but maximum protease activity was reached in stationary phase of growth and continued till 42-48 h of fermentation in both media. Initial lower protease activity may also be a function of lower total cell count in the beginning of fermentation period so that protease activity may present a relation with total cell count. The maximum specific growth rate values were slightly different in synthetic soy medium and sludge with all strains. Brar *et al.* [31] also reported that *B. thuringiensis* produced proteases during the post exponential phase and stationary phase to hydrolyse leftover or residual complex proteins in order to satisfy its nutritional needs. In synthetic soy medium, glucose was rapidly metabolised during exponential phase and it was found that protease production was started when glucose become limited in the medium [14, 32]. Glucose or easily assimilable substrate inhibits the protease production through catabolic repression [32-33] which would explain comparatively a low protease activity during the initial hours of fermentation. In case of sludge at the beginning of fermentation, *B. licheniformis* utilises easily assimilable substrates in the sludge and thus inhibits protease production. A Similar observation was also reported by Yezza *et al.* [17] who found that during *B. thuringiensis* (biopesticide) sludge fermentation protease production occurred only after consumption of easily assimilable substrates. The results indicated that protease produced by ATCC 21424 was greater than that of ATCC 21415 and ATCC 21417 in both media (Tables 2-3).

3.2 Shake flask vs. fermenter

In both shake flask and fermenter, the total cell count, viable spore count, specific growth rate, protease activity and specific protease activity values were found to be little higher in synthetic soy medium than in sludge medium (Figures 1-2, Tables 2-3). The protease activity and specific

protease activity reported in the literature were *B. Subtilis* (protease activity - 59 U/ml [0.32 IU/ml], specific protease activity - 1000 units/mg cell dry weight), *Bacillus* sp. I-312 (protease activity - 4.25 U/ml [0.02 IU/ml] , specific protease activity - 5.48 U/mg) and *B.Mojavensis* (protease activity - 627 U/ml [3.5 IU/ml], specific protease activity - 595 U/mg) [26, 34- 35]. Maximum cell concentration reached in a shorter time in fermenter than shake flask. The improved total cell count, viable spore count concentration and rate of cells production (i.e time to produce maximum cell concentration) in the fermenter could be due to better oxygen transfer. The specific growth rate values were higher whereas protease activity and specific protease activity were very significantly higher in fermenter compared to shake flask in both the media for all strains. This may be due to control of pH and dissolved oxygen concentration in the fermenter. It is also well known from the literature that oxygen transfer rate and pH are the key variables for the production of alkaline proteases [36]. Meunier [37] reported that change of pH inactivated the proteolytic enzymes during growth of *Bacillus* sp. (protease producers) in wastewater sludge in shake flask experiments. On the other hand, the results of protease production in shake flasks usually could not be extrapolated to indicate possible performance in the fermenter [30]. Both physical and biological factors are quite different in fermenters and in shake flasks. Moreover, controls on the reaction in the shake flasks are extremely limited while in the fermenter such controls are almost limitless.

3.3 Correlation of protease activity with viable spore count

The data of protease activity and corresponding viable spore concentration presented in Figure 2 were analyzed by plotting on semi log scale as illustrated in Figure 3. It was clear from the Figure 3 that the proteases were produced in two stages and was proportional to spore concentration. In the first stage, protease activity increased very slowly up to 12 h. In the second

stage, protease activity was increased at a faster rate and reached maximum during stationary phase with all strains irrespective of type of medium. Initially, the protease activity increased slowly due to sufficient amount of available nutrients in the medium. So, the organism utilized these nutrients for their growth and sporulation. Moreover, this slow increase in protease activity initially could also be due to low cell count as said before. Similar observation was done by Yezza *et al.* during *Bacillus thuringiensis* fermentation [17]. In the later part of fermentation, there was a shortage of available nutrients in the medium, microorganisms started secreting proteases to the medium to degrade complex substrate. As there is increase in the available nutrients by degraded substrate using proteases the sporulation also continued. The formation of spore coats requires active synthesis of proteins. The synthesis of protein components occurs by utilizing oligopeptides and amino acids generated through the proteolytic cleavage of simple or complex proteins by extracellular proteases [31]. Moreover, irrespective of the type of medium, protease production followed an exponential relationship with viable spore count for all strains (Figure 3). Hence any changes in viable spore count affected the protease activity which may be attributed to the medium simplicity or complexity. Similarly Robert and Bernlohr reported that there is a correlation between the efficiency of sporulation and the production of protease that poorly sporulating cells produce less proteases whereas cells those are highly efficient in forming spores produces high protease [38]. Alkaline proteases from *B. intermedius* were secreted during the late stationary growth phase, which corresponded to stages V and VI of sporulation suggesting their role in spore formation [39]. In fact, *Bacillus* proteases, especially, the intracellular serine protease A (IspA) were proved to be involved in the formation of spores with the turnover of intracellular proteins [40]. The extracellular proteases are required to hydrolyze the proteins present in the medium for growth/synthesis of new proteins. Likewise, if production

of intracellular and extracellular proteases is altered, the sporulation may be affected and will cause formation and release of immature spores into the medium [31].

Based on above results, the *B. licheniformis* strain ATCC 21424 represented the best option and was selected for subsequent culture. Also, due to its high nutrient contents (carbon, nitrogen and potassium), lower cost, higher and/or comparable values of specific protease activity and protease activity, the wastewater sludge should be considered as a potential raw material for enzyme production by ATCC 21424 in fermenter for future experiments.

4. Conclusion

The results obtained in this study have shown that bacterium *B. licheniformis* ATCC 21424 was able to produce protease enzyme using sludge as a raw material and also produced higher quantity than other two standard strains. The results also indicated that growth and protease activity were higher in fermenter than shake flask. The study has demonstrated the suitability of using cheap and abundant domestic wastewater sludge as raw material for the production of protease and could be explored further for sludge management through its reuse into value added products.

Acknowledgements

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

References

1. Champagne P., Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: A Canadian Perspective, Resources, Conservation and Recycling, doi:10.1016/j.resconrec.2006.09.003 (2006).
2. Barnabé S., Sasseville J.L., Tyagi, R.D., Valéro J.R., Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières? *Vecteur Environnement.*, **36**, 50-62 (2003).
3. Epstein E., land application of sewage sludge and biosolids, *Lewis publishers*, pp 2 -3 (2002).
4. Zain S.M., Basri H., Suja F., Jaafar O., Land application technique for the treatment and disposal of sewage sludge. In: Proceedings of the International Water Association (IWA) Conference on Water and Wastewater Management for Developing Countries, **1**, 401-407. (2001).
5. Lourdes M.D., Montile T., Tyagi R.D., and Valero J.R., Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus Thuringiensis* based biopesticides, *Water Res.*, **35**, 3807–3816 (2001).
6. Alam M.Z., Fakhru'l-Razi A., Molla A.H., Biosolids accumulation and biodegradation of domestic wastewater treatment plant sludge by developed liquid state bioconversion process using a batch fermenter, *Water Res.*, **37**, 3569-3578 (2003).
7. Lachhab K., Tyagi R.D., Valero J.R., Production of *Bacillus Thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration, *Process Biochem.*, **37**, 197–208 (2001).
8. Jamal P., Alam M.Z., Salleh M.R.M., Akib M.M., Sewage treatment plant sludge: a source of potential microorganism for citric acid production, *Am J Appl Sci.*, **2**, 1236–1239 (2005).
9. Disney ribeiro dias., Danielle marques vilela., Marialice Pinto Coelho Silvestre., Rosane Freitas Schwan., Alkaline protease from bacillus sp. Isolated from coffee bean grown on cheese whey, *world j microbial biotechnol.*, **24** 2027-2034 (2008).
10. Shikha., Adhyan sharan., Nadan S. darmwal., Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate, *Bioresource technol.*, **98**, 881-885 (2007).
11. Amare Gessesse., Rajni Hatti-Kaul., Berhanu A. Gashe., Bo Mattiasson., Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather, *enzyme microbial technol.*, **32**, 519-524 (2003).
12. R.S. Prakasham., Ch. Subba Rao., P.N. Sarma., Green gram husk—an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation, *Bioresource technol.*, **97** 1449-1454 (2006).

13. Kumar C.G., Hiroshi T., Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial view point, *Biotechnol. Adv.*, **17**, 561–594 (1999).
14. Sumant P., Beg Q.K., Gupta R., Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology, *Curr Microbiol.*, **44**, 286-290 (2002).
15. Tyagi R.D., Sikati Foko V., Barnabe S., Vidyarthi A., Valero J.R., Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using wastewater as a raw material, *Water Sci Technol.*, **46**, 247-254 (2002).
16. Szekeres A., Kredics L., Antal Z., Kevei F., Manczinger L., Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum* FEMS, *Microbiol Lett.*, **233**, 215-222 (2004).
17. Yezza A., Tyagi R.D., Valero J.R., Surampalli R.Y., Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* grown in waste water sludge, *Process biochem.*, **41**, 794-800 (2006).
18. Agarwal D., Patidar P., Banerjee T., Patil S., Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochem.*, **39**, 977-981 (2004).
19. M. A. Ferrero., G. R. Castro., C. M. Abate., M. D. Baigorõ., F. Sineriz., Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization, *Appl Microbial Biotechnol.*, **45**, 327-332 (1996).
20. Uwe Hftbner., Ulrich bock., Karl Schiigerl., Production of alkaline sedne protease subtilisin Carlsberg by *Bacillus lichenifurmis* on complex medium in a stirred tank reactor, *Appl Microbial Biotechnol.*, **40**, 182-188 (1993).
21. Muhammad Nadeem., Javed Iqbal Qazi., Shahjahan Baig., Effect of Aeration and Agitation Rates on Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis* UV-9 Mutant, *Turk J Biochem.*, **34**, 89-96 (2009).
22. A. Yezza., R.D. Tyagi., J.R. Valero., R.Y. Surampalli., Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermenter, *Bioresource technol.*, **97**, 1850-1857 (2006).
23. APHA, AWWA, WPCF, Standard methods for examination of water and wastewaters, 20th ed, American Public Health Association, Washington, DC, (1998).
24. Viccaro J.P., Alkaline protease, method for its production, and detergent composition, US patent no, 3 748 233 (1973).
25. Kunitz M., Crystalline Soybean trypsin inhibitor, *J Gen Physiol.*, **30**, 291-310 (1947).
26. Qasim Khalil Beg., R.K. Saxena., Rani Gupta., De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations, *Process Biochem.*, **37**, 1103-1109 (2002).

27. Moon S.H., Parulekar S.J., A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*, *Biotechnol Bioeng*, **37**, 467–483 (1991).
28. Chu I.M., Lee C., Li T.S., Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416, *Enzyme Microbial Technol.*, **14**, 755-761 (1992).
29. Tirado-Montiel M.L., Tyagi R.D., Valero J.R., Wastewater treatment sludge as raw material for *Bacillus thuringiensis* production, *Water Res.*, **31**, 3807-3816 (2001).
30. Chenel, J. P., Tyagi, R. D. and Surampalli, R.Y., Production of thermostable protease enzyme in wastewater sludge using thermophilic bacterial strains isolated from sludge, *Water Sci Technol.*, **57**, 639-645 (2008).
31. Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., Barnabé S., Valero J.R., *Bacillus thuringiensis* proteases: production and role in growth, sporulation and synergism, *Process biochem.*, **42**, 773-790 (2007).
32. Kanekar P.P., Nilegaonkar S.S., Sarnaik S.S., Kalka A.S., Optimisation of protease activity of *alkaliphilic bacteria* isolated from an alkaline lake in India, *Bioresource Technol.*, **85**, 87-93 (2002).
33. Haki G.D., Rakshit S.K., Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, *Bioresource Technol.*, **89**, 17–34 (2003).
34. Maria A. Longo., Isabel S. Novella., Luis A. Garcia., Mario Diaz., Comparison of *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* as Protease Producers under Different Operating Conditions, *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, **88**, 35-40 (1999).
35. Han-Seung Joo., Chung-Soon Chang., Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties, *Process Biochem.*, **40**, 1263-1270 (2005).
36. Anwar A., Saleemudin M., Alkaline proteases: a review, *Bioresour Technol.*, **64**, 175-183. (1997).
37. Meunier N. E., Valuation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales, M.Sc Thesis, INRSETE, University of Quebec, Canada, 1-168 (1999).
38. Robert W., Bernlohr P., Postlogarithmic phase metabolism of sporulating microorganisms, *the journal of biological chemistry.*, **239**, 538-543 (1964).
39. Balaban N.P., Gabdrakhmanova L.A., Sharipova M.R., Mardanova A.M., Sokolova E.A., Rudenskaya G.N., Proteinases from *Bacillus intermedius* secreted in the late stages of sporulation, *Med Sci Monitor.*, **8**, 168-171 (2002).
40. Chen F.C., Shen L.F., Tsai M.C., Chak K.F., The IspA protease's involvement in the regulation of the sporulation process of *Bacillus thuringiensis* is revealed by proteomic analysis, *Biochem Biophys Res Commun.*, **312**, 708-715 (2003).

Table 1. Physical and chemical characteristics of secondary sludge.

Characteristics	Concentration
Physical characteristics:	
Total solids (g L ⁻¹)	28 ±1.2
Volatile solids (g L ⁻¹)	17 ±0.6
Suspended solids (g L ⁻¹)	20 ±0.8
Volatile suspended solids (g L ⁻¹)	16 ±0.6
pH	5.6 ±0.2
Chemical characteristics:	
Total carbon (% dry total solids)	38.22 ±1.5
Total nitrogen (% dry total solids)	5.46 ±0.2
Ammonical nitrogen (mg N/kg)	673 ±21.5
Total phosphorus (mg P/kg)	12 320 ± 41
Orthophosphates (mg P/kg)	7 760 ± 23.1
Metals (in mg/kg) (dry basis):	
Al ³⁺	13 506 ±42.1
Ca ²⁺	16 100 ±45.2
Cd ²⁺	3.4 ±0.15
Cr ³⁺	69 ±2.2
Cu ²⁺	259 ±8.95
Fe ²⁺	10 495 ±31.2
Mg ²⁺	1863 ± 61.5
Mn ²⁺	194 ±6.7
K ⁺	1750 ±55.5
Pb ²⁺	64 ±2.4
Zn ²⁺	498 ±15.9

All the experiments were conducted in triplicates and standard errors were always less than ±5%

Table 2. Extracellular protease production of *B. licheniformis* strains in different media (Shake flask).

Strain	Maximum total cell count (CFU/ml)	Maximum viable spore count (CFU/ml)	Specific growth rate μ_m (h ⁻¹)	Maximum protease activity (IU/ml)	Maximum specific protease activity (IU/10 ⁹ cells)
Synthetic soy medium					
ATCC 21415	1.8 ±0.08x10 ⁹ (42 h)*	2.4 ±0.12x10 ⁸ (48 h)*	0.31±0.01	2.4 ±0.11 (48 h)*	1.5 ±0.07 (48 h)*
ATCC 21417	1.5 ±0.07x10 ⁹ (42 h)	1.6 ±0.08x10 ⁸ (42 h)	0.30±0.01	2 ±0.1 (42h)	1.3 ±0.06 (42 h)
ATCC 21424	2.1 ±0.1x10 ⁹ (48 h)	2.2 ±0.11x10 ⁸ (48 h)	0.34 ±0.01	3.3 ±0.16 (48 h)	1.6 ±0.08 (48 h)
Sludge					
ATCC 21415	1.7 ±0.07x10 ⁹ (42 h)*	2.3 ±0.11x10 ⁸ (48 h)*	0.30 ±0.01	2.3 ±0.11 (48 h)*	1.4 ±0.06 (48 h)*
ATCC 21417	1.4 ±0.06x10 ⁹ (42 h)	1.5 ±0.07x10 ⁸ (42 h)	0.30 ±0.01	1.7 ±0.08 (42 h)	1.2±0.06 (42 h)
ATCC 21424	2.3 ±0.11x10 ⁹ (48 h)	2 ±0.1x10 ⁸ (48 h)	0.33 ±0.016	3.1 ±0.15 (48 h)	1.5 ±0.07 (48 h)

* (optimum incubation time)

All the experiments were conducted in triplicates and standard errors were always less than ±5%

Table 3. Extracellular protease production of *B. licheniformis* strains in different media (fermentor).

Strain	Maximum total cell count (CFU/ml)	Maximum viable spore count (CFU/ml)	Specific growth rate μ_m (h ⁻¹)	Maximum protease activity (IU/ml)	Maximum specific protease activity (IU/10 ⁹ cells)
Synthetic soy medium					
ATCC 21415	3 ±0.15x10 ⁹ (42 h)*	4.2 ±0.2x10 ⁸ (48 h)*	0.32 ±0.01	7.5 ±0.25 (48 h)*	2.5 ±0.11 (48 h)*
ATCC 21417	2.5 ±0.12x10 ⁹ (36 h)	3.5 ±0.16x10 ⁸ (36 h)	0.35 ±0.01	4.5 ±0.2 (36 h)	1.8 ±0.09 (36 h)
ATCC 21424	4 ±0.17x10 ⁹ (36h)	4.5 ±0.18 x10 ⁸ (42 h)	0.38 ±0.019	12 ±0.3 (42 h)	3.15±0.014 (42h)
Sludge					
ATCC 21415	2.7 ±0.12x10 ⁹ (42 h)*	3.4 ±0.14x10 ⁸ (48 h)*	0.33 ±0.015	6 ±0.2 (48 h)*	2.3 ±0.11 (48 h)*
ATCC 21417	2 ±0.1x10 ⁹ (36 h)	3.1 ±0.13x10 ⁸ (36 h)	0.38 ±0.014	3.3 ±0.15 (36 h)	1.6 ±0.08 (36 h)
ATCC 21424	3.7 ±0.16x10 ⁹ (42 h)	3.8 ±0.17x10 ⁸ (42 h)	0.37 ±0.016	11 ±0.4 (42 h)	2.9 ±0.12 (42 h)

* (optimum incubation time)

All the experiments were conducted in triplicates and standard errors were always less than ±5%

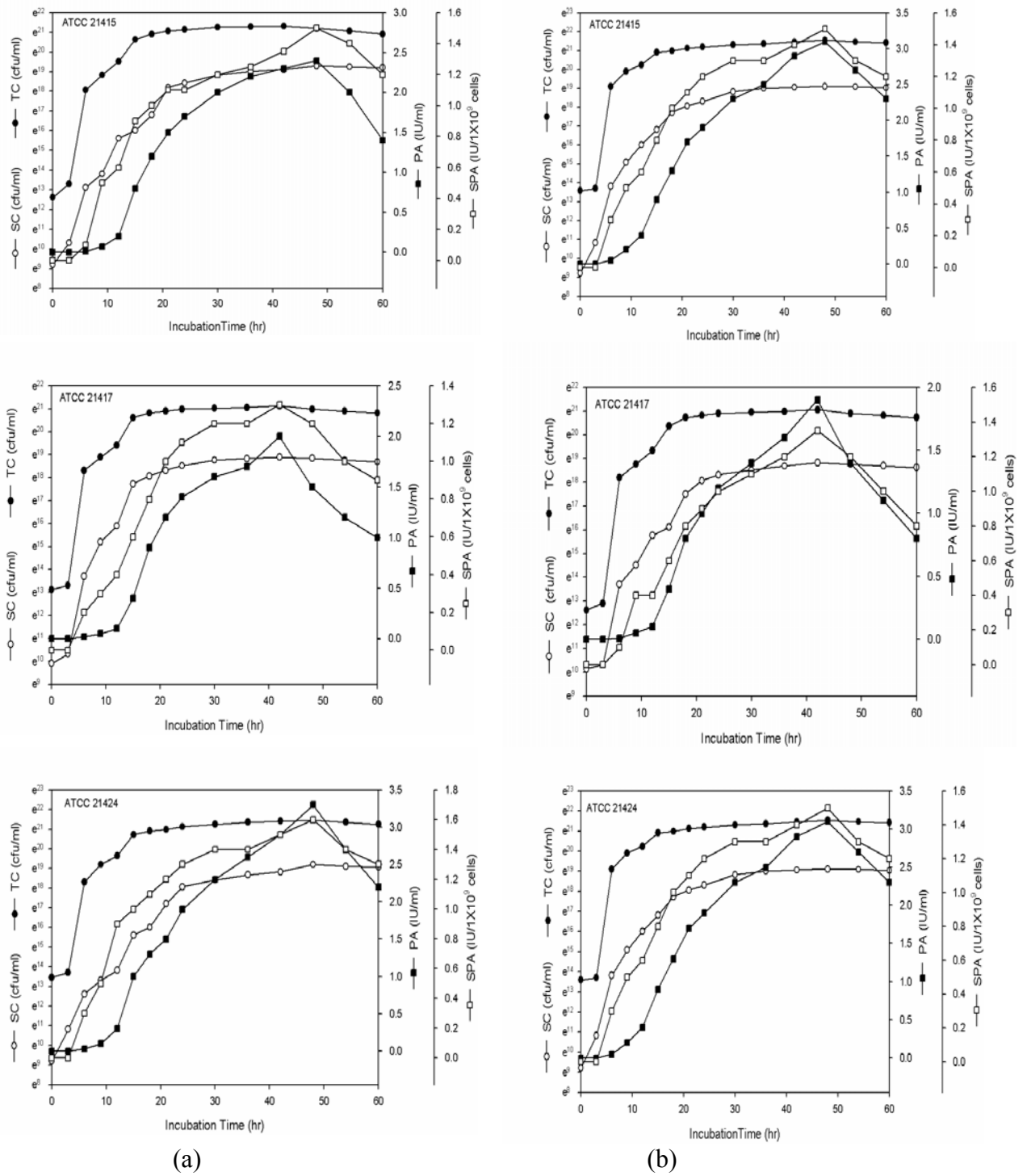


Figure 1. Protease production by *B. licheniformis* strains using synthetic soy medium (a) and sludge (b) as raw material in shake flask. (TC- total cell count, SC- spore count, PA- protease activity and SPA- specific protease activity)

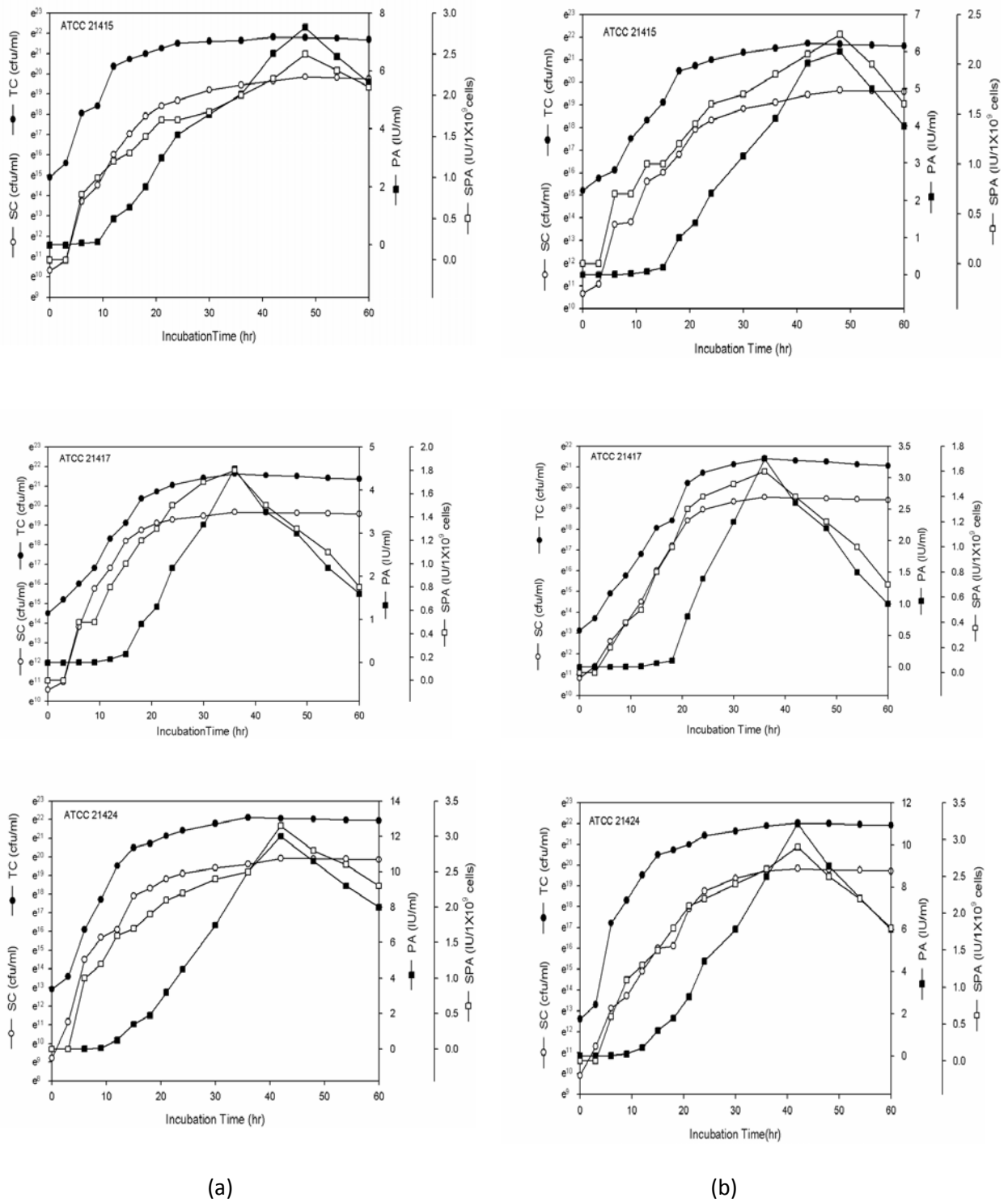


Figure 2. Protease production by *B. licheniformis* strains using synthetic soy medium (a) and sludge (b) as raw material in fermenter. (TC- Total cell count, SC - spore count, PA- Protease activity and SPA- Specific protease activity)

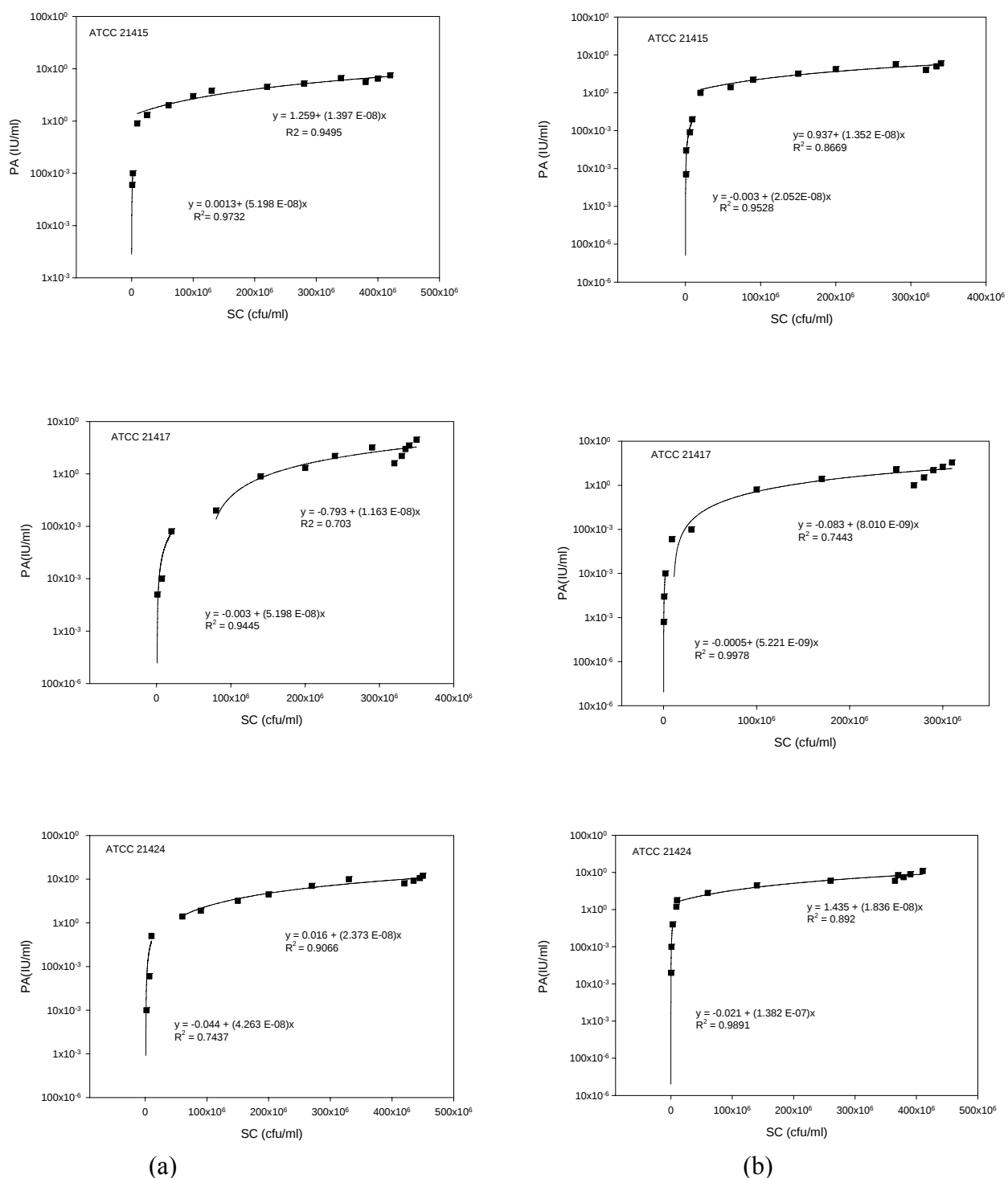


Figure 3. Correlation of protease activity with viable spore count count of different media [synthetic soy medium (a) and sludge (b)] in fermenter by different *B. licheniformis* strains. (SC- spore count, PA- Protease activity)

CHAPITRE 3

INFLUENCE DES SOURCES DE CARBONE ET D'AZOTE SUR L'AMÉLIORATION DE LA PRODUCTION DE LA PROTÉASE ALCALINE

Augmentation of protease production by supplementing carbon and nitrogen sources to wastewater sludge medium

Jyothi Bezawada¹, S.Yan¹, Rojan P. John¹, R.D Tyagi¹ and R.Y. Surampalli²

¹INRS-ETE, Université du Québec, 490, rue de la Couronne, Québec, Canada G1K 9A9

²USEPA, P.O. Box-17-2141, Kansas City, Kansas, KS 66117

*Communication: **R.D. Tyagi**, E-mail: tyagi@ete.inrs.ca; Phone: (418) 654 2617; Fax: (418) 654-2600

Journal of Residuals Science and Technology

7 (3) 161-172

Augmentation de la production de la protéase par addition de sources de carbone et d'azote à un milieu des boues d'épuration

Résumé

La production de la protéase alcaline par *B. licheniformis* ATCC 21424 en utilisant des boues d'épuration supplémentées par une source de carbone (glucose, maltose, le lactose, le fructose et l'amidon) et d'azote (farine de soja, acides casaamino, peptone et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a été étudiée pour améliorer sa production. L'ajout de lactose 1,5% (p/v) comme source de carbone et de tourteau de soja 1,5% (p/v) comme source d'azote a permis une meilleure production de protéase à la fois dans le fermenteur et les fioles. Les valeurs des paramètres contrôlés tels que, le nombre de cellules total, le nombre de spores, μ_{max} , l'activité de la protéase et l'activité spécifique obtenus dans le fermenteur ont plus élevés que celles dans la fiole agitée. L'activité de la protéase dans le fermenteur (15 UI/ml) a été 2,6 fois plus élevée que celle dans la fiole (5,7 UI/ml).

Mots clés : augmentation de la protéase; la supplémentassions en carbone; un supplément d'azote; les eaux usées des boues; gestion des boues; *Bacillus licheniformis*.

Abstract

The production of alkaline protease by *B. licheniformis* ATCC 21424 using wastewater sludge supplemented with different carbon (glucose, maltose, lactose, fructose and starch) and nitrogen (soya bean meal, casaamino acids, peptone and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) sources was investigated to enhance its production. Lactose 1.5% (w/v) as carbon source and 1.5% (w/v) soybean meal as nitrogen source has given highest protease production in both shake flask and fermenter among all carbon and nitrogen sources tested. Controlled parameters in the fermenter gave higher total cell count, spore count, μ_{max} , protease activity and specific activity compared to shake flask experiments. Protease activity in fermenter (15 IU/ml) was 2.6 times higher than that of shake flask (5.7 IU/ml).

Keywords: Protease augmentation, Carbon supplementation, Nitrogen supplementation, Wastewater Sludge, Sludge management, *Bacillus licheniformis*

1. INTRODUCTION

Proteases are biological catalysts that hydrolyze the peptide bonds in the polypeptide chain to lower molecular weight peptides and amino acids and have been studied widely [1]. Proteases are present in all organisms and play important roles in different physiological conditions, catalyzing various metabolic reactions. Among all enzymes, proteases are the most important industrial enzymes accounting for nearly 60% of the industrial market in the world [2]. Alkaline proteases are robust enzymes [3] and they have got several considerable industrial important applications in detergent industry, leather processing, silver recovery, medical purposes, food processing, feeds, meat tendering, brewery and chemical industry as well as waste treatment [4, 5]. Alkaline proteases are also capable enough to contribute to high value added products development because of their characteristic nature of aided digestion [6]. It is a well known fact that the most interesting source of proteases is microorganisms because of their broad biochemical diversity and bioengineering potentiality [7]. One of the largest classes of industrial enzymes is microbial proteases those accounting for approximately 40% of the total worldwide enzyme market [8].

Wide range of microorganisms including bacteria, moulds, yeasts and also mammalian tissues produce alkaline proteases. *Bacillus* sp. are quite effective producers of extracellular protease among all bacterial species [9, 10]. These enzymes are used as cleansing additives in detergents to facilitate the release of proteinacious materials in stains of dirt, blood, milk, etc [9].

Fermentation is the process where organisms have been exploited to produce desirable metabolic products including enzymes by providing simulated conditions such as media, temperature, pH etc. Media rich in complex nitrogen sources can enhance the production of proteases under optimum conditions. Generally submerged fermentations are in use for the production of alkaline

proteases owing to its obvious advantages in consistent enzyme production characteristics with defined medium and process conditions. Solid state fermentation processes have also been studied to a lesser extent for production of these enzymes [6, 9, 11].

Optimization of medium composition has been carried out to maintain a balance between the various medium components, hence minimizing the amount of unutilized components at the end of fermentation. Cost-effectiveness is an important factor to be considered while developing a production medium [9, 2]. Considering the promising applicability of the alkaline protease, it should be produced in high yields using a low-cost medium. This can be achieved by using zero cost wastewater sludge as raw material. And it is as efficient as synthetic medium as we have already investigated in one of our earlier works [12]. Though wastewater sludge is a good source of nutrient medium for growth of *B. licheniformis* and production of enzymes, due to its complex nature and some non-bioavailable and/or limited carbon availability, sludge may not provide sufficient amounts of readily available nutrients for initial performance of the organism [13]. Besides this, it is also very well known from literature that extracellular protease production in microorganisms is significantly influenced by media components, particularly carbon and nitrogen sources [14, 15]. So, supplementation of optimized carbon and nitrogen sources to the sludge medium could further enhance enzyme production.

The protocols optimized for the production of protease cannot be extended from one strain to another as the fermentation process because nutritional requirements are complex and different for each individual strain. Similarly, optimum conditions determined for enzyme production cannot be extended from semi-synthetic medium to sludge (as a raw material) medium. Therefore, it was necessary to investigate the effect of different nutrients (carbon and nitrogen)

to find out their sources and their optimum concentrations for the maximum protease production employing *B. licheniformis* using wastewater sludge as raw material

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Enrichment media and chemicals (analytical grade) used as reagents for enzyme activity measurements were obtained from Fisher Scientific, Canada.

2.2 Microorganisms

B. licheniformis strain (ATCC 21424) was used in this study. An active culture was maintained by inoculating on nutrient agar plates and incubating at 35°C for 48 h. The plates were stored at 4°C for later use.

2.3 Sludge samples and medium composition

The secondary wastewater sludge samples collected from municipal wastewater treatment of Communauté Urbaine de Quebec (CUQ, Quebec) were used. The decanted sludge was centrifuged in order to obtain higher suspended solids concentration (30 g/L). The experiments were conducted at a sludge suspended solids concentration of 30 g/L. The physical and chemical characteristics of sludge were measured according standard methods (Method numbers: total solids- 2540A, suspended solids-2540D, volatile and volatile suspended solids-2540E, total carbon-5310, total nitrogen- 4500-N, ammonical nitrogen- 4500-NH₃, total phosphorous- 4500-P and metals- 3500) [16].

2.4 Inoculum and cultural conditions

A loopful of bacteria growth from a nutrient agar plate was used to inoculate a 500 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of nutrient broth. Before inoculation, nutrient broth was sterilised at 121°C for 15 min. The flask was incubated in an incubating shaker (New Brunswick) at 35°C with 220 rpm for 12 h. A 2% (v/v) inoculum from this flask was then inoculated into 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of sterilised sludge. The flasks were incubated in the same way for 12 h. These actively growing cells were used as inoculum for shake flask and fermenter experiments.

2.5 Shake flask experiments

B. licheniformis strains were tested for extracellular alkaline protease production in shake flasks. A 4.5% (v/v) inoculum was used to inoculate 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml sterilised sludge supplemented with different carbon and nitrogen sources [17]. CaCO_3 (0.5%) was also added for the better control of pH. The flasks were incubated in a shaker incubator (New Brunswick) at 220 rpm for 60 h at 35°C. Samples were withdrawn from the Erlenmeyers at every 3 h intervals for analysis of total cell count, viable spore count, protease activity and specific activity (Specific activity is measured as per total protein).

2.5.1 Carbon sources

Different carbon sources were tested for alkaline protease production. Sludge was supplemented with final concentration 1% (w/v) of glucose, starch, maltose, fructose and lactose. Different flasks containing sludge supplemented with different carbon sources were sterilized and inoculated with 4.5% (v/v) of inoculum separately. Inoculated flasks were incubated at 35°C for 48 h in shaker incubator. In order to know optimum concentration of lactose, different

concentrations of lactose from 0.5%-3% (w/v) were added to sludge and the experiments for enzyme production were conducted as described above.

2.5.2 Nitrogen sources

Different nitrogen sources were tested for alkaline protease production. Sludge was supplemented with final concentration of 0.5% (w/v) of soybean meal, peptone, casaamino acids and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Different flasks containing sludge supplemented with nitrogen sources were sterilized and then inoculated with 4.5% (v/v) of inoculum. Inoculated flasks were incubated at 35°C for 48 h in shaker incubator. In order to determine optimum concentration of soybean meal sludge was fortified with different concentrations of soybean meal (0.5%-3% w/v) and the experiments were conducted as previously described.

2.6 Fermenter experiments

A fermenter of 7.5 L capacity with 4 L working volume of sludge supplemented with 1.5% soybean meal and 1.5% lactose (sterilised at 121°C for 30 min) was used for extracellular alkaline protease production to compare with flask level experiments. The medium was inoculated with 4.5% (v/v) inoculum volume. Temperature and pH of the fermentation medium were controlled at 35°C and 7.5, respectively. To maintain dissolved oxygen concentration above 20% (1.56 mg O_2/L) saturation (critical oxygen concentration), the medium was agitated initially at a speed of 200 rpm and finally increased up to 500 rpm and air flow rate was controlled automatically using a computer controlled system. Samples were withdrawn from the fermenter at every 3 h intervals for the analysis of total cell count, viable spore count, protease activity, specific activity.

2.7 Analytical

The culture samples withdrawn at every 3 h intervals were analyzed for total cell count and viable spore count as CFU by serial plating technique in nutrient agar plates. The appropriately diluted samples were plated on nutrient agar plates and incubated overnight at 35°C to form fully developed colonies. For viable spore count, the appropriately diluted samples were subjected to heat treatment at 80°C for 10 min before plating.

2.7.1 Protease assay

The samples collected during fermentation and after fermentation were centrifuged at 8000 rpm for 15 min at 4°C and the supernatant was collected as the crude enzyme source. Protease activity in the supernatant was determined according to the modified method of Kunitz [18]. The supernatant thus obtained was properly diluted with borate buffer, pH 8.2. Protease activity was assayed by incubating 1 ml of properly diluted enzyme solution with 5 ml of casein (1.2% w/v, Sigma-Aldrich Canada Inc) for 10 min at 37°C in a constant temperature water bath. The reaction was terminated by adding 5 ml of 10% (w/v) trichloroacetic acid. This mixture was incubated for 30 min in order to precipitate the total non-hydrolysed casein. At the end of the incubation period, samples as well as blanks were filtered using Whatman filter paper, 934-AH. The absorbance of the filtrate was measured at 275 nm. The validation of the results was established by treating a standard enzyme solution under identical experimental settings where activity was known. One international protease activity unit (IU) was defined as the amount of enzyme preparation required to liberate 1 μ mol (181 μ g) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37°C. All experiments were conducted in triplicate and the mean value was presented.

2.7.2 Protein estimation

Protein of the enzyme solution was measured by method of Bradford [19] using bovine serum albumin (BSA) as a standard and with a spectroscopic measurement of the absorbance at 595 nm.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effect of carbon source on enzyme production

Different carbon sources such as glucose, maltose, lactose, fructose and starch were supplemented with sludge medium for alkaline protease production in shake flask experiments and compared with control experiments those are carried out using sludge medium alone. The composition of sludge is given in Table 1 and sludge contains nutrients such as C, N, P and other essential elements. Certain metals such as Zn, Mn, and Fe are essential for bacterial growth. Zn stimulates growth of bacteria and Fe plays an important role in the transport of electrons and acts as a cofactor for many enzymatic reactions. Ca and Mg are also vital elements in sludge as Ca stimulates growth of bacteria and Mg acts as an enzymatic regulator [20]. Profiles of total cell count, viable spore count, protease activity and specific activity obtained in shake flask experiments were presented in Figure 1. Maximum cell count, spore count, protease activity and specific activity occurred at 42 h for all the carbon sources tested. Cells and spores were increased exponentially until 18 h and then continued to increase slowly until 42 h. Enzyme activity and specific activity increased with fermentation time, then reached maximum at stationary phase and then declined towards the end of the process (Figure 1). Among all carbon sources, lactose revealed the highest total cell count ($2 \pm 0.1 \times 10^{10}$), spore count ($1.7 \pm 0.08 \times 10^9$), maximum specific growth rate ($\mu_{\max}$) (0.33 ± 0.013), protease activity (3.8 ± 0.16) and specific activity (2.2 ± 0.1) followed by fructose glucose, maltose and starch (Table 2). Total cell count

was higher when $\mu_{\max}$ values are higher. This is in agreement with the results of previous reports [21, 22], who also observed the higher $\mu_{\max}$ values with higher total cell concentration. According to these results different carbon sources gave different final alkaline protease activity at the end of the process. Maximum protease activity was observed when sludge was fortified with lactose (Table 2). Several authors also reported that lactose was a very good carbon source for enhancement of protease activity when supplemented 4% (w/v) lactose in basal medium (extracted soybean cake 50 g/L; ammonium phosphate 10 g/L; and KCl 0.3 g/L) and 1% (w/v) lactose in basal medium (peptone 10g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g/L; KH_2PO_4 0.5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/l; NaCl 1.0 g/L and glycerol 10 ml/L) respectively. [1, 23]. However, lactose showed a decrease of protease yield in case of Chu [24]. This could be due to the fact that utilization of different carbon sources varies from microbe to microbe and also because lactose is a suitable carbon source for *B. licheniformis* ATCC 21424 where as maltose is suitable carbon source for *Bacillus* sp. APP1 to obtain higher alkaline protease activity. On the other hand, slight increase in protease activity and specific activity than control was observed with glucose (Table 2), but it supported better growth (highest maximum specific growth rate and high cell concentration) of the bacteria. This is further supported by the findings of Guangrong *et al.* [25] who stated that simple sugars could be a good carbon source for growth of bacteria. Our results clearly showed that glucose (1%) was not a repressor of protease enzyme for this particular bacterial strain which was in contrast to the reports of Rahman *et al.* [26] and Sen and Satyanarayana [27] who suggested catabolic repression of protease synthesis by glucose. Maltose did not have any impact on protease synthesis and also there was 1 log cycle reduction of total cell count compared to lactose, where as starch fortification to sludge exhibited a substantial decrease in protease activity, specific protease activity and total cell count (2 log cycles

reduction compared to lactose). This may be due to the fact that the presence of starch in the sludge medium might have induced the production of amylase instead of protease enzyme. Anbu *et al.* [8] also found that starch slightly suppressed protease enzyme production from *Shewanella oneidensis* MR-1.

The results obtained on growth and enzyme production by supplementing sludge with different concentration of lactose (0.5% to 3% w/v) are illustrated in Figure 2. Total cell count, spore count, protease activity and specific activity reached maximum at 42 h for all the concentrations of lactose. Among all concentrations, total cell count, spore count, $\mu_{\max}$, enzyme activity and specific activity were higher at 1.5% (w/v) lactose concentration (Table 2). Other researchers reported that 1% (w/v) lactose in shake flask experiments using *pseudomonas aeruginosa* strain K at pH 7 and temperature 37°C with 2.61 fold increase in activity [1] and 4% (w/v) lactose in shake flask and fermenter experiments using *B. licheniformis* ATCC 21415 with pH 10 and temperature 37°C produced high enzyme activity (37.8 IU/ml) [23]. This could be due to fact that optimum nutrient concentration (carbon or nitrogen) for higher protease production was different from one microbe to another and also depends on the organisms metabolizing capacities [8, 28]. Further, fortification of sludge with 2%, 2.5% and 3% lactose revealed decrease in enzyme activity, respectively (Table 2) and could be attributed due to the fact that higher concentration of nutrients might cause inhibition of enzyme synthesis. Protease production is known to be sensitive to repression by higher concentration of readily available carbon sources in the medium. And it is supported by other researchers [9, 29].

3.2. Effect of nitrogen source on enzyme production

The results of total cell count, viable spore count, protease activity and specific protease activity obtained when sludge was supplemented with different nitrogen sources were presented in

Figure 3 and were found to be higher at 42 h for all the nitrogen sources tested. Viable cells and spores increased exponentially until 18 h and then continued to increase slowly until 42 h. Protease activity and specific protease activity increased with fermentation time, attained maximum at stationary phase and then declined towards the end of fermentation (Figure 3). All nitrogen sources tested had different impacts on enzyme production and results also revealed that complex organic nitrogen sources supported the faster growth and higher alkaline protease production than inorganic nitrogen sources. Among all nitrogen sources used, both soybean meal and casaamino acids exhibited significant effect on the production of alkaline protease enzyme and had given highest cell count, spore count, $\mu_{\max}$, protease activity and specific protease activity respectively (Table 3). Though both (soybean meal and casaamino acids) had showed better growth and protease activity, soybean meal was chosen for further study because of its inexpensive and readily available nature. In earlier studies, Bhavna and Gupta [30] also replaced casaamino acids with soybean meal which was 50 times less expensive than casaamino acids. This confirms earlier findings that complex nitrogen sources are needed for better alkaline protease production [1, 6, 28] and several other reports on soybean meal as an enhancer for protease production [24, 25, 31]. Peptone enhanced the growth and protease production to certain extent, but $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ drastically reduced growth as well as protease enzyme production. This was due to the fact that ammonium sulphate would be attributed to fast release of ammonia in the medium [8, 28, 32]. The released ammonium ion might interfere with the utilization and metabolism of peptides through catabolite repression, consequently suppressing bacterial sporulation and thus reducing alkaline protease production indirectly [33]. On the contrary, Sinha and Satyanarayana [34] suggested that alkaline protease production from thermophilic

B. licheniformis was significantly higher with inorganic nitrogen sources such as ammonium sulphate and ammonium nitrate.

Different concentrations of best nitrogen source (soybean meal) from 0.5% to 3% (w/v) were supplemented with sludge and subjected to alkaline protease production and results thus obtained were demonstrated in Figure 4 and Table 3. Sludge fortified with 1.5% (w/v) of soybean meal had produced highest cell count, spore count, $\mu_{\max}$, alkaline protease and specific activity (Table 3) at 42 h than other concentrations of soya bean meal. Similar findings were reported by Joo *et al.* [32] who also observed the highest protease production (0.64 IU/ml) with 1.5% (w/v) soybean meal concentration supplemented with medium containing 1% (w/v) casein and 0.5% (w/v) potassium phosphate using *Bacillus horikoshii* in shake flasks at pH 9.0 and temperature of 34°C. The current study is further supported by several other findings; Nilegaonkara *et al.* [35] reported that 1% (w/v) soybean meal as optimum for maximum enzyme production (0.69 IU/ml) using *Bacillus cereus* MCM B-326 in shake flasks with pH 9 and temperature 30°C and Sutar *et al.* [36] found 4% (w/v) soybean meal concentration as optimum for protease production (20.1 U/ml) from *Conidiobolus coronatus* in shake flasks at pH 7 and temperature 30°C. This suggests that optimum nutrient concentration for high protease production varies from organism to organism due to their different metabolic capacities and also depends on composition of medium [6, 8, 28]. Protease production also depends on suitable medium ingredients for the source of carbon and nitrogen and the enzyme production could be increased by adequate concentration of medium ingredients. Likewise, fortification of sludge with suitable nutrients was required because sludge might not provide sufficient amounts of suitable nutrients for optimum growth and protease production or all carbon and nitrogen may not be readily available

for growth and enzyme production. It is known that a large part of carbon and nitrogen content of sludge is not available for microbial growth [13].

3.3 Validation of optimal concentration of carbon and nitrogen sources for enzyme production in the shake flask and fermenter

Optimum concentration of 1.5% (w/v) lactose and 1.5% (w/v) soybean meal were supplemented with sludge together in shake flask to check their effect on enzyme production and results of total cell count, viable spore count, protease activity and specific activity were shown in Figure 5a. Maximum total cell count, viable spore count, $\mu_{\max}$, protease activity and specific activity were obtained at 42 h of fermentation time (Figure 5a, Table 3). Cells and spores were increased exponentially until 18 h, then increased slowly and reached stationary phase. Protease activity and specific activity were increased with fermentation time and reached maximum in stationary phase. After reaching maximum level, protease activity declined at the end of fermentation. Protease activity and specific activity were highest with lactose (1.5%), soybean meal (1.5%) and with both (lactose + soybean meal). Thus, sludge required fortification of available carbon and nitrogen in the form of lactose and soybean meal to enhance growth and protease production.

Validation of optimum concentrations of lactose and soybean meal supplemented together in the sludge medium was conducted in fermenter and the results of total cell count, viable spore count, protease activity and specific protease activity (Figure 5b and Table 3) were maximum at 42 h of fermentation time (stationary growth phase). Protease production was proportional to spore production and protease activity was maximum in stationary phase of the growth where spore count also attained maximum value. It could be due to the reason that when there is a shortage of available aminoacids in the medium; microorganisms started secreting proteases in the medium to degrade complex substrate for the cell multiplication and efficient sporulation. There is

correlation between the efficiency of sporulation and the production of protease that poorly sporulating cells produce less proteases whereas cells those are highly efficient in forming spores produces high protease [12]. Higher values in fermenter compared to control (fermenter) and shake flask (Table 3) were due to the fact that physical and biological parameters are quite different in fermenter and shake flasks and could not be controlled properly in the shake flask unlike fermenter. Meunier [37] also suggested that the proteolytic enzymes inactivated by the change in pH during growth of *Bacillus* sp. in wastewater sludge shake flask fermentations. Protease activity (15 IU/ml) and specific activity (8.8 IU/mg) were 2.6 times and 4 times higher respectively in the fermenter compared to shake flask experiments (5.7 IU/ml, 2.2 IU/mg). This may be because of better control of pH and dissolved oxygen concentration in the fermenter compared to shake flask where it is impossible to control the parameters properly [21]. Similar fact was also observed in our earlier work during protease production where protease activity of 11 IU/ml was obtained in fermenter and 3.1 IU/ml in shake flask [12]. Yezza *et al.* [21] also accounted 2 times higher protease activity in fermenter than shake flask during *Bacillus thuringiensis* fermentation of wastewater sludge. Specific protease activity was lower in shake flask compare to fermenter, this is may be because organism cannot utilize all the soluble protein presents in the medium under uncontrolled parameters (shake flask), where as in fermenter organism could synthesize protein better under controlled parameters. Specific activity also varied with different carbon and nitrogen sources (Tables 2 and 3) may be due to the reason that organism's nutrient (protein) utilization or synthesizing capacities are different.

According to the results, the protease production is directly related to biomass production and is corresponding with stationary growth phase. Protease production and specific activity declined after 42 h of fermentation time. Protease deactivation could be explained by several reasons. It

has been mentioned in many reports that protease synthesis was declined when nutrients became limiting, several other factors like autodigestion of protease and proteolytic attack by other proteases such as intracellular proteases released in the medium after cell lysis may cause protease deactivation [12, 38]. Finally, protease activity reduced when protease deactivation was superior to protease production [21]. Results indicated that protease production was enhanced from 11 IU/ml to 15 IU/ml with sludge medium supplemented with lactose and soybean meal as carbon and nitrogen sources in fermenter. Though sludge contains large amounts of complex carbon and nitrogen content, still organism requires easily available carbon and nitrogen sources for their initial growth which is needed for protease synthesis. So, it is necessary to supplement extra carbon and nitrogen sources to sludge in order to enhance enzyme production.

4. Conclusion

The results of this study have shown that *B. licheniformis* ATCC 21424 produced highest alkaline protease with wastewater sludge medium supplemented with extra carbon and nitrogen sources. This study also indicated that 1.5% lactose as carbon and 1.5% soybean meal as nitrogen source had significantly enhanced alkaline protease production and protease activity was 2.6 times higher in fermenter compare to shake flask. The outcome of current study points towards the possibilities of utilizing other lactose containing industrial waste such as whey/whey powder as supplementing carbon source to the main substrate, wastewater sludge. One of the cheap nitrogen sources, soybean meal can further enhance the enzyme yield and thus the process becomes cost effective and environment friendly.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

1. Rahman, R.N.Z.R.A., Geok, L.P., Basri, M., Saleeh, A.B., An organic solvent-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K, nutritional factors affecting protease production, *Enz Microb Technol*, Vol. 36, 2005, pp. 749-757.
2. Lazim, H., Mankai, H., Slama, N., Barkallah, I., Liman, F., Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state- fermentation by *Streptomyces* sp. CN902, *J Ind Microbiol Biotechnol*, Vol. 36, 2009, pp. 531-537.
3. Elibol, M., Moreira, A., Optimizing some factors affecting alkaline protease production by marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation, *Process Biochem*, Vol. 40, 2005, pp. 1951-1956.
4. Wiseman, A., Designer enzyme and cell applications in industry and in environmental monitoring, *J chem Technol Biotechnol*, Vol. 53, 1996, pp. 3-13.
5. Zamost, B.L., Nielsen, H., Starnes, R., Thermostable enzymes for industrial application, *J Ind Microbiol*, Vol. 8, 1991, pp. 71-82.
6. Prakasam, R.S. Subba Rao, Ch., Sarma, P.N., Green gram husk- an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp, in solid state fermentation. *Bioresour Technol*, Vol. 97, 2006, pp. 1449-1454.
7. Sandhya, C., Madhavan Nampoothiri, K., Pnadey, A., 2005. Microbial proteases. In: Barredo JL (ed) *Microbial enzymes and biotransformations*, vol 17. The human press Inc, New Jersey, pp. 165-180.
8. Anbu, P., Annadurai, G., Lee, J.F., Hur, B.K., Optimization of alkaline protease production from *Shewanella oneidensis* MR-1 by response surface methodology, *J Chem Technol Biotechnol*, Vol. 84, 2009, pp. 54-62.
9. Adinarayana. K., Ellaiah, P., Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp, *J Pharmaceut Sci*, Vol. 5, 2002, pp. 272-278.

10. Godfrey, T.A., Reichelt, J., 1985. Industrial enzymology: the application of enzymes in industry. London: the nature press.
11. George. S., Raju, V., Krishnan, M.R.V., Subramanian, T.V., Jayaraman, K., Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins, *Process Biochem*, Vol. 30, 1995, pp. 457-462.
12. Bezawada, J., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Comparison of protease activities in different *Bacillus Licheniformis* strains using wastewater sludge and synthetic soy medium as raw material, *Environ Technol*, Vol. 31, 2010, pp. 63-72.
13. Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Barnabé, S., Valero, J.R., *Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism, *Process Biochem*, Vol. 42, 2007, pp. 773–790.
14. Puri, S., Beg, Q.K., Gupta, R., Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. using response surface methodology, *Curr Microbiol*, Vol. 44, 2002, pp. 286-290.
15. Kaur. S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., Hoondal, G.S., Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp, P-2. *World J Microbiol Biotechnol*, Vol. 17, 2001, pp. 125-129.
16. APHA, AWWA, WPCF., 1998. In: Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. (Eds.), Standard Methods for Examination of Water and Wastewaters, 20 edn. American Public Health Association, Washington, DC, USA.
17. Tyagi, R.D., Sikati Foko, V., Barnabe, S., Vidyarthi, A., Valero, J.R., Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using wastewater as a raw material, *Water Sci Technol*, Vol. 46, 2002, pp. 247-254.
18. Kunitz, M., Crystalline Soybean trypsin inhibitor. *J Gen Physiol*, Vol. 30, 1947, pp. 291-310.
19. Bradford, M., A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, Vol. 72, 1976, pp.248-254.
20. Ben Rebah, F., Tyagi, R. D., Prévost, D., Surampalli, R. Y., Wastewater Sludge as a New Medium for Rhizobial Growth, *Water Qual. Res. J. Canada*, Vol. 37, 2002, pp. 353–370.
21. Yezza, A., Tyagi, R.D., Valero, J.R., Surampalli, R.Y., Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* grown in waste water sludge, *Process Biochem*, Vol. 41, pp. 2006, 794–800.
22. Vidyarthi, A.S., Tyagi, R.D., Valero, J.R., Surampalli, R.Y., Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as raw material, *Water Res*, Vol. 84, 2002, pp. 67-72.

23. Mabrouk, S.S., Hasheem, A.M., EL-Shayeb, N.M.A., Ismail, A-MS., Abdel-Fattah, A.F., Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, *Bioresour Technol*, Vol. 69, 1999, pp. 155-159.
24. Chu, W-H., Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, Vol. 34, 2007, pp. 241-245.
25. Guangrong, H., Dehui, D., Weilian, Hu., Jiaxin, J., Optimization of medium composition for thermostable protease production by *Bacillus* sp. HS08 with statistical method, *Afr J Biotechnol*, Vol. 7, 2008, pp. 1115-1122.
26. Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M., Salleh, A.B., Heat stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1: nutritional factors affecting protease production, *Ann Microbiol*, Vol.53, 2003, pp. 199-210.
27. Sen, S., Satyanarayana, T., Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40, *Ind J Microbiol*, Vol. 33, 1993, pp. 43-47.
28. Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S., Qurat-ul-Ain., Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2, *Food Technol Biotechnol*, Vol. 46, 2008, pp. 388-394.
29. Giesecke, U.E., Bierbaum, G., Rudde, H., Spohn, U., Wandrey, C., Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in controlled fed-batch process, *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 35, 1991, pp. 720-724.
30. Chauhan, B., Gupta, R., Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14, *Process Biochem*, Vol. 39, 2004, pp. 2115-2122.
31. Saurbh, S., Jasmine, I., Pritesh, G., Rajendra Kumar, S., Enhanced productivity of serine alkaline protease by *Bacillus* sp. using soybean as substrate, *Malay J Microbiology*, Vol. 3, 2007, pp. 1-6.
32. Joo, H.S., kumar, C.G., Park, G.C., Kim, K.T., Paik, S.R., Chang, C.S., Optimization of the production of an extracellular alkaline protease form *Bacillus horikoshii*, *Process Biochem*, Vol. 38, 2002, pp. 155-159.
33. Showden, L.Y., Blumentals, I.I., Kelly, R.M., Regulation of proteolytic activity in the hyperthermophiles *Pyrococcus furiosus*, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 58, 1992, pp. 1134-1141.
34. Sinha, N., Satyanarayana, T., Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*, *Ind J Microbiol*, Vol. 31, 1991, pp. 425-430.
35. Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., Sarnaik, S.S., Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326, *Bioresour Technol*, Vol. 98, 2007, pp. 1238-1245.

36. Sutar, I.I., Srinivasan, M.C., Vartak, H.G., Production of alkaline proteinase from *Conidiobolus coronatus* and its use to resolve DL-phenylalanine and DL-phenyl glycine, *World J Microbiol Biotechnol*, Vol. 8, 1992, pp. 254-258.
37. Meunier, N.E., Valuation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales, M.Sc Thesis, INRSETE, University of Quebec, Canada, 1999, pp. 1-168.
38. Beg, Q.K., Saxena, R.K., Gupta, R., De-Repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fedbatch operations, *Process Biochem*, Vol. 27, 2002, pp. 1103-1109.

Table 1. Physical and chemical characteristics of secondary sludge.

Characteristics	Concentration
Physical characteristics:	
Total solids (g/L)	27 ±1.1
Volatile solids (g/L)	16 ±0.5
Suspended solids (g/L)	20 ±0.8
Volatile suspended solids (g/L)	15 ±0.6
pH	5.6 ±0.2
Chemical characteristics:	
Total carbon (% dry total solids)	37.12 ±1.4
Total nitrogen (% dry total solids)	5.26 ±0.2
Ammonical nitrogen (mg N/kg)	675 ±21.1
Total phosphorus (mg P/kg)	12 322 ± 41.5
Orthophosphates (mg P/kg)	7 760 ± 23
Metals (in mg/kg) (dry basis):	
Al ³⁺	13 501 ±42
Ca ²⁺	16 100 ±45.2
Cd ²⁺	3.3 ±0.14
Cr ³⁺	69.5 ±2.2
Cu ²⁺	260 ±8.97
Fe ²⁺	10 495 ±31.1
Mg ²⁺	1864 ± 61.5
Mn ²⁺	195 ±6.75
K ⁺	1750 ±55
Pb ²⁺	64 ±2.3
Zn ²⁺	497 ±15.8

All the experiments were conducted in triplicates and standard errors were always less than ±5%

Table 2. Extracellular protease production of *B. licheniformis* in shake flask with supplementation of different carbon sources and different concentrations of lactose to sludge medium

Experiment	Maximum total count (CFU/ml)	Maximum spore count (CFU/ml)	Specific growth rate $\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Maximum protease activity (IU/ml)	Soluble protein (mg/ml)	Maximum specific activity (IU/mg)
Shake flask						
Control	2.6±0.12x10 ⁹ (48h)	2±0.09x10 ⁸ (48h)	0.30±0.012	3.1±0.015 (48h)	2±0.1	1.6±0.07 (48h)
Glucose	1.1±0.05x10 ¹⁰ (42h)	1.2±0.06x10 ⁹ (42h)	0.34±0.014	3.2±0.016 (42h)	2.3±0.11	1.4±0.05 (42h)
Fructose	1.5±0.07x10 ¹⁰ (42h)	1.4±0.07x10 ⁹ (42h)	0.29±0.011	3.4±0.017 (42h)	2.3±0.11	1.5±0.06 (42h)
Starch	8.5±0.43x10 ⁸ (42h)	4±0.18x10 ⁷ (42h)	0.17±0.01	1.9±0.09 (42h)	2.5±0.13	0.8±0.04 (42h)
Maltose	2.4±0.11x10 ⁹ (42h)	1.7±0.07x10 ⁸ (42h)	0.28±0.01	3±0.13 (42h)	2.4±0.12	1.3±0.06 (42h)
Lactose	2±0.1x10 ¹⁰ (42h)	1.7±0.08x10 ⁹ (42h)	0.33±0.013	3.8±0.16 (42h)	2.2±0.1	1.72±0.08 (42h)
Lactose (different concentrations)						
0.5%	7.8±0.25x10 ⁹ (42h)	3±0.13x10 ⁸ (42h)	0.187±0.01	3.4±0.15 (42h)	2.3±0.11	1.5±0.07 (42h)
1%	2±0.12x10 ¹⁰ (42h)	1.7±0.07x10 ⁹ (42h)	0.33±0.01	3.8±0.17 (42h)	2.2±0.1	1.72±0.08 (42h)
1.5%	5.7±0.22x 10 ¹⁰ (42h)	2.9±0.13x10 ⁹ (42h)	0.36±0.016	4.7±0.2 (42h)	2.1±0.1	2.24±0.11 (42h)
2%	3±0.14x10 ¹⁰ (42h)	1.9±0.08x10 ⁹ (42h)	0.31±0.013	4.1±0.19 (42h)	2.3±0.11	1.8±0.09 (42h)
2.5%	7.4±0.3x10 ⁹ (42h)	2.6±0.12x10 ⁸ (42h)	0.19±0.008	3.3±0.14 (42h)	2.3±0.12	1.4±0.06 (42h)
3%	5.4±0.25x10 ⁹ (42h)	1.4±0.06x10 ⁸ (42h)	0.18±0.007	2.8±0.13 (42h)	2.4±0.13	1.2±0.05 (42h)

Digits in parenthesis represents the incubation time

All the experiments were conducted in triplicates and standard error was always less than ±5%

Table 3. Extracellular protease production of *B. licheniformis* in shake flask and fermentor with supplementation of different nitrogen sources and different concentrations of soya bean meal.

Experiment	Maximum total count (CFU/ml)	Maximum spore count (CFU/ml)	Specific growth rate μ_{max} (h ⁻¹)	Maximum protease activity (IU/ml)	Soluble protein (mg/ml)	Maximum specific activity (IU/mg)
Soyabean meal	1.8±0.08x10 ¹⁰ (42h)	1.5±0.07x10 ⁹ (42h)	0.33±0.015	4.3±0.2 (42h)	2.2±0.09	2±0.08 (42h)
Casaamino acids	1.4±0.07x10 ¹⁰ (42h)	1.3±0.055x10 ⁹ (42h)	0.30±0.014	4.3±0.21 (42h)	2.2±0.11	2±0.1 (42h)
peptone	4.6±0.2x10 ⁹ (42h)	2.5±0.11x10 ⁸ (42h)	0.28±0.013	3.5±0.17 (42h)	2.4±0.12	1.5±0.07 (42h)
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.7±0.29x10 ⁸ (42h)	4±0.18x10 ⁷ (42h)	0.16±0.01	2±0.09 (42h)	2.5±0.125	0.8±0.03 (42h)
Soybean meal different concentrations (shakeflask)						
0.5%	1.8±0.08x10 ¹⁰ (42h)	1.5±0.08x10 ⁹ (42h)	0.33±0.017	4.3±0.22 (42h)	2.1±0.11	2±0.11 (42h)
1%	2±0.09x10 ¹⁰ (42h)	1.9±0.09x10 ⁹ (42h)	0.34±0.018	4.5±0.23 (42h)	2.3±0.12	2±0.09 (42h)
1.5%	4.9±0.22x10 ¹⁰ (42h)	3.2±0.17x10 ⁹ (42h)	0.35±0.018	5.2±0.24 (42h)	2.1±0.1	2.5±0.13 (42h)
2%	3.5±0.16x10 ¹⁰ (42h)	2.5±0.13x10 ⁹ (42h)	0.33±0.016	4.7±0.22 (42h)	2.3±0.115	2±0.12 (42h)
2.5%	1.2±0.06x10 ¹⁰ (42h)	1.1±0.04x10 ⁹ (42h)	0.30±0.014	3.3±0.17 (42h)	2.4±0.13	1.4±0.07 (42h)
3%	1.5±0.07x10 ⁹ (42h)	1.3±0.05x10 ⁸ (42h)	0.17±0.009	2.5±0.14 (42h)	2.7±0.14	0.9±0.05 (42h)
Lactose + soybean meal	6±0.28 x10 ¹⁰ (42h)	3.7±0.19x10 ⁹ (42h)	0.36±0.019	5.7±0.28 (42h)	2.2±0.11	2.6±0.12 (42h)
Fermenter						
Control	6±0.31x10 ⁹ (42h)	5.2±0.3x10 ⁸ (42h)	0.38±0.017	11±0.53 (42h)	1.9±0.1	5.8± 0.3(42h)
Lactose + soybean meal	1.5±0.08x10 ¹¹ (42h)	1.2±0.07 x10 ¹⁰ (42h)	0.40±0.02	15±0.7 (42h)	1.7±0.09	8.8±0.42 (42h)

Digits in parenthesis represent incubation time

All the experiments were conducted in triplicates and standard errors were always less than ±5%

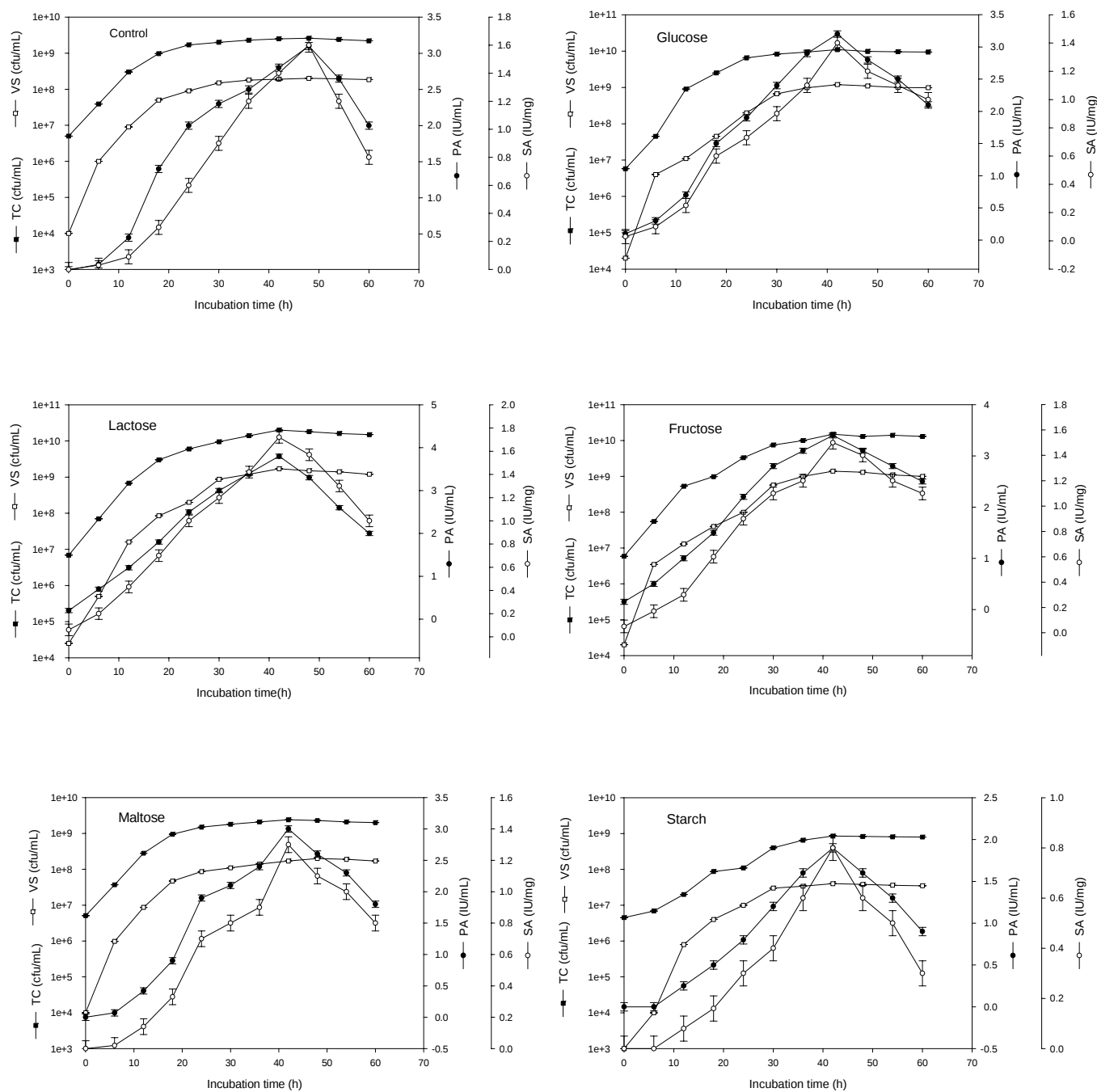


Figure 1. Effect of different carbon sources on alkaline protease production. (TC- total cell count, VS- viable spore count, PA- protease activity and SA- specific activity) Control experiments were carried out with sludge alone.

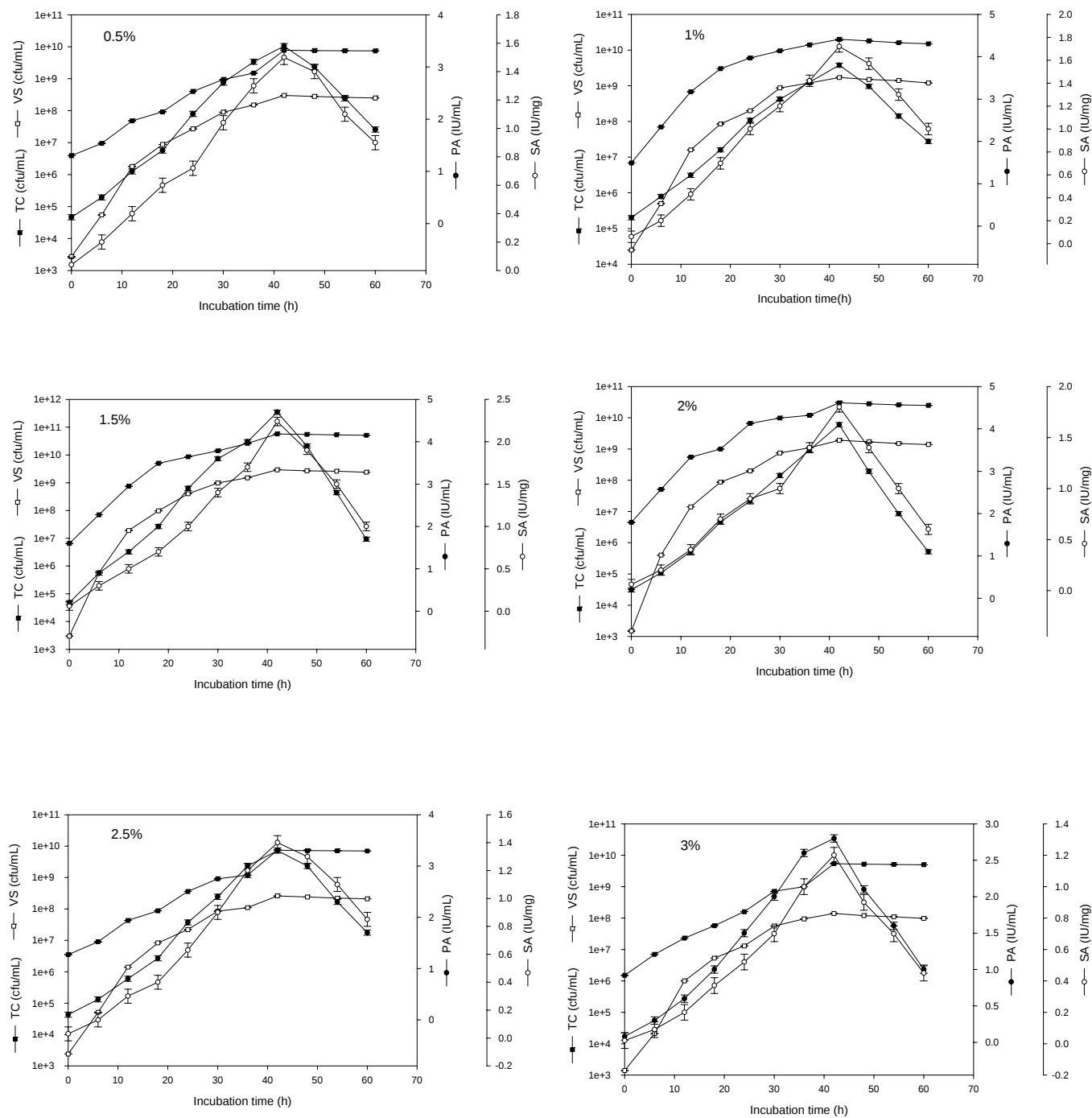


Figure 2. Effect of different concentrations of lactose on alkaline protease production. (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)

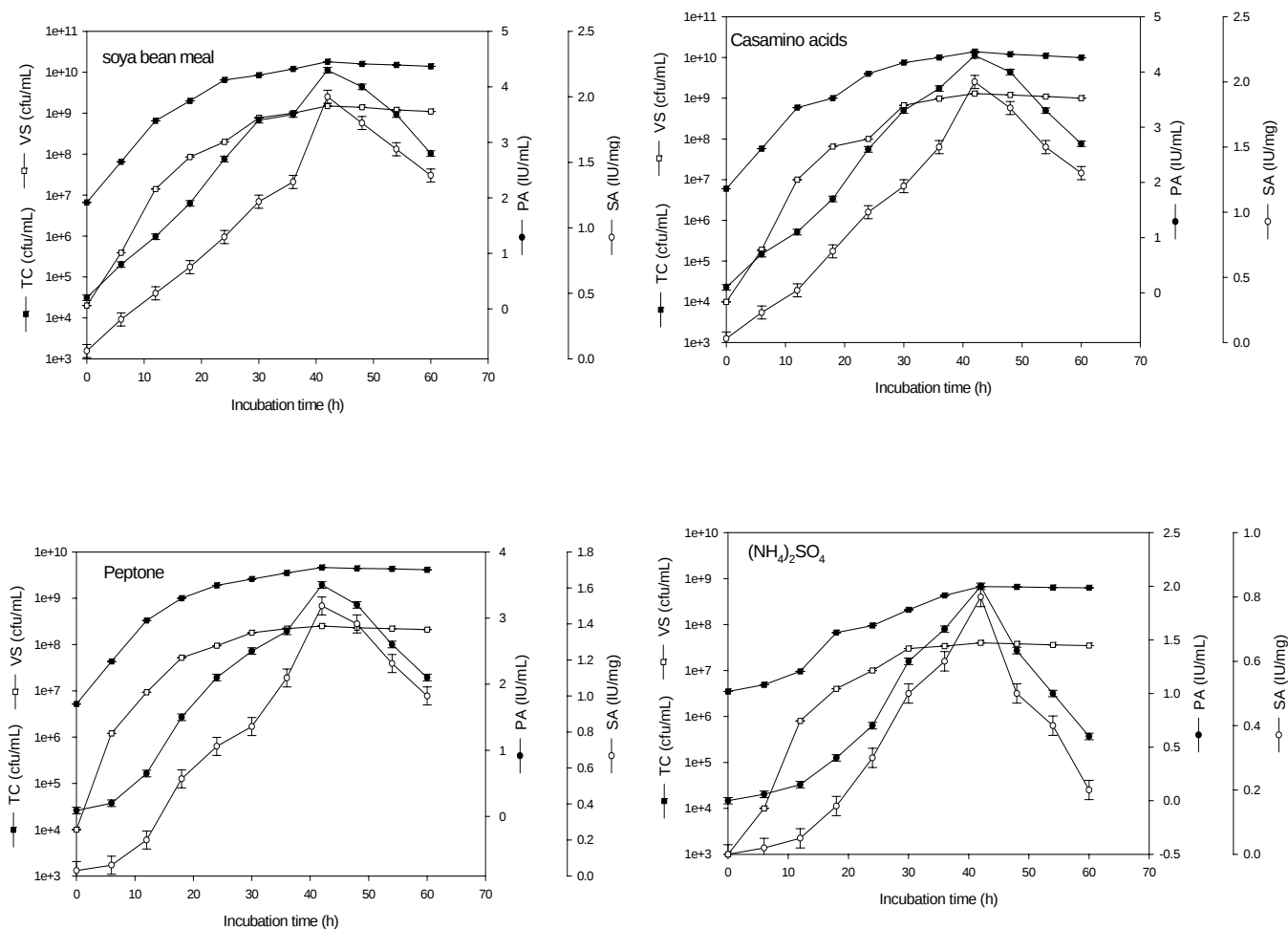


Figure 3. Effect of different nitrogen sources on alkaline protease production. (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)

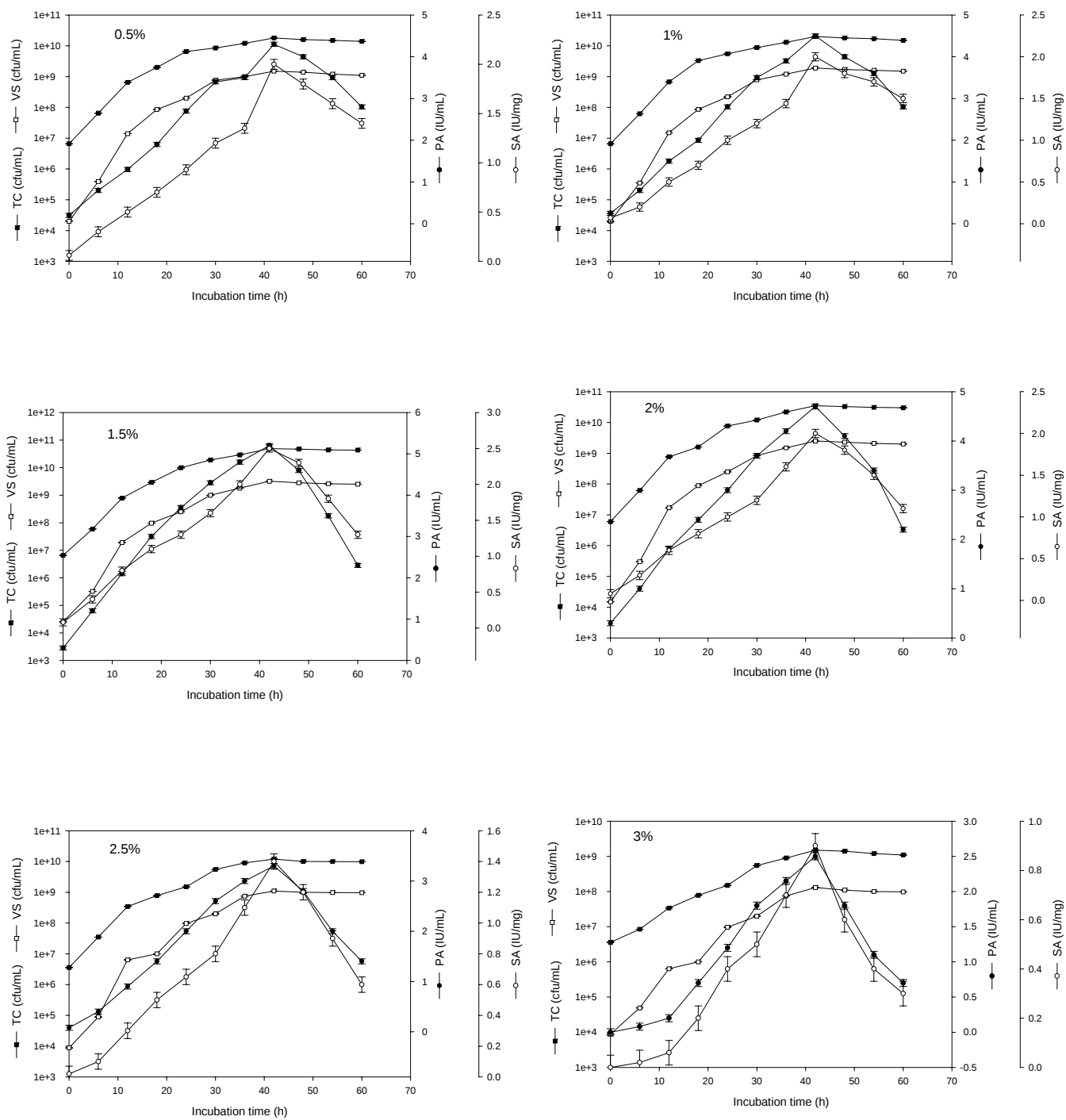


Figure 4. Effect of different concentrations of soybean meal on protease production (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)

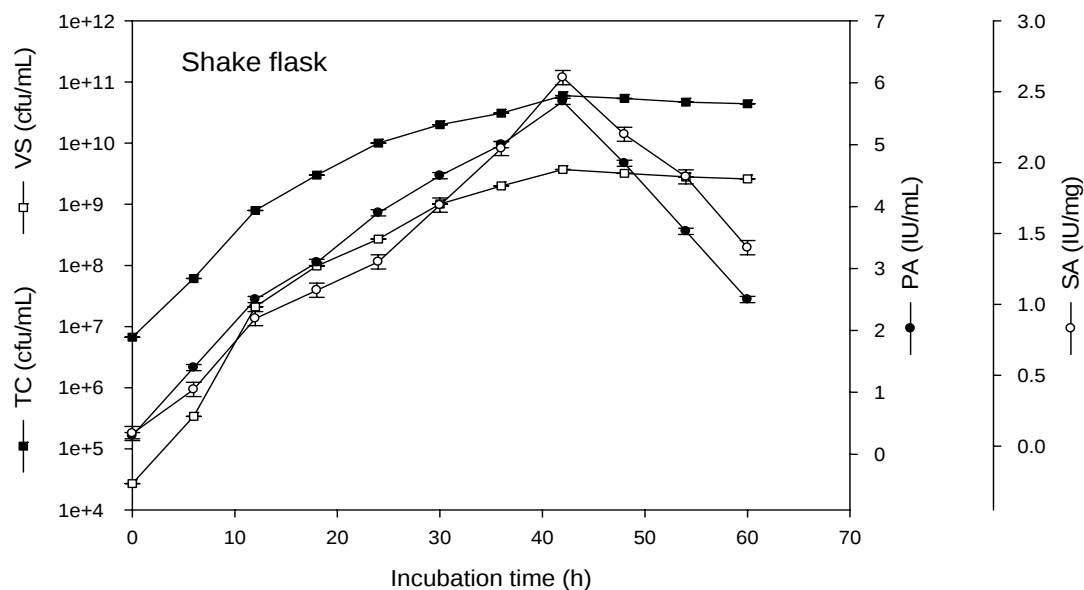


Figure 5a. Validation of optimum carbon and nitrogen sources for alkaline protease production in the shake flask. (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)

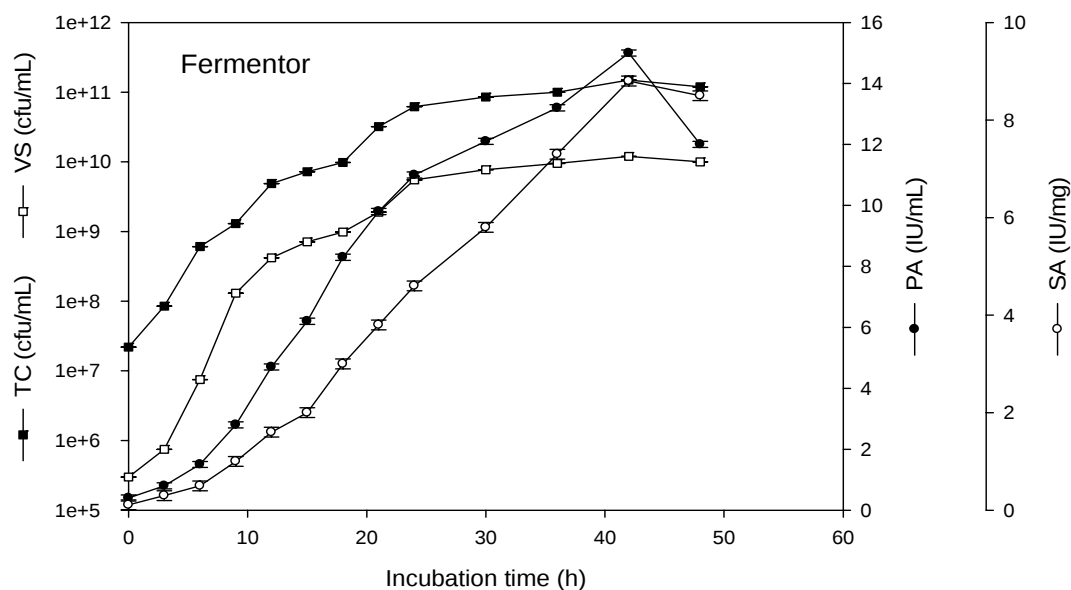


Figure 5b. Validation of optimum carbon and nitrogen sources for alkaline protease production in the fermenter. (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)

CHAPITRE 4

RÉCUPÉRATION ET APPLICATION DE LA PROTÉASE ALCALINE

Recovery of *Bacillus licheniformis* alkaline protease from supernatant of fermented wastewater sludge using ultrafiltration and its characterization

Jyothi Bezawada¹, S. Yan¹, Rojan P. John¹, R.D. Tyagi¹ and R. Y. Surampalli²

¹INRS-ETE, Université du Québec, 490, rue de la Couronne, Québec, Canada G1K 9A9

²USEPA, P.O. Box-17-2141, Kansas City, Kansas, KS 66117

*Communication: **R.D. Tyagi**, E-mail: tyagi@ete.inrs.ca; Tel: (418) 654 2617; Fax: (418) 654-2600

Submitted to Process Biochemistry

Récupération de protéase alcaline *Bacillus licheniformis* du surnageant de fermentation des boues d'épuration et sa caractérisation en utilisant l'ultrafiltration

Résumé

Une enquête sur le recouvrement de la protéase alcaline de *B. licheniformis* ATCC 21424 des boues d'épuration fermenté a été réalisée par centrifugation et ultrafiltration. Une optimisation des paramètres d'ultrafiltration (transmembranaire pression [TMP] et flux RSS) a été réalisées avec membrane 10 kDa. Un TMP de 90 kPa et un flux d'alimentation de 714 L/h/m² ont donné un recouvrement de 83% de l'enzyme à partir du surnageant centrifugé. L'enzyme récupéré a donné un maximum d'activité à une température de 60°C et à un pH de 10. Il a été stable entre pH 8 à 10 et 97% d'activité retenu à 60°C après 180 min d'incubation. L'activité enzymatique était significativement augmentée par des ions métalliques tels que le Ca²⁺ et Mn²⁺. Les inhibiteurs de protéase comme le PMSF et DFP ont complètement inhibé l'activité enzymatique. La protéase partiellement purifiée a montré une excellente stabilité et une compatibilité avec différents détergents commerciaux. Le détergent (exposition à la lumière du soleil) a retiré les tâches de sang de manière efficace avec l'enzyme en tant qu'additif.

Mots clés : Récupération; ultrafiltration; protéase alcaline; Caractérisation; boues d'épuration.

Abstract

Investigation on recovery of alkaline protease from *B. licheniformis* ATCC 21424 fermented wastewater sludge was carried out by centrifugation and ultrafiltration. Optimization of ultrafiltration parameters (transmembrane pressure [TMP] and feed flux) were carried out with 10 kDa membrane. TMP of 90 kPa and feed flux of 714 L/h/m² gave highest recovery (83%) of the enzyme from the centrifuged supernatant. The recovered enzyme had given maximum activity at temperature of 60°C and at pH 10. It was stable between pH 8 to 10 and retained 97% activity at 60°C after 180 min of incubation. Enzyme activity was significantly augmented by metal ions like Ca²⁺ and Mn²⁺. Protease inhibitors like phenylmethyl sulphonyl fluoride (PMSF) and diisopropyl fluorophosphates (DFP) completely inhibited the enzyme activity. The partially purified protease showed excellent stability and compatibility with various commercial detergents. The detergent (Sunlight) removed the blood stains effectively along with the enzyme as additive.

Keywords: Recovery; Ultrafiltration; Alkaline protease; Characterization; Wastewater sludge.

1. Introduction

The membrane separation processes are the most widespread in the field of biotechnology and they are more easily operated and scaled up in comparison to other bioseparation processes such as chromatography and electrophoresis. Among the various membrane separation processes, ultrafiltration is one of the processes that functions under pressure gradient which is mostly used for separation and purification of products including enzymes and other proteins [1-3] or to recover microbial products (cells, spores,) present in a culture medium [4-6]. Because of the low amount of enzyme present in the cell-free filtrate, the water removal is a primary objective. Ultrafiltration is an effective technique that has been largely used for the recovery of enzymes [7, 8] and in general is a preferred alternative to evaporation. This pressure driven separation process is not expensive and also gives encouraging results with little loss of enzyme activity. This process offers both concentration and purification [9]. However, the application of membrane processes in general have some specific problems like fouling or membrane clogging due to the precipitates formed by the final product and/or deposition of solid particles on the membrane. If the solute flow towards the membrane is greater than the solute passing through the membrane, the solute accumulates on the surface of the membrane, this accumulation forms a concentration layer which is known as concentration polarization [10]. Tangential flow filtration is powerful and advantageous alternative over normal flow filtration as tangential flow filtration will significantly reduce the fouling of the membrane. The clogging or fouling can usually be alleviated or overcome by treatment with detergents, proteases, acids or alkalis [11]. In fact, the ultrafiltration process has been effectively in use for the recovery of organic compounds from several synthetic media [12-14].

Proteases are commercially important industrial enzymes accounting 60% of the total enzyme sales with two thirds of the proteases produced are from microorganisms [15-17]. Microbial enzymes are replacing chemical catalysts in manufacturing chemicals, food, leather goods, pharmaceuticals and textiles. Among proteases, alkaline proteases are employed mainly as detergent additives because of their distinctive abilities to assimilate proteinacious stains such as blood, chocolate, and milk. Currently, alkaline protease-based detergents are preferred over the conventional synthetic detergents as they have better cleaning properties, higher efficiency at lower washing temperatures, and safer dirt removal conditions [18]. Preferably, proteases used in detergent formulation must have a high activity level and stability over a wide range of pH and temperature. One of the major drawbacks affecting the stability of enzymes recovered from thermophiles at alkaline pH is that enzymes from alkalophiles confer stability over wide pH range but are generally thermoliable. So, there is always a need for proteases with all desirable properties to become accustomed with application conditions and also it is necessary to check the stability of the enzyme at elevated temperatures and pH. Applications, such as protease for detergent industries need concentrated and cleaned enzyme to amend with detergent to get good performance during storage and application as well. The enzyme is cleaner when the medium is simple and defined where as in case of sludge medium, fermented enzyme contains many other sludge particles and other impurities, so enzyme has to be clarified and concentrated to get higher activity.

The aim of the present study was to recover and concentrate the alkaline protease activity from culture filtrate of fermented wastewater sludge using ultrafiltration technique. The efficiency of enzyme was examined in the presence of standard commercial detergents and the enzyme was

characterized with respect to the effect of various additives such as stabilizers and inhibitors on the stability at higher temperatures and in alkaline pH.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strain

Bacillus licheniformis strain ATCC 21424 was used in this study. An active culture was maintained by inoculating on nutrient agar (composition: 0.3% beef extract, 0.5% peptone and 2% agar) plates and incubating at 35°C for 48 h. The plates were stored at 4°C for later use.

2.2 Sludge samples and composition

The wastewater secondary sludge samples collected from municipal wastewater treatment of Communauté Urbaine de Quebec (CUQ, Quebec) were used. The experiments were conducted at a sludge suspended solids concentration of 30 g/L. The sludge was centrifuged in order to obtain higher suspended solids concentration (30 g/L). The sludge characteristics were measured according to standard methods [19] and sludge composition was presented in Table 1.

2.3 Inoculum and cultural conditions

A loopful of bacterial growth from a nutrient agar plate was used to inoculate a 500 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of sterilized nutrient broth (composition: 0.3% beef extract and 0.5% peptone) (sterilized at 121°C for 15 min). The flask was incubated in a shaker incubator (New Brunswick) at 35°C with 220 rpm for 12 h. 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of sterilized sludge were then inoculated with 2% (v/v) inoculum from the above flask. The flasks were incubated in the same way for 12 h and these actively growing cells were used as inoculum for fermenter experiments.

2.4 Fermentation

A fermenter (Biogénie Inc., Quebec) of 15 L capacity equipped with accessories and automatic control systems for dissolved oxygen, pH, antifoam, impeller speed, aeration rate and temperature and with working volume of 10 L sludge supplemented with 1.5% (w/v) soybean meal and 1.5% (w/v) lactose (sterilized at 121°C for 30 min) was used for production of extracellular alkaline protease. The medium was inoculated with 4.5% (v/v) inoculum. Temperature and pH of the fermentation medium were controlled at 35°C and 7.5, respectively. Dissolved oxygen concentration was maintained above 20% (1.56 mg O₂/L) saturation (critical oxygen concentration) by agitating the medium initially at a speed of 200 rpm and finally increased up to 500 rpm and air flow rate was controlled automatically using a computer controlled system. The fermented broth was collected aseptically in HDPE bottles (VWR Canlab, Canada) after 42 h of fermentation and sealed with paraffin and preserved at 4°C for further use.

2.5 Techniques for recovery of alkaline protease from the fermented broths

2.5.1 Centrifugation

Fermented broth was centrifuged at 9000 x g for 30 min according to the procedure of Brar *et al.* [20]. The supernatant after the centrifugation of the fermented broths were collected and stored at 4°C.

2.5.2 Ultrafiltration

2.5.2.1 Operating principle and washing of the filter

The equipment used for ultrafiltration was of tangential flow filtration type (PREP/SCALE-TFF, Cartridges Millipore) with recirculation and schematic representation of ultrafiltration process is presented in Fig.1. The fluid was tangentially pumped along the surface of the membrane.

Pressure was applied to force a portion of the fluid through the membrane to the permeate side. The supernatant from centrifuge was fed into the ultrafiltration equipment by a pump (Casy Load, Master Flex, Millipore).

The supernatant was brought to room temperature (25°C) in order to conduct ultrafiltration study. The process consisted of feeding aseptically a volume (1 L) of the supernatant from the centrifugation step referred to as “feed” through the membrane in order to concentrate the active components to a concentrated volume referred to as “retentate” which was 18% of the volume of the supernatant [21]. The flow of the supernatant was obtained by means of a pump whose flow varied between 45.5 L/h and 250 L/h, which gave a flow of feed through the membrane ranging between 455 L/h m² and 2500 L/h/m². As for the flow of permeate, it generally depended on the TMP and the resistance of the membrane. After ultrafiltration, the permeate and retentate were collected in flasks. Sampling of the supernatant, retentate and permeate was carried out for measurements of physical and biological parameters (total solids, suspended solids, soluble protein and protease activity).

After each ultrafiltration operation, liquid in the membrane was completely drained. Taking into account the type of medium used in this study (biological environment), it was recommended to use an alkaline solution (0.1N NaOH). The alkaline solution was passed through the membrane until the membrane was clean. Later, the membrane was removed and inverted to facilitate complete washing. The performance of the membrane depended on “Normalized Permeability Weight (NWP)”. In fact, during the use of the membrane, the value of NWP decreased, and when the value lies between 10% and 20% of its initial value (that of the new membrane), the membrane should then be changed [6].

2.5.2.2 *Membrane size*

Membranes with molecular weight cut-off (MWCO) of 10 kDa and 100 kDa were used in the present study (Millipore, prep/scale spiral wound TFF-1). The membrane was made up of regenerated cellulose and was of the type: Spiral Wound TFF-1 Module PLCC with a surface area of 0.1 m². Supernatant was passed first through 100 kDa membrane to eliminate all bigger sludge particles and final permeate was collected as enzyme source to carry out optimization studies using membrane of 10 kDa. Concentrated enzyme was used for characterization purpose. Characteristics of the membranes were presented in Table 2.

2.5.2.3 *Optimization of parameters of ultrafiltration*

Transmembrane pressure and flux of the feed are important parameters to be controlled in ultrafiltration. For the optimization, the experiment was carried out for various values of TMP (70-110 kPa) and feed fluxes (455- 2500 L/h/m²). In a typical ultrafiltration process, lower permeate flow results in higher solute concentration in the retentate. Samples were withdrawn to determine the suspended solids, total solids, soluble protein and protease activity in the retentate and permeate.

2.6 Analysis of parameters

2.6.1 Physical parameters

The total solids of the samples (supernatant, retentate and permeate) were measured by drying 30 ml volume at 105°C [19]. The suspended solids were determined by filtration through the 0.45 µm membrane (Glass Microfiber Filter 934-AH of 42.5 mm, Whatman) followed by drying at 105°C. The determination of the soluble protein concentration of the samples (supernatant, retentate and permeate) was carried out using Bradford method [22] with a spectroscopic

measurement of the absorbance at 595 nm. All the experiments were conducted in triplicates and the mean value was presented.

2.6.2 Alkaline protease activity

The modified method of Kunitz [23] was used to determine Protease activity. Fermented samples were centrifuged and the supernatant was collected as the crude enzyme source. The supernatant thus obtained was properly diluted with borate buffer (pH 8.2). Protease activity was assayed by incubating 1 ml of properly diluted enzyme solution with 5 ml of casein (1.2% w/v, Sigma-Aldrich Canada Inc) for 10 min at 37°C in a constant temperature water bath. The reaction was terminated by adding 5 ml of 10% (w/v) trichloroacetic acid. This mixture was incubated for 30 min in order to precipitate the total non-hydrolyzed casein. Samples and blanks were filtered using Whatman filter paper (934-AH) after the incubation period. The absorbance of the filtrate was measured at 275 nm. The validation of the results was established by treating a standard enzyme solution under identical experimental settings where activity was known. One international protease activity unit (IU) was defined as the amount of enzyme preparation required to liberate 1 μ mol (181 μ g) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37°C. All experiments were conducted in triplicate and the mean value was presented.

2.7 Characterization of partially purified enzyme

2.7.1 Effect of pH on enzyme activity and stability of protease

The activity of protease was measured at different pH values in the absence and presence of 10 mm CaCl₂. The pH was adjusted using different buffers; acetate buffer (pH 5), phosphate buffer (pH 6-7), borate buffer (pH 8-9), bicarbonate buffer (pH 10), and Robinson and stokes buffer

(pH 11-12). Reaction mixtures were incubated at 37°C and the activity of the enzyme was measured.

Stability of the enzyme was determined by incubating the reaction mixtures at various pH values using different relevant buffers (pH 5-12) for 2 h at 37°C. The residual activity after incubation was determined under standard assay conditions. Residual activities are obtained at respective pH values assuming the activity of enzyme before the incubation is 100%.

2.7.2 Effect of temperature on activity and stability of protease

Optimum temperature was determined by activity assay on casein at pH 10 from 30-90°C in the absence and presence of 10 mM CaCl₂ and relative protease activities were assayed at standard assay conditions using casein as substrate.

The thermostability of enzyme was measured by incubating the enzyme preparation at different temperatures ranging from 30-90°C for 180 min in the absence and presence of 10 mM CaCl₂. The residual activity after incubation was determined under the standard assay conditions. Residual activities are obtained at respective temperatures assuming the activity of the enzyme before the incubation is 100%.

2.7.3 Effect of enzyme inhibitor and chelator on protease activity

The effect of various protease inhibitors (5 mM) such as serine inhibitors (phenylmethylsulphonyl fluoride [PMSF] and diisopropyl fluorophosphate [DFP]), cysteine-inhibitors (p-chloromercuric benzoate [pCMB] and β-mercaptoethanol [β-ME], iodoacetate), dithiothreitol, and a chelator of divalent cations (ethylene diamine tetra acetic acid [EDTA]) on enzyme activity were investigated by preincubation with the enzyme solution for 30 min at 60°C. The relative protease activity was measured under assay conditions.

2.7.4 Effect of various metal ions on enzyme activity

To study the effect of various metal ions (Ca^{2+} , K^{+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Na^{+}) on enzyme activity, metal salt solutions were prepared in a concentration of 10 mM and 1 ml of metal solution was mixed with 5 ml of enzyme and was incubated for 2 h. Enzyme activities were measured at standard assay conditions. The activity is expressed in terms of relative activity assuming that the activity of the enzyme in the absence of metal salts just before the initiation of the treatment is 100%.

2.7.5 Hydrolysis of protein substrates

The effect of various protein substrates such as casein, BSA, egg albumin, and gelatin were determined under assay conditions by mixing 1 ml of the enzyme and 5 ml of assay buffer containing the protein substrates (1.2% w/v). After incubation at 60°C for 10 min, the reaction was stopped by adding 10% TCA (w/v). The undigested protein was removed by filtration (Whatman filter paper, 934-AH) and the absorbance of the filtrate was measured at 275 nm. The protease activity towards casein was taken as a control.

2.7.6 Effect of detergents on stability of protease activity

Protease enzyme stability with commercial detergents was studied in the presence of 10 mM CaCl_2 . The detergents used were Merit selection (Metrobrands, Montreal, Quebec), La Parisienne (Lavo Inc., Montreal, Quebec), Arctic power (Phoenix brands Canada), Bio-vert (Savons Prolav Inc., Canada) and Sunlight (the Sun products of Canada corporation, Ontario). The detergent solutions (0.7% w/v) were prepared in distilled water and incubated with the partially purified enzyme (2 ml recovered enzyme and 1 ml detergent of 0.7%) up to 3 h at 60°C. At every 30 min interval, the protease activity was estimated under standard assay conditions. The control was maintained without any detergent and enzyme activity was taken as 100%.

2.8 Application of alkaline protease in removing blood stains

Application of protease enzyme (2 ml recovered enzyme) as detergent additive in removing blood stains was studied on white square cotton cloth pieces measuring 4×4 cm pre-stained with goat blood according to the method of Adinarayana [17]. The stained cloths were air dried for 1 h to fix the stain. Each of these stained cloth pieces were taken in separate flasks and the following set ups were prepared.

1. Flask with distilled water (100 ml) + stained cloth.
2. Flask with distilled water (100 ml) + stained cloth +1 ml of respective detergent solution at 7 mg/ml.
3. Flask with distilled water (100 ml) + stained cloth + 1 ml of respective detergent solution (7 mg/ml) + 2 ml of enzyme solution (114 IU/ml).

The above flasks were incubated at 60°C for 15 minutes. After incubation, cloth pieces were taken out, rinsed with water, and dried. Visual examination of various pieces exhibited the effect of enzyme in removal of stains. Untreated cloth pieces stained with blood were taken as control.

3. Results and Discussion

3.1 Optimization of parameters of UF

3.1.1 Transmembrane pressure (TMP)

The TMP was given by the following equation [6]

$$\text{TMP} = \left[\frac{P_{\text{feed}} + P_{\text{ret}}}{2} \right] - P_{\text{perm}}$$

TMP is function of the pressure of the retentate and that of feed which is adjusted by pressure gauge in order to get different values of TMP. Profiles of protease activity, soluble protein, total

solids and suspended solids in the retentate were presented in Figs. 2 and 3, respectively. All of these values (protease activity, soluble protein, total solids and suspended solids) were not detectable in permeate as the size of alkaline proteases were in range between 20-30 kDa [11] which is larger than MWCO of 10 kDa membrane. Adjalle *et al.* [6] reported negligible values of viable spores, total cells and turbidity in the different ultrafiltrated permeates of different fermented broths as sizes of spores and cells of *B. thuringiensis* (25 kDa and 30 kDa) during recovery of biopesticide are greater than MWCO of 5 kDa membrane. Higher protease activity, soluble protein, total solids and suspended solids were obtained with 90 kPa among all other TMP values. All tested components were concentrated to 4.5 times in the retentate than their initial values (supernatant) (Table 3). The fact that the protease activity was not detectable in all permeates. So, 83% of protease activity was recovered in retentate with TMP of 90 kPa. Therefore, it is apparent that some of the protease was lost as a deposit on the membrane and/or in the tubes. TMP values higher or lower than 90 kPa were resulted in lower values of protease activity, soluble protein, total solids and suspended solids. This may be because when TMP is lower than optimum value, feed pressure may not be sufficient to pass the solution through the membrane effectively and loss of components might have occurred in tubes or on the membrane surface. When TMP is high, high pressure might have caused foaming in tubes and eventually components loss on membrane might have occurred as permeate flow increases with increased transmembrane pressure. Flow of the solute across the membranes certainly leads to clogging of some of the pores, creates additional surfaces for adsorption and caking. As gentle conditions are required for the recovery of the intact proteins, it would be difficult to remove/recover these proteins. The silicon tubing also exhibited loss, but it accounted for small amount of total loss. Various mechanisms could generate these losses through the ultrafiltration membrane, as some

of the sample components are close to the MWCO of the membranes. Primary cause of the loss of the enzyme protein through the membrane is the pore size distribution, while shear forces could also contribute by producing smaller fragments [24]. According to ultrafiltration principle, minimum flow of permeate will result in minimum loss or no loss of solute (protease in the present context) in the permeate and will give high concentration in retentate and minimal flow of the permeate was obtained with an optimal value of the TMP [6]. Adjalle *et al.* [25] recorded TMPs of 90 kPa and 100 kPa were optimum values for entomotoxicity recovery from starch industry wastewater and thermal hydrolyzed sludge medium, respectively. Other researcher reported that 20 kPa was best for the separation of serine alkaline protease from neutral protease and amylase and 100 kPa for the separation of serine alkaline protease from the organic and amino acids [3]. The optimum TMP is different for different cases and may be due to the rheological characteristics and other components present in the feed samples.

3.1.2 Feed flux

Profiles of protease activity, soluble protein, total solids and suspended solids versus different feed fluxes at TMP of 90 kPa were presented in Figs. 4 and 5. Different feed flux values between 455 L/h/m² and 2500 L/h/m² were used by keeping the circulation of fluid at flow rate between 45.5 L/h (lowest speed) and 250 L/h (highest speed). During feed flux optimization, for each feed flux value, the retentate pressure was adjusted in order to maintain same TMP of 90 kPa. The feed flux of 714 L/h/m² gave highest values of protease activity, soluble protein, total solids and suspended solids in the retentate among all feed fluxes used. All of these values were not detectable in all permeates as explained earlier. Protease activity, soluble protein, total solids and suspended solids were concentrated to 4.5 times than their initial values (supernatant) (Table 3). 81% of the protease (in terms of activity) was recovered in the retentate at feed flux of

714 L/h/m². No protease was detected in the permeate as most of the protease was recovered in the retentate and some of the protease might get lost as deposit on the membrane. Li *et al.* [26] reported that purities of proteases were increased more than ten times at flow rate of 360 L/h while separation of proteases from yellow fin tuna spleen by ultrafiltration and Adjalle *et al.* [25], reported 550 L/h/m² and 720 L/h/m² as optimal values for entomotoxic components (crystal protein, protease etc.) from starch industry wastewater and thermal hydrolyzed sludge medium, respectively. Protease activity, protein, total solids and suspended solids concentrations were decreased with higher feed flux values (1250, 1667 and 2500 L/h/m²). This decrease with high feed flux values due to the fact that high flux can degrade product quality due to the generation of turbulence effect [21]. Moreover, higher turbulence can cause severe foam in the retentate stream which will create a vacuum and further decrease the permeate flux below the optimum value; hence administer the overall performance of the ultrafiltration system [6]. The vibration in the filtration unit due to the higher feed flux can cause foaming due to proteins (enzymes and other soluble proteins) present in the medium [27].

3.2 Characterization of partially purified enzyme

3.2.1 Effect of pH on enzyme activity and stability of protease

pH is a determining factor in the expression of an enzyme activity as it alters the ionization state of the amino acid or ionization of substrate. The ionization state of enzymes is undoubtedly one of the most crucial parameters that control substrate binding, catalytic enzyme action and three dimensional structure of enzyme molecule. Effect of pH on enzyme activity (permeate of 100 kDa) and stability in the presence and absence of 10 mm CaCl₂ are presented in Fig. 6. The partially purified protease was found to be typical alkaline protease displaying its maximum activity at alkaline pH 10 as optimum and it decreased sharply with increase in pH. The active

site of the enzyme is mainly composed of ionic groups that must be in proper ionic form to maintain the conformation of the active site of enzyme for substrate binding or reaction catalysis as conformation is sensitive to changes in the environment (like pH change) [28]. The optimum pH obtained for this enzyme was higher than other reports showing pH optimum of 8 for protease from *Haloferax lucentensis* VKMM 007 [29] and pH optimum of 9 for protease from *B. stearothermophilus* [15]. However, the findings of optimum pH for this enzyme was in accordance with other findings who also reported pH of 10-10.5 as optimum for proteases from *B. subtilis* PE-11, *B. cereus* and *Vibrio metschnikovi* [17, 30, 31]. Protease stability of concentrated protease in presence and absence of 10 mM CaCl_2 is shown in Fig. 6. When protease was preincubated with various buffers over broad pH values (pH 5-12) for 2 h and then measured for residual activity, the protease showed highest stability over a broad range of pH 8 to 10. The enzyme stability declined to nearly 55% when pH values were higher than 10. The most important feature of the present protease is alkaline enzyme as it was stable in the alkaline pH up to 11 and it can be used as additive in detergent industry. Usually, commercially important proteases from microorganisms have highest activity in the alkaline pH range of 8-12 [32-33].

3.2.2 Effect of temperature on activity and stability of protease

Temperature profiles on enzyme activity in the presence and absence of 10 mM CaCl_2 are shown in Fig. 7. In the present study temperatures ranging from 30-90°C were studied in the absence and presence of 10 mM CaCl_2 . Optimum temperature for this enzyme was found to be 60°C. The enzyme activity was declined gradually when temperatures were higher than 60°C. Similar results were reported by other researchers where optimum temperature of 60°C was recorded for proteases from *Haloferax lucentensis* VKMM 007 and *B. mojavensis* [29, 34]. In contrary to

these results, an optimum temperature of 75°C was reported for protease of *B. laterosporus*-AK1 [35].

Temperature profile on enzyme stability was presented in Fig. 8. Thermal stability of the enzyme was studied at different temperatures of 60°C, 70°C, 75°C and 80°C for different time periods (30 to 180 min) in the presence of 10 mM CaCl₂. The enzyme was 97% stable at 60 °C even after 180 min of incubation and at 70°C up to 41% stable after 180 min incubation. But, the enzyme was completely unstable at 75°C after 90 min of incubation and at 80°C after 60 min of incubation due to thermal inactivation. The main course of action found to be involved in the thermal denaturation of enzyme was due to the dissociation of ionic groups from the holoenzyme and modification or degradation of prosthetic group [28]. Beg and Gupta [34] reported 86% of stability at 60°C for protease from *B. mojavensis* and Shanmughapriya *et al.* [36] reported enzyme stability only up to 40°C for protease from marine *Roseobacter* sp. MMD040. The present enzyme from *B.licheniformis* ATCC 21424 is thermostable as thermostable enzymes are stable and active at temperatures which are even higher than the optimum temperatures for the growth of the microorganisms [37]. So, this enzyme can be very well applied as additive in detergent industries as it can withstand harsh washing conditions of operation because of its stability at high temperatures.

3.2.3 Effect of enzyme inhibitor and chelator on protease activity

Inhibition studies primarily give an insight of the nature of an enzyme, its cofactor requirements and the nature of the active center [38]. The effect of different inhibitors and chelator on enzyme activity was investigated and results were presented in Table 4. Among all the inhibitors tested (5 mM concentration), PMSF inhibited the protease activity completely and DFP was able to inhibit protease activity up to 90%. In this context, PMSF sulphonates the vital serine residue in

the active site of the protease and has been reported to inactivate the enzyme activity completely [39]. Hence this protease can be classified as serine protease. Our results are in accordance with other studies where protease was completely inhibited by PMSF [17, 29]. EDTA and Dithiothreitol did not inhibit enzyme activity at all, but *p*CMB and β -ME inhibited the enzyme activity slightly.

3.2.4 Effect of various metal ions on enzyme activity

Effect of various metal ions with 5 mM concentration on the enzyme activity was tested and results were presented in Table 5. Some metal ions (Ca^{2+} , Mn^{2+}) had enhancing effect on the enzyme activity, while other ions (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Na^{+}) had no effect or slight inhibitory effect on the enzyme activity. Some of the metal ions such as Ca^{2+} , Mn^{2+} and Mg^{2+} increased and stabilized protease enzyme activity; this may be due to the activation by the metal ions. Results show that these metal ions protected the enzyme activity against thermal inactivation and played a vital role in maintaining active conformation of the enzyme at higher temperatures [33]. Metal ions Hg^{2+} and K^{+} had showed maximum inhibition on the enzyme activity, while Fe^{2+} inhibited the enzyme activity up to 34%. The inhibitory effect of heavy metal ions is well reported in the previous reports and it is well known that ions of mercury react with protein thiol groups and also with histidine and tryptophan residues. Moreover, the disulfide bonds were found to be hydrolytically degraded by the action of mercury [33].

3.2.5 Hydrolysis of protein substrates

Effect of some native proteins as substrates on enzyme was studied and results were presented in Table 6. Among all substrates, protease showed higher hydrolytic activity (100%) against casein and the enzyme showed moderate hydrolysis of both BSA (54%) and egg albumin (35%). Previous researchers also reported that alkaline proteases showed higher activity with casein [33,

40]. But, protease did not show any hydrolysis with gelatin. This may be due to the enzymatic cleavage of peptide bonds of gelatin is difficult because of its rigid structure and the restricted enzyme substrate interaction on the surface of gelatin [41]. Different protein substrates contain different amino acid contents and the assay procedure used in this study by detection of tryptophan and tyrosine. So, lesser hydrolysis of other substrates compared to casein may be due to less quantity of detectable amino acid in hydrolyzed product. For example gelatin has no tryptophan residue.

3.2.6 Effect of detergents on stability of protease activity

Protease used for detergent additive is expected to be stable in the presence of various commercial detergents. The protease from *B. licheniformis* ATCC 21424 was tested for its stability in the presence of different commercial detergents. Excellent stability and compatibility was observed with protease in presence of wide range of commercial detergents (Sunlight, Arctic power, la Parisienne, Merit selection and Bio-vert) at 60°C in the presence of CaCl₂ as stabilizer. The protease showed good stability and compatibility in the presence of Sunlight followed by Arctic power (Table 7). Significant activity (nearly 50%) was retained by the enzyme with most of the detergents tested even after 3 h incubation at 60°C. Protease from *Streptomyces fungicidicus* MML1614 showed compatibility with various commercial detergents and significant activity was retained only up to 90 min of incubation [15] and protease from *Conidiobolus coronatus* showed compatibility with different commercial detergents at 50°C with 25 mM CaCl₂ concentration, only 16% activity in Revel, 11.4% activity in Aerial, and 6.6% activity in Wheel after incubation [42]. *B.licheniformis* RP1 protease was stable with detergents at 40°C–50°C only up to 60 min [43]. In comparison with these results, our protease from

B. licheniformis ATCC 21424 was appreciably more stable in the presence of commercial detergents

3.3 Washing test with *B. licheniformis* protease in removing blood stains

Protease produced by *B. licheniformis* ATCC 21424 was considerably stable in a wide range of pH and temperature and even showed good compatibility with commercial detergents. So, it was tested as an additive with detergent, to check washing performance of the detergent with this additive protease. When the protease preparation was combined with commercial detergent (Sunlight), washing performance of the detergent was enhanced in removing the blood stain from white cotton cloth (Fig. 9). Similarly, proteases of *B. subtilis* [17] and *Streptomyces fungicidicus* [15] efficiently removed blood stains from white cotton cloth pieces when combined with commercial detergents. Even though alkaline proteases from *Bacillus* spp. are stable at high temperature and alkaline pH, most of them are incompatible with detergent matrices [32, 44]. Concentrated enzyme from supernatant of sludge fermented by *B. licheniformis* ATCC 21424 showed higher tolerance with detergent and efficiently removed the blood stain.

4. Conclusion

In this study enzyme was concentrated and characterized to apply as additive in detergents as detergent industry needs concentrated enzyme in order to have higher efficiency. The recovery of alkaline protease using ultrafiltration process with an optimum transmembrane pressure of 90 kPa and feed flux of 714 L/h/m² showed a recovery of 83% of the protease activity. The protease from *B. licheniformis* ATCC 21424 is thermostable and alkali-tolerant serine alkaline protease as it is stable at alkaline pH and high temperature. Recovered alkaline thermostable protease by ultrafiltration can be exploited in detergent industry as an additive because it showed

excellent stability at wide range of temperature and compatibility with commercial detergents. More importantly the supplementation of the enzyme preparation to detergent could remarkably remove the blood stains of white cotton cloth.

Acknowledgements

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

References

1. Cui ZF, Bellara SR, Homewood P. Airlift crossflow membrane filtration– a feasibility study with dextran ultrafiltration. *J Membr Sci* 1997; 128:83-91.
2. Sen R, Swaminathan T. characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small scale recovery of surfactant. *Process Biochem* 2005; 40:2953-58.
3. Takac S, Elmas S, Calik P, Ozdamar TH. Separation of the protease enzymes of *B. licheniformis* from the fermentation medium by crossflow ultrafiltration. *J Chem Technol Biotechnol* 2000; 75:491-9.
4. Tzeng Y, Tsun Y, Chang Y. Recovery of thuringiensis with cetylpyridinium chloride using Micellar-Enhanced ultrafiltration process. *Biotechnol Prog* 1999; 15:580–6.
5. Li Y, Shahbazi A, Kadzere CT. Separation of cells and proteins from fermentation broth using ultrafiltration. *J Food Eng* 2006a; 75:574–80.
6. Adjalle KD, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valero JR, Surampalli RY. Ultrafiltration recovery of entomotoxicity from supernatant of *B. thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge. *Process Biochem* 2007; 42:1302–11.
7. Bohdziewicz J, Bodzek M. Ultrafiltration preparation of pectinolytic enzymes from citric acid fermentation. *Process Biochem* 1994; 29:99–107.
8. Bohdziewicz J. Ultrafiltration of technical amylolytic enzymes. *Process Biochem* 1996; 31:185–91.

9. Sullivan TGO, Epstein AC, Korchin SR, Beaton NC. Applications of ultrafiltration in biotechnology. Chem Eng Prog 1984; 80:68–75.
10. Canizares P, Perez A, Camarillo R. Recovery of heavy metals by means of ultrafiltration with water soluble polymers: calculation of design parameters. Desalination 2002; 144:279–85.
11. Kumar CG, Hiroshi T. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Biotechnol Adv 1999a; 17:561-94.
12. Christy C, Vermant S. The state-of-the-art of filtration in recovery processes for biopharmaceutical. Desalination 2002; 147:1-4.
13. Darnon E, Morin E, Bellville GM, Rios MP. Ultrafiltration within downstream processing: some process design consideration. Chem Eng process 2003; 42:299-309.
14. Ghosh R. Novel cascade ultrafiltration configuration for continuous, high resolution protein fractionation: a simulation study. J Membr Sci 2003; 226:85-99.
15. Ramesh S, Rajesh M, Mathivanan N. Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicides* MML1614. Bioprocess Biosyst Eng 2009; 32:791-800.
16. Beg KB, Sahai V, Gupta R. Statistical media optimization and alkaline protease production from *B. mojavensis* in a bioreactor. Process Biochem 2003; 39:203-9.
17. Kunamneni A, Poluri E, Davuluri SP. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *B. subtilis* PE-11. AAPS PharmSciTech 2003b; 4 (4): article 56.
18. Baseem J, Ellouz-Chaabouni S, Mamdouh Ben A, Ezzedine Ben M, Begacem N, Abdelhafidh D, Samir B. Excellent laundry detergent compatibility and high dehairing ability of the *B. pumilus* CBS alkaline proteinase (SAPB). Biotechnol Bioprocess Eng 2009; 14:503-12.
19. APHA, AWWA, WPCF, Standard methods for examination of water and wastewaters, 20th ed , American Public Health Association, Washington, DC, 1998.
20. Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valero JR, Surampalli RY. Sludge based *B.thurengiensis*, biopesticides: viscosity impacts. Water Res 2005; 39:3001-11.
21. Millipores. Protein concentration and diafiltration by tangential flow filtration. Millipore: Millipore publication, Technical Brief Millipore. <http://www.millipore.com/publications.nsf/docs/tb032> 2003.
22. M. Bradford A. rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-54.
23. Kunitz M. Crystalline Soybean trypsin inhibitor. J Gen Physiol. 1947; 30:291-310.

- 24 Powell MJ, Timperman AT. Quantitative analysis of protein recovery from dilute, large volume samples by tangential flow ultrafiltration. *J Membr Sci* 2005; 252:227-36.
- 25 Adjalle KD, Tyagi RD, Brar SK, Valéro JR, Surampalli RY. Recovery of entomotoxicity components from *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and sludge: Ultrafiltration scale-up approach. *Sep Purif Technol* 2009; 69:275-79.
- 26 Li Z, Youravong W, H-Kittikun A. Separation of proteases from yellow fin tuna spleen by ultrafiltration. *Bioresour Technol* 2006; 97:2364-70.
- 27 Abdel-Ghani MS. Cross-flow ultrafiltration of an aqueous polymer foam solution produced by gas sparging. *J Membr Sci* 2000; 171:105-17.
- 28 Ajila CM, Prasada Rao UJS. Purification and characterization of black gram (*Vigna mungo*) husk peroxidase. *J Mol Catal B: Enzym* 2009; 60: 36-44.
- 29 Manikandan M, Pasic L, Kannan V. Purification and biological characterization of a halophilic thermostable protease from *Haloferax lucentensis* VKMM 007. *World J Microbiol Biotechnol* 2009; 25:2247-56.
- 30 Prakash M, Mohan Banik R, Koch-Brandt C. Purification and Characterization of *Bacillus cereus* Protease Suitable for Detergent Industry. *Appl Biochem Biotechnol* 2005; 127:143-155.
- 31 Kwon YT, Kim JO, Moon SY, Lee HH, Rho HM. Extracellular alkaline protease from alkalophilic *Vibrio metschnikovi* strain RH 530. *Biotechnol Lett* 1994; 16:413-18.
- 32 Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 59:15–32.
- 33 Kumar CG, Tiwari MP, Jany KD. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp.: purification and some properties. *Process Biochem* 1999b; 34:441-9.
- 34 Beg QK, Gupta R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme Microbial Technol* 2003; 32: 294-304.
- 35 Arulmani A, Aparanjini K, Vasanthi K, Arumugam P, Arivuchelvi M, Kalaichelvan T. Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *B. laterosporus*-AK1. *World J Microbiol Biotechnol* 2006; 23:475-81.
- 36 Shanmughapriya S, Krishnaveni J, Selvin J, Gandhimathi R, Arunkumar M, Thangavelu T, Seghal kiran G, Natarajaseenivasan K. Optimization of extracellular thermotolerant alkaline protease produced by marine *Roseobacter* sp. (MMD040). *Bioprocess Biosyst Eng* 2008; 31:427-33.
- 37 Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol* 2003; 89:17-34.

- 38 Sigma DS, Mooser G. Chemical studies of enzyme active sites. *Ann Rev Biochem* 1975; 44:889-931.
- 39 Gold AM, Fahrney D. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. II. Formation and reactions of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin. *Biochem* 1964; 3:783-91.
- 40 Paliwal N, Singh SP, Garg SK. Cation-induced thermal stability of an alkaline protease from a *Bacillus* sp. *Bioresour Technol* 1994; 50:209-11.
- 41 Bockle B, Galunsky B, Muller R. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61:3705-10.
- 42 Bhosale SH, Rao MB, Deshpande VV, Srinivasan MC. Thermostability of high-activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20). *Enzyme Microb Technol* 1995; 17:136-9.
- 43 Sellami-Kamoun A, Haddar A, El-Hadj Ali N, Ghorbel-Frikha B, Kanoun S, Nasri M. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiol Res* 2008; 163 : 299-306.
- 44 Saeki K, Ozaki K, Kobayashi T, Ito S. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *J Biosci Bioeng* 2007; 103:501-8.

Table 1. Physical and chemical characteristics of secondary sludge.

Characteristics	Concentration
Physical characteristics:	
Total solids (g/L)	29±1.2
Volatile solids (g/L)	18±0.6
Suspended solids (g/L)	22±0.9
Volatile suspended solids (g/L)	17±0.7
pH	5.7±0.3
Chemical characteristics:	
Total carbon (% dry total solids)	38.12±1.5
Total nitrogen (% dry total solids)	5.5±0.3
Ammonical nitrogen (mg N/kg)	680±22.1
Total phosphorus (mg P/kg)	12 422±42
Orthophosphates (mg P/kg)	7 780±24
Metals (in mg/kg) (dry basis):	
Al ³⁺	13 305±41
Ca ²⁺	16 160±45
Cd ²⁺	3.5±0.16
Cr ³⁺	66.5±2
Cu ²⁺	270±9
Fe ²⁺	10 365±30
Mg ²⁺	1874±62
Mn ²⁺	198±6.9
K ⁺	1720±53
Pb ²⁺	61±2
Zn ²⁺	477±15

Table 2. Characteristics of the membrane

Description of membrane	Characteristics of membrane
Type	Prep /Scale Spiral Wound TFF-1
Filter type	Ultrafiltration
Length, cm (in.)	23.4 (9.2)
Diameter, cm (in.)	5.8 (2.3)
Minimum working volume (ml)	150
pH range	2.0-13.0
Configuration	Spiral Wound Cartridge
Filtration area (m ²)	0.23
Operation temperature (°C)	4-50
Filter material	Regenerated cellulose
Maximum Intel pressure, bar (psi)	0-5.5 (0-80)
Recirculation rate (L/min)	1.0-6.0
Molecular weight cut off (MWCO), kDa	10

Table 3. Maximum values of protease activity, soluble protein, total solids and suspended solids at optimum TMP and feed flux

Parameters	Supernatant		Retentate
	Before UF	TMP (90 kPa)	Feed flux (714 L/h/m ²)
Protease (IU/ml)	15±0.72	69±3.4	67.3±3.3
Soluble protein (mg/ml)	1.7±0.08	7.8±0.39	7.6±0.37
Total solids (g/L)	12±0.6	55.2 ±2.75 (9.9 g/180mL)	54 ±2.7 (9.72 g/180 ml)
Suspended solids (g/L)	0.6±0.03	2.7 ±0.13 (0.48 g/180 ml)	2.52 ±0.12 (0.45 g/180 ml)

Table 4. Effect of enzyme inhibitor and chelator on protease activity

Inhibitor/chelator (5mM)	Relative enzyme activity (%)
Control	100
β – Mercaptoethanol	78 $\pm$ 3.8
<i>p</i> - chloromercuric benzoate (<i>p</i> - CMB)	91 $\pm$ 4.3
Phenylmethyl sulphonyl fluoride (PMSF)	0
Diisopropyl fluoro-phosphate (DFP)	10 $\pm$ 0.5
Iodoacetate	96 $\pm$ 4.4
Ethelene diamine tetra acetic acid (EDTA)	110 $\pm$ 5.6
Dithiotheritol	100 $\pm$ 4.8

Table 5. Effect of metal ions on alkaline protease activity

Metal ions (5 mm)	Residual alkaline protease activity (%)
Control	100
Ca ²⁺	125 $\pm$ 6.1
K ⁺	6 $\pm$ 0.26
Fe ²⁺	66 $\pm$ 3.1
Zn ²⁺	98 $\pm$ 4.7
Hg ²⁺	23 $\pm$ 1.1
Mg ²⁺	99 $\pm$ 4.8
Mn ²⁺	114 $\pm$ 5.5
Cu ²⁺	95 $\pm$ 4.6
Co ²⁺	91 $\pm$ 4.4
Na ⁺	96 $\pm$ 4.7

Table 6. Activity of alkaline protease against different natural proteins

Protein (2 mg/ml)	Relative enzyme activity (%)
Casein	100
Gelatin	3±0.14
BSA	54±2.6
Egg albumin	35±1.7

Table 7. Compatibility of alkaline protease activity from *B. licheniformis* with commercial detergents

Relative enzyme activity (%)						
Time (h)	Control	Sunlight	La Parisienne	Merit selection	Arctic Power	Bio-vert
0.0	100	100	100	100	100	100
0.5	97	95	90	89	91	88
1.0	93	91	82	80	83	81
1.5	90	88	71	69	72	70
2.0	84	81	65	61	64	64
2.5	80	75	57	54	60	59
3.0	74	62	52	48	55	50

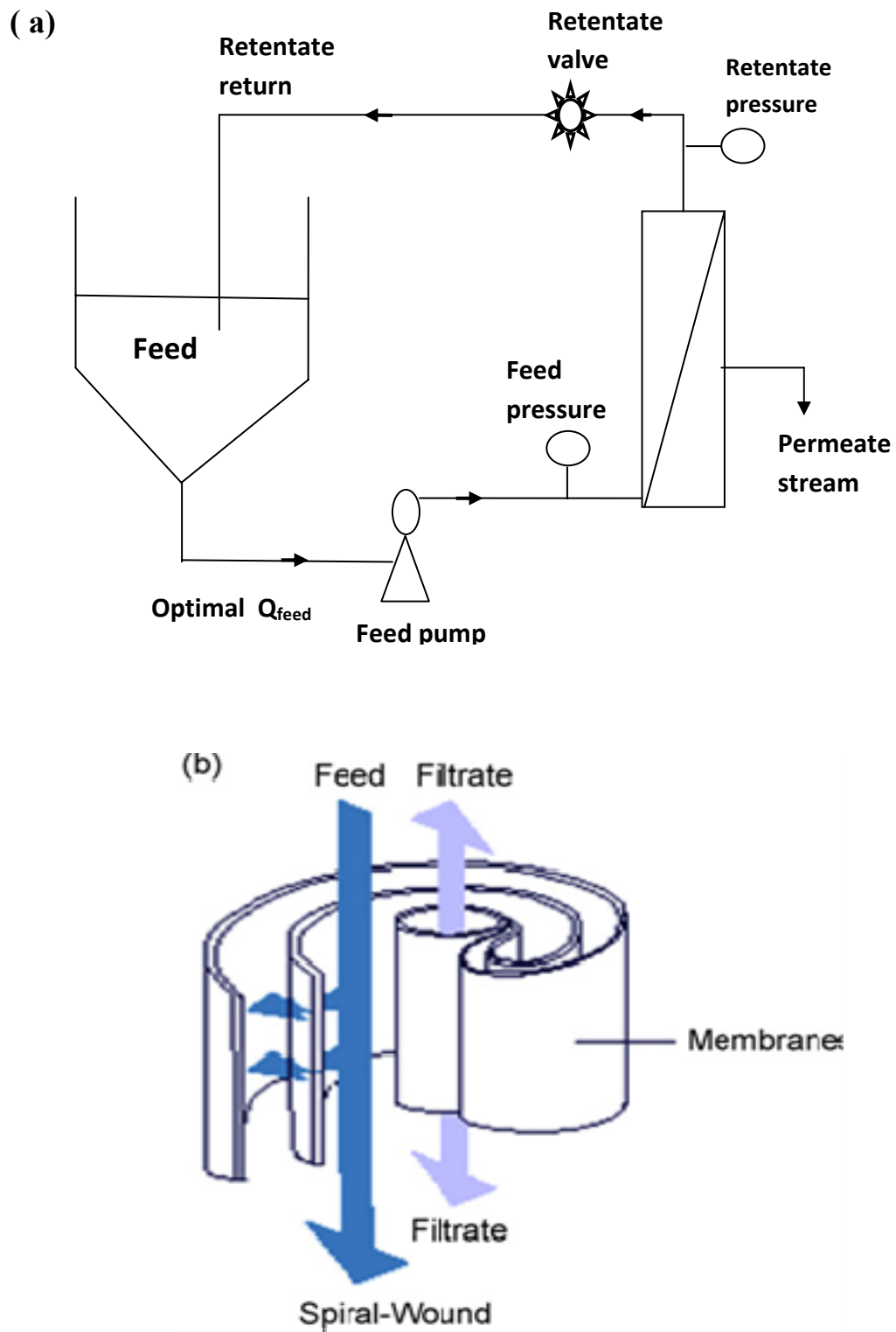


Figure 1. a) Schematic representation of the ultrafiltration process, b) cross section of the membrane

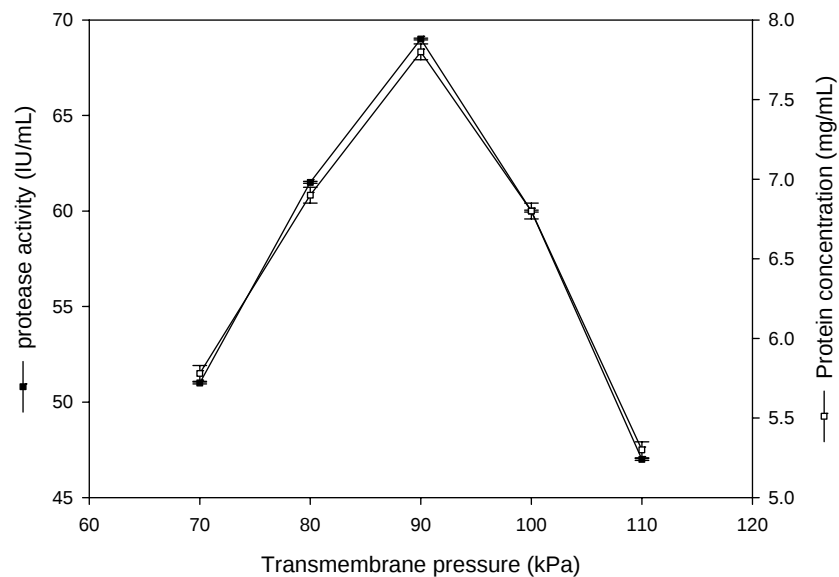


Figure 2. Protease activity and protein concentration in the retentate at different transmembrane pressures

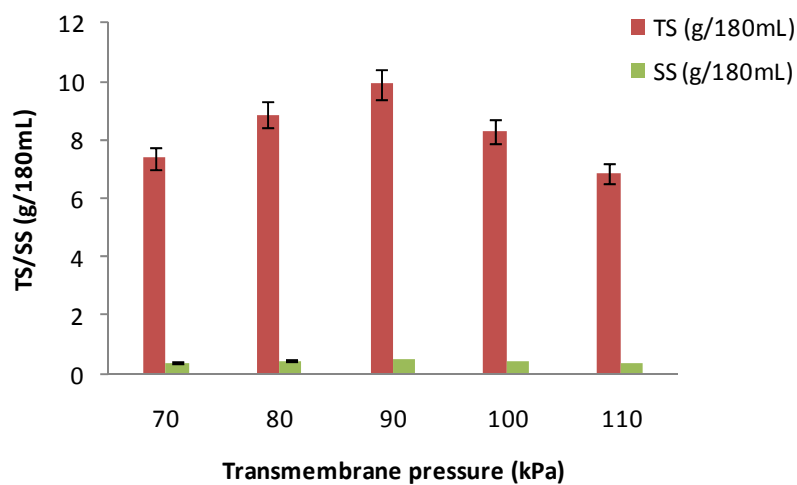


Figure 3. Total solids (TS) and suspended solids (SS) concentration in the retentate at different transmembrane pressures

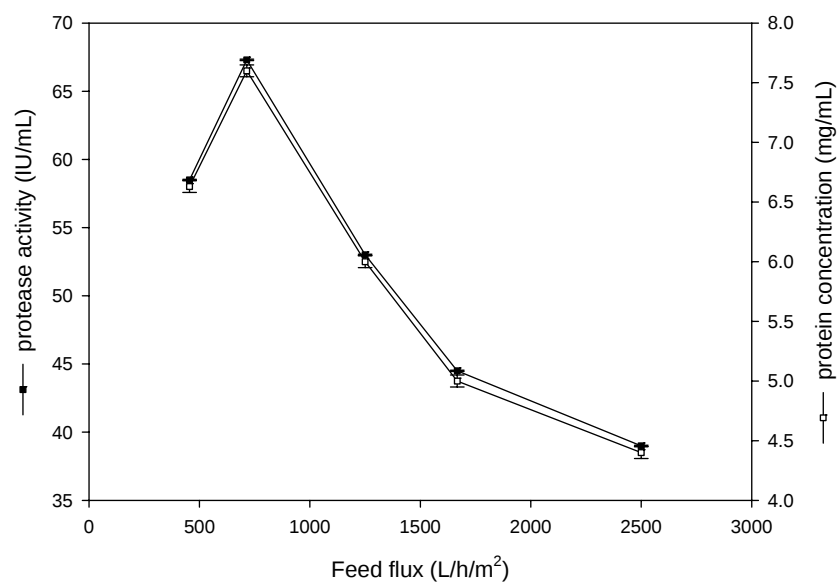


Figure 4. Protease activity and protein concentration in the retentate at different feed flux rates

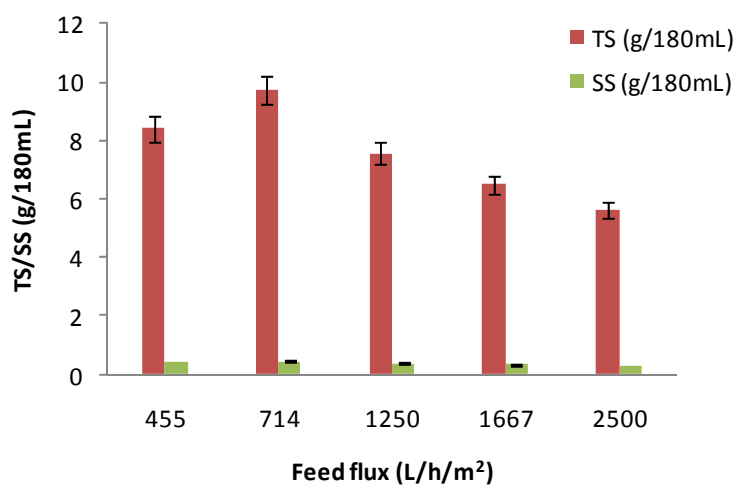


Figure 5. Total solids (TS) and suspended solids (SS) concentration in the retentate at different feed flux rates

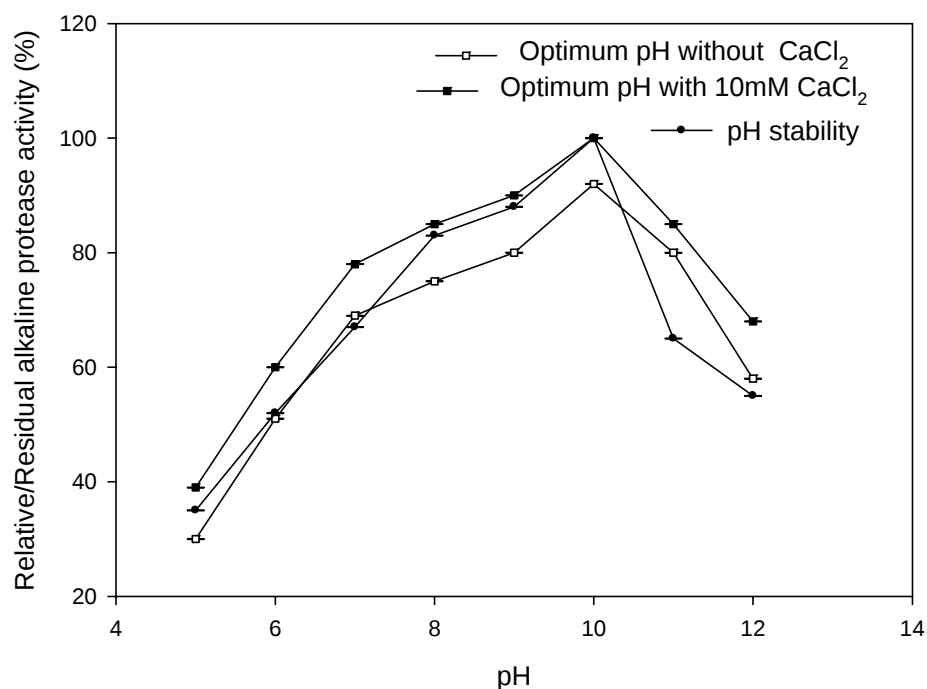


Figure 6. Effect of pH on the activity and stability of alkaline protease in the absence and presence of 10mM CaCl₂

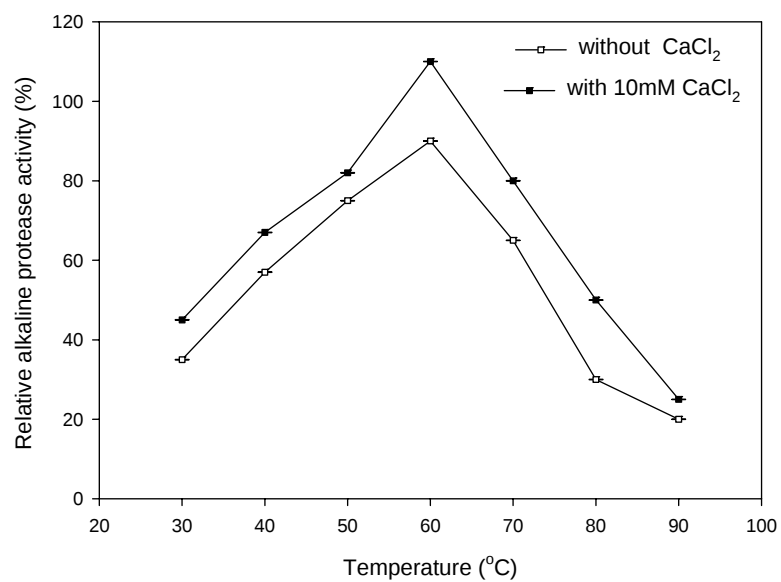


Figure 7. Effect of temperature profiles on activity of enzyme in the absence and presence of 10mM CaCl₂

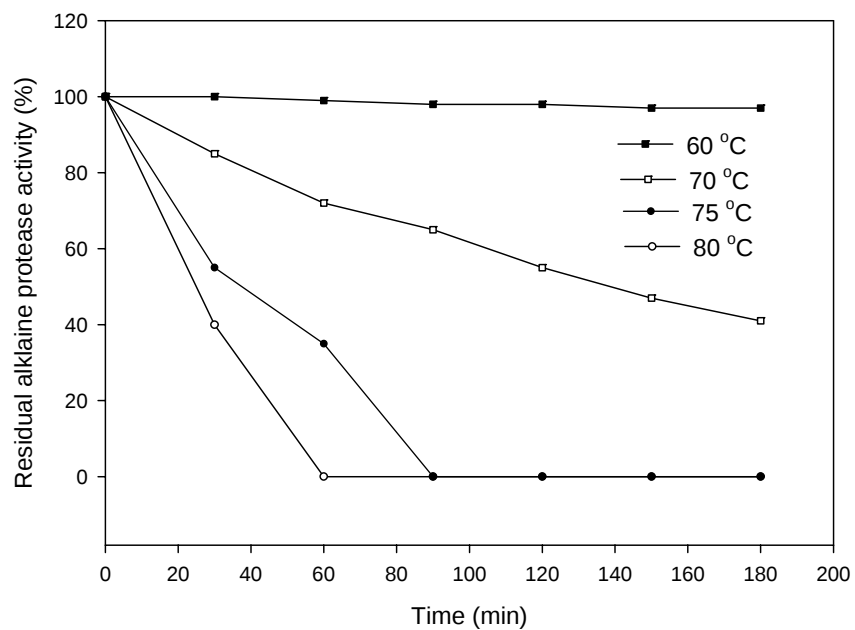


Figure 8. Effect of temperature on stability of alkaline protease enzyme (ultrafiltrated samples) in the presence of 10mM CaCl_2

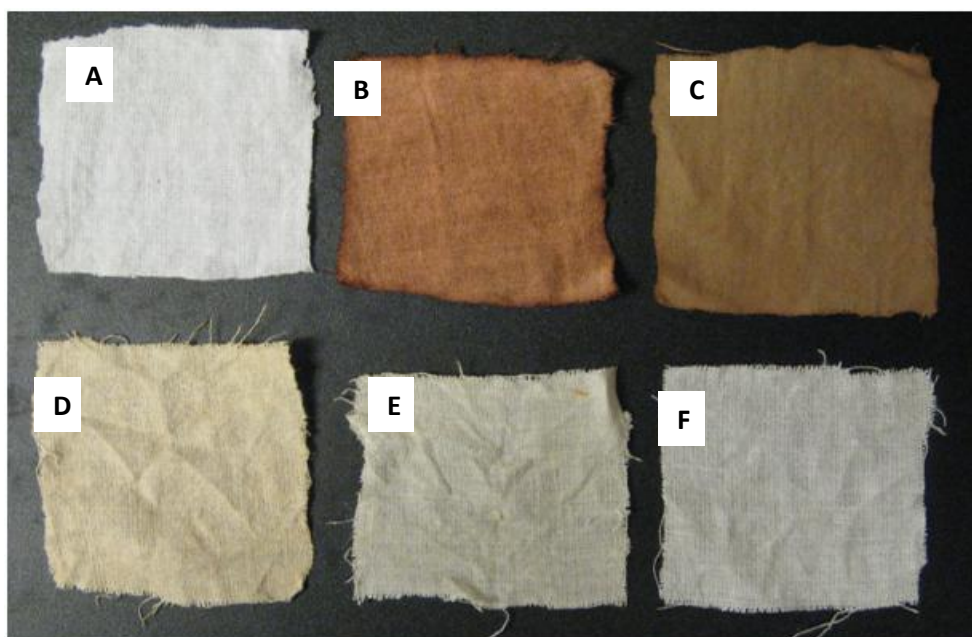


Figure 9. Washing test of alkaline protease from *B.licheniformis* ATCC 21424 in presence of detergent (Sunlight). A) Positive control, B) Negative control, C) With distilled water, D) With Enzyme alone, E) With detergent alone, and F) With enzyme + detergent.

CHAPITRE 5
CONCLUSION ET RECOMMANDATION

5.1 Conclusion

Cette étude a démontré l'amélioration de la production, la valorisation et l'application de l'enzyme alcaline produite par *B. licheniformis* en utilisant des boues d'épuration comme matières premières. Les principales conclusions tirées de cette étude sont résumées ci-dessous.

5.1.1 L'isolement, le dépistage et la comparaison des nouveaux isolats et des souches standards

Les résultats de l'étude de l'isolation suggèrent qu'une grande variété de micro-organismes isolés de la région de Québec Canada, produisent la protéase. Les protéases produites par les souches de *Bacillus* isolées sont stables sur une large gamme de pH et de température et peuvent être d'une utilisées dans différents les procédés industriels (tels que la composition des détergents, le traitement des eaux usées et le traitement du cuir). Toutefois, d'autres études sur la stabilité des enzymes dans des conditions différentes sont proposées, avant son utilisation industrielle. Les résultats obtenus à partir des études comparatives ont montré que *B. licheniformis* ATCC 21424 est capable de produire l'enzyme protéase utilisant des boues comme matière première. La production de protéase par *B. licheniformis* est plus grande que celle par les deux autres souches de référence et 5 nouvelles souches. Les résultats indiquent également que la croissance et l'activité de la protéase ont été plus élevées dans le fermenteur que dans les fioles. L'étude a démontré la pertinence d'utiliser des boues des eaux usées domestiques abondantes et à bon marché comme matières premières pour la production de la protéase. L'utilisation des boues d'épuration comme matière première pour produire des produits à valeur ajoutée pourrait résoudre davantage le problème de gestion des boues.

5.1.2 Influence des sources de carbone et d'azote sur l'amélioration de la production de la protéase alcaline

Les résultats de cette étude ont montré que l'ajout de sources supplémentaires de carbone et d'azote dans les boues d'épuration améliore la production de protéase alcaline par *B. licheniformis* ATCC 21424. Cette étude a également indiqué que l'ajout de 1,5% de lactose comme source de carbone et 1,5% de tourteau de soja comme source d'azote, avaient amélioré significativement la production de la protéase. L'activité de la protéase alcaline dans le fermenteur a été 2,6 fois plus élevée que celle dans les fioles. Les résultats de l'étude actuelle suggère la possibilité d'utiliser les déchets industrielle contenant le lactose comme le lactosérum

en poudre comme source supplémentaire de carbone pour compléter le substrat principal des boues d'épuration. Le tourteau de soja qui est l'une des sources d'azote à bon marché permet d'améliorer davantage le rendement des enzymes et le processus devient rentable et respectueux à l'environnement.

5.1.3 Récupération et application de la protéase alcaline

La récupération de la protéase alcaline utilisant le procédé d'ultrafiltration avec une pression transmembranaire optimale de 90 kPa et un flux d'alimentation de 714 L/h/m² a montré une récupération de 83% de l'activité de la protéase. La protéase de *B.licheniformis* ATCC 21424 est thermostable et alcali-tolérante, sérine protéase alcaline car elle est stable à pH alcalin et à une température élevée. La protéase alcaline thermostable récupérée par ultrafiltration peut être exploitée dans l'industrie des détergents en tant qu'additif car elle a montré une excellente stabilité sur une large gamme de température et une comptabilité avec les détergents commerciaux. L'ajout de la préparation enzymatique aux détergents pourrait remarquablement enlever les taches de sang du tissu de coton blanc.

5.2 Recommandations

La présente étude a clairement démontré l'amélioration de la production de la protéase en utilisant les boues d'épuration comme matières premières par des différentes méthodes. Toutefois, les recommandations suivantes sont proposées pour améliorer le processus des méthodes pour avoir un meilleur rendement et à les mettre en œuvre dans différentes applications.

1. Dans l'étude courante le lactose a renforcé les activités de la protéase. Le lactosérum en poudre récupéré de la fromagerie (contient 70% de lactose) peut être utilisé comme matière première pour la production de la protéase. Des études préliminaires ont été menées et les résultats obtenus ont été intéressants. Toutefois, des études d'optimisation supplémentaires doivent être étudiées pour améliorer la production de la protéase alcaline.

2. Différentes méthodes de prétraitement, tels que thermique, hydrolyse acide/alcalin et ultrasons pourrait être appliquées à des boues d'épuration avant fermentation. Les boues prétraitées pourrait renforcer la croissance de la bactérie et qui à leur tour pourrait améliorer la production de la protéase.

3. Plusieurs souches de *Bacillus* sp. tels que *B. licheniformis* ont prouvé leur capacité d'améliorer la croissance des plantes, favorisant ainsi la biofertilisation (Lucy *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2009). Ainsi, les boues des eaux usées fermentées par *B. licheniformis* pourrait être centrifugées et utilisées comme biofertilisants ou des engrais biologiques. Par conséquent, il pourrait réduire le problème de l'élimination de ces déchets secondaires. Une analyse plus poussée sur la capacité de ces souches d'améliorer la croissance des plantes en utilisant des plantes adaptés à la culture hydroponique de serre ou doivent être effectués.

4. Le développement de souches microbiennes très productives est une condition obligatoire pour développer des procédés biotechnologiques efficaces. Différentes méthodes d'amélioration des souches, telles que les mutations classiques et la technologie de l'ADN recombiné pourraient être appliquées à la souche *B. licheniformis* et la souche mutante afin d'obtenir une productivité élevée de l'enzyme.

5. La fermentation microbienne avec des cellules immobilisées offre un grand nombre d'avantages en comparaison avec la fermentation des cellules classiques libres, tels que la facilité relative de la séparation de la masse des cellules du liquide pour la réutilisation, la réduction des risques de contamination et une meilleure stabilité opérationnelle. La technologie d'immobilisation des cellules est apte de produire des enzymes extracellulaires et il ya un intérêt croissant dans l'application de cette technique pour la production en continue d'enzymes. De nombreuses méthodes d'adsorption à savoir, la fixation, le piégeage et l'encapsulation sont largement utilisées pour l'immobilisation. Parmi toutes les méthodes, l'immobilisation de cellules entières par une technique de piégeage est simple et largement utilisée (Adinarayana *et al.*, 2005). En outre, la technique de piégeage d'une culture dans une matrice peut être mis en place et conduit à une meilleure productivité. Ainsi, l'immobilisation des cellules de *B. licheniformis* pourrait être plus efficace pour améliorer la productivité de la protéase alcaline dans des fermenteurs de type batch.

6. Les protéases alcalines pourraient être utilisées dans la gestion de différents déchets industriels. En effet, ces protéases peuvent solubiliser les protéines dans les déchets grâce à un processus en plusieurs étapes pour récupérer au final des concentrés liquides ou de la matière sèche. Ainsi, les protéases pourraient être appliquées dans le traitement des eaux usées pour dégrader les matières solides des boues d'épuration. Ces boues dégradées pourraient être utilisées

dans les fermentations microbiennes pour la production des produits à valeurs ajoutée tels que les biocarburants, les biofertilisants, etc.

ANNEXES

ANNEX 1

Raw data

**Isolation and characterization of protease producing bacteria from Quebec soil
and water samples (Chapitre 2, partie 1)**

Raw data of Figure 1. Growth (TC and VS) and PA of *Bacillus* strains in shake flask

Time (h)	Strain B2			
	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (IU/ml)	SPA (IU/10 ⁸ cells)
0	1.50E-03	1.00E-04	0	0
3	2.00E-01	1.40E-01	0.01	0.05
6	2.70E-01	5.00E-01	0.02	0.07
9	5.90E-01	7.20E-01	0.05	0.08
12	8.00E-01	1.50E+00	0.07	0.09
15	1.20E+00	3.10E+00	0.12	0.1
18	2.10E+00	3.30E+00	0.22	0.1
21	2.47E+00	3.40E+00	0.26	0.105
24	2.60E+00	4.10E+00	0.29	0.11
30	2.75E+00	5.00E+00	0.35	0.12
36	2.65E+00	4.80E+00	0.27	0.1
42	2.60E+00	4.75E+00	0.22	0.08
48	2.50E+00	4.66E+00	0.18	0.07
54	2.45E+00	4.60E+00	0.13	0.05
60	2.40E+00	4.50E+00	0.09	0.037
Time (h)	Strain B4			
	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (IU/ml)	SPA (IU/10 ⁸ cells)
0	1.00E-03	1.00E-04	0	0
3	1.00E-01	1.10E-01	0.005	0.05
6	1.50E-01	3.00E-01	0.01	0.06
9	4.10E-01	3.20E-01	0.03	0.07
12	8.20E-01	1.10E+00	0.07	0.08
15	1.00E+00	1.40E+00	0.09	0.09
18	1.50E+00	2.60E+00	0.14	0.09
21	2.20E+00	3.60E+00	0.22	0.1
24	2.40E+00	3.80E+00	0.24	0.1
30	2.50E+00	4.35E+00	0.28	0.11
36	2.50E+00	4.20E+00	0.25	0.1
42	2.45E+00	4.15E+00	0.21	0.085
48	2.41E+00	4.10E+00	0.17	0.07
54	2.39E+00	3.90E+00	0.14	0.059
60	2.38E+00	3.80E+00	0.12	0.05

Time (h)	Strain B11			
	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (IU/ml)	SPA (IU/10 ⁸ cells)
0	3.20E-03	5.50E-05	0	0
3	2.00E-01	5.00E-04	0.015	0.07
6	4.50E-01	5.90E-04	0.04	0.08
9	7.50E-01	8.60E-02	0.08	0.1
12	1.00E+00	1.80E-01	0.1	0.1
15	1.50E+00	7.50E-01	0.17	0.11
18	2.10E+00	9.00E-01	0.24	0.115
21	3.00E+00	1.00E+00	0.36	0.12
24	3.60E+00	1.10E+00	0.44	0.122
30	4.00E+00	1.30E+00	0.5	0.125
36	3.90E+00	1.30E+00	0.51	0.131
42	3.85E+00	1.28E+00	0.53	0.138
48	3.80E+00	1.27E+00	0.55	0.145
54	3.70E+00	1.25E+00	0.45	0.12
60	3.60E+00	1.23E+00	0.34	0.09
Time (h)	Strain B12			
	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (IU/ml)	SPA (IU/10 ⁸ cells)
0	3.90E-03	2.00E-06	0	0
3	2.90E-01	6.00E-06	0.01	0.03
6	9.00E-01	4.00E-01	0.05	0.05
9	1.50E+00	1.00E+00	0.1	0.06
12	2.50E+00	1.80E+00	0.18	0.072
15	3.00E+00	2.20E+00	0.23	0.076
18	3.60E+00	3.00E+00	0.29	0.08
21	4.00E+00	4.50E+00	0.33	0.082
24	4.40E+00	5.50E+00	0.38	0.086
30	4.80E+00	6.00E+00	0.42	0.09
36	4.70E+00	6.00E+00	0.33	0.07
42	4.60E+00	5.98E+00	0.31	0.067
48	4.55E+00	5.95E+00	0.25	0.05
54	4.50E+00	5.90E+00	0.2	0.044
60	4.40E+00	5.86E+00	0.18	0.04

Time (h)	Strain B15			
	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (IU/ml)	SPA (IU/10 ⁸ cells)
0	1.60E-03	2.00E-04	0	0
3	2.00E-01	6.50E-04	0.02	0.1
6	4.20E-01	1.50E-03	0.05	0.11
9	7.30E-01	1.90E-03	0.09	0.12
12	9.00E-01	3.20E-01	0.11	0.12
15	1.32E+00	3.00E+00	0.17	0.126
18	1.40E+00	3.50E+00	0.2	0.14
21	1.60E+00	6.00E+00	0.25	0.156
24	2.75E+00	9.50E+00	0.43	0.156
30	2.85E+00	1.02E+01	0.47	0.164
36	2.90E+00	1.11E+01	0.51	0.175
42	3.05E+00	1.20E+01	0.59	0.19
48	3.00E+00	1.20E+01	0.52	0.17
54	2.94E+00	1.20E+01	0.45	0.15
60	2.86E+00	1.19E+01	0.37	0.13

Raw data of Figure 2. Growth (TC and VS), DO concentration and PA of *Bacillus* strains in fermentor

Time (h)	Strain B2				
	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (IU/ml)	SPA (IU/10 ⁸ cells)	DO
0	1.70E-03	1.70E-04	0	0	64.2
3	3.00E-01	1.70E-01	0.02	0.06	53.8
6	3.20E-01	7.20E-01	0.025	0.08	36
9	6.20E-01	7.70E-01	0.07	0.09	26
12	1.00E+00	3.10E+00	0.1	0.1	26.2
15	1.40E+00	3.80E+00	0.16	0.11	35.6
18	2.30E+00	5.40E+00	0.3	0.13	41.7
21	3.40E+00	6.60E+00	0.51	0.15	58
24	3.20E+00	6.50E+00	0.44	0.14	55.2
30	3.10E+00	6.45E+00	0.39	0.12	48.4
36	3.10E+00	6.40E+00	0.32	0.103	51.5
42	3.00E+00	6.35E+00	0.28	0.09	55.3
48	2.95E+00	6.33E+00	0.24	0.08	60
54	2.80E+00	6.29E+00	0.2	0.07	63
60	2.70E+00	6.25E+00	0.16	0.059	67
Time (h)	Strain B4				
	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (IU/ml)	SPA (IU/10 ⁸ cells)	DO
0	1.40E-03	1.30E-04	0	0	88.5
3	1.10E-01	1.20E-01	0.01	0.09	52.2
6	2.00E-01	4.50E-01	0.02	0.1	36.5
9	4.50E-01	5.10E-01	0.04	0.11	27.9
12	8.90E-01	2.60E+00	0.11	0.115	27.4
15	1.20E+00	3.10E+00	0.15	0.12	37.4
18	1.70E+00	4.10E+00	0.25	0.14	44.6
21	2.50E+00	5.20E+00	0.38	0.15	35.9
24	3.15E+00	5.40E+00	0.46	0.17	38.7
30	3.10E+00	5.40E+00	0.44	0.148	37.9
36	3.00E+00	5.39E+00	0.39	0.135	27.8
42	2.90E+00	5.30E+00	0.37	0.13	32
48	2.85E+00	5.20E+00	0.32	0.11	36
54	2.75E+00	5.15E+00	0.28	0.1	40
60	2.70E+00	5.13E+00	0.26	0.09	45

Time (h)	Strain B11				
	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (IU/ml)	SPA (IU/10 ⁸ cells)	DO
0	4.00E-03	6.20E-05	0	0	96.3
3	2.50E-01	5.80E-04	0.009	0.036	46.5
6	5.20E-01	6.60E-04	0.05	0.09	39
9	8.20E-01	9.60E-02	0.09	0.1	65.7
12	1.00E+00	2.80E-01	0.12	0.12	59.9
15	1.70E+00	8.50E-01	0.22	0.13	51.3
18	2.50E+00	1.40E+00	0.38	0.15	27.3
21	3.20E+00	1.50E+00	0.48	0.15	42
24	4.30E+00	1.60E+00	0.75	0.17	56.7
30	4.15E+00	1.59E+00	0.79	0.19	58.1
36	4.10E+00	1.55E+00	0.83	0.2	51.2
42	4.00E+00	1.52E+00	0.94	0.24	53.3
48	3.95E+00	1.50E+00	0.87	0.22	55
54	3.85E+00	1.47E+00	0.7	0.18	58.8
60	3.76E+00	1.43E+00	0.57	0.15	60
Time (h)	Strain B12				
	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (IU/ml)	SPA (IU/10 ⁸ cells)	DO
0	5.90E-03	3.70E-03	0	0	94
3	4.90E-01	8.20E-03	0.02	0.04	48.6
6	1.10E+00	6.00E-01	0.06	0.054	41.6
9	2.10E+00	1.20E+00	0.15	0.07	40.3
12	3.20E+00	3.80E+00	0.3	0.09	38.8
15	4.00E+00	4.20E+00	0.42	0.105	39.1
18	5.20E+00	5.00E+00	0.6	0.11	30.3
21	5.90E+00	6.50E+00	0.74	0.12	38.3
24	6.40E+00	8.00E+00	0.84	0.13	30.4
30	6.30E+00	8.00E+00	0.76	0.12	32.8
36	6.25E+00	7.90E+00	0.6	0.09	50.6
42	6.13E+00	7.87E+00	0.53	0.08	71.1
48	6.10E+00	7.81E+00	0.49	0.08	72.1
54	5.90E+00	7.80E+00	0.38	0.06	74
60	5.75E+00	7.70E+00	0.29	0.05	79

Time (h)	Strain B15				
	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (IU/ml)	SPA (IU/10 ⁸ cells)	DO
0	3.10E-03	3.00E-04	0	0	83.4
3	3.00E-01	8.10E-04	0.03	0.1	44.4
6	5.70E-01	1.00E-03	0.07	0.12	38.4
9	8.80E-01	3.00E-03	0.12	0.13	45.4
12	9.40E-01	4.90E-01	0.14	0.15	43
15	1.47E+00	4.50E+00	0.26	0.17	39.3
18	1.50E+00	4.50E+00	0.35	0.23	38.4
21	1.67E+00	6.15E+00	0.46	0.27	33.3
24	2.10E+00	6.25E+00	0.6	0.28	34.3
30	2.75E+00	7.50E+00	0.85	0.3	39.7
36	3.35E+00	8.90E+00	1.07	0.32	28
42	3.45E+00	9.00E+00	0.95	0.28	40.7
48	3.40E+00	8.90E+00	0.85	0.25	32.2
54	3.25E+00	8.80E+00	0.69	0.21	27.8
60	3.14E+00	8.75E+00	0.5	0.17	28.8

Raw data of Figure 3. Effect of temperature on the protease activity produced by *Bacillus* strains in the absence (A) and presence (B) of 10 mM CaCl₂

Temperature (°C)	Optimum pH with 10 mm CaCl ₂ (Relative enzyme activity %)					Optimum pH without 10 mm CaCl ₂ (Relative enzyme activity %)				
	B2	B4	B11	B12	B15	B2	B4	B11	B12	B15
20	46.6	40	40	33.33	31.25	50	54	43	36	35.5
30	66.6	75	76.6	81.2	62.5	81	89	92	94	75.4
40	100	100	100	100	100	116	123	128	136	119
50	53.3	60	62	63.33	67	69	82	86	88.6	82
60	30	28	33.1	25	34	43	37	42	33	44.8
70	5	0	4	1	8	15	3	8	6	12

Raw data of Figure 4. Thermostability of proteases produced by *Bacillus* strains at different temperatures in the presence of 10 mM CaCl₂ after 2 h incubation

Temperature (°C)	Residual enzyme activity in the presence of CaCl ₂ (%)				
	B2	B4	B11	B12	B15
20	100	100	100	100	100
30	100	99	100	99	100
40	100	98	99	96	100
50	34	37	25	29	43
60	8	10	8	9	12
70	0	0	0	0	0

ANNEX 2

Raw data

Comparison of protease activities in different *Bacillus licheniformis* strains using wastewater sludge and synthetic soy medium as raw material (chapter 2, partie 2)

Raw data of Figure 1. Protease production by *B. licheniformis* strains using synthetic soy medium (a) and sludge (b) as raw material in shake flask. (TC- total cell count, SC- spore count, PA- protease activity and SPA- specific protease activity)

21415	Synthetic medium (shake flask)				Sludge (shake flask)			
Time (h)	TC (CFU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SPA (IU/10 ⁹ cells)	TC (CFU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SPA (IU/10 ⁹ cells)
0	3.00E+05	1.00E+04	0	0	8.00E+05	1.00E+04	0	0
3	6.00E+05	3.00E+04	0	0	9.00E+05	5.00E+04	0	0
6	7.00E+07	5.00E+05	0.01	0.1	2.00E+08	1.00E+06	0.05	0.3
9	1.50E+08	1.00E+06	0.07	0.5	4.40E+08	3.57E+06	0.2	0.5
12	3.00E+08	6.00E+06	0.2	0.6	6.20E+08	9.00E+06	0.4	0.6
15	9.00E+08	9.00E+06	0.8	0.9	1.20E+09	2.00E+07	0.9	0.8
18	1.20E+09	2.00E+07	1.2	1	1.30E+09	5.00E+07	1.3	1
21	1.40E+09	8.00E+07	1.5	1.1	1.50E+09	7.00E+07	1.7	1.1
24	1.50E+09	1.00E+08	1.7	1.1	1.60E+09	9.00E+07	1.9	1.2
30	1.70E+09	1.50E+08	2	1.2	1.80E+09	1.50E+08	2.3	1.3
36	1.75E+09	1.80E+08	2.2	1.25	1.90E+09	1.80E+08	2.5	1.3
42	1.80E+09	2.00E+08	2.3	1.35	2.10E+09	1.90E+08	2.9	1.4
48	1.60E+09	2.40E+08	2.4	1.5	2.30E+09	2.00E+08	3.1	1.5
54	1.40E+09	2.30E+08	2	1.4	2.10E+09	1.95E+08	2.7	1.3
60	1.20E+09	2.20E+08	1.4	1.2	2.00E+09	1.85E+08	2.3	1.2

21417	Synthetic medium (shake flask)				Sludge (shake flask)			
Time (h)	TC (CFU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SPA (IU/10 ⁹ cells)	TC (CFU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SPA (IU/10 ⁹ cells)
0	5.00E+05	2.00E+04	0	0	3.00E+05	2.50E+04	0	0
3	6.00E+05	3.00E+04	0	0	4.00E+05	3.00E+04	0	0
6	9.00E+07	9.00E+05	0.02	0.2	8.00E+07	9.00E+05	0.009	0.1
9	1.60E+08	4.00E+06	0.05	0.3	1.40E+08	2.00E+06	0.05	0.4
12	2.70E+08	8.00E+06	0.1	0.4	2.50E+08	7.00E+06	0.1	0.4
15	9.00E+08	5.00E+07	0.4	0.6	7.00E+08	1.00E+07	0.4	0.6
18	1.10E+09	7.00E+07	0.9	0.8	1.00E+09	4.00E+07	0.8	0.8
21	1.20E+09	9.00E+07	1.2	1	1.10E+09	7.00E+07	1	0.9
24	1.30E+09	1.10E+08	1.4	1.1	1.20E+09	9.00E+07	1.2	1
30	1.35E+09	1.40E+08	1.6	1.2	1.25E+09	1.10E+08	1.4	1.1
36	1.40E+09	1.50E+08	1.7	1.2	1.30E+09	1.30E+08	1.6	1.2
42	1.50E+09	1.60E+08	2	1.3	1.40E+09	1.50E+08	1.9	1.35
48	1.30E+09	1.52E+08	1.5	1.2	1.20E+09	1.40E+08	1.4	1.2
54	1.20E+09	1.40E+08	1.2	1	1.10E+09	1.31E+08	1.1	1
60	1.10E+09	1.30E+08	1	0.9	1.00E+09	1.22E+08	0.8	0.8

21424	Synthetic medium (shake flask)				Sludge (shake flask)			
Time (h)	TC (CFU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SPA (IU/10 ⁹ cells)	TC (CFU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SPA (IU/10 ⁹ cells)
0	7.00E+05	1.00E+04	0	0	8.00E+05	1.00E+04	0	0
3	9.00E+05	5.00E+04	0	0	9.00E+05	5.00E+04	0	0
6	9.00E+07	3.00E+05	0.03	0.3	2.00E+08	1.00E+06	0.05	0.3
9	2.20E+08	6.00E+05	0.1	0.5	4.40E+08	3.57E+06	0.2	0.5
12	3.40E+08	1.00E+06	0.3	0.9	6.20E+08	9.00E+06	0.4	0.6
15	1.00E+09	6.00E+06	1	1	1.20E+09	2.00E+07	0.9	0.8
18	1.20E+09	9.00E+06	1.3	1.1	1.30E+09	5.00E+07	1.3	1
21	1.30E+09	3.00E+07	1.5	1.2	1.50E+09	7.00E+07	1.7	1.1
24	1.50E+09	7.00E+07	1.9	1.3	1.60E+09	9.00E+07	1.9	1.2
30	1.70E+09	1.00E+08	2.3	1.4	1.80E+09	1.50E+08	2.3	1.3
36	1.90E+09	1.30E+08	2.6	1.4	1.90E+09	1.80E+08	2.5	1.3
42	2.00E+09	1.50E+08	2.9	1.5	2.10E+09	1.90E+08	2.9	1.4
48	2.10E+09	2.20E+08	3.3	1.6	2.30E+09	2.00E+08	3.1	1.5
54	1.90E+09	2.00E+08	2.7	1.4	2.10E+09	1.95E+08	2.7	1.3
60	1.70E+09	1.90E+08	2.2	1.3	2.00E+09	1.85E+08	2.3	1.2

Raw data of Figure 2. Protease production by *B. licheniformis* strains using synthetic soy medium (a) and sludge (b) as raw material in fermentor. (TC- Total cell count, SC - spore count, PA- Protease activity and SPA- Specific protease activity)

21415	Synthetic medium (fermentor)				Sludge (fermentor)			
Time (h)	TC (CFU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SPA (IU/10 ⁹ cells)	TC (CFU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SPA (IU/10 ⁹ cells)
0	3.00E+06	3.00E+04	0	0	4.00E+06	4.20E+04	0	0
3	6.00E+06	5.00E+04	0	0	7.00E+06	6.50E+04	0	0
6	7.00E+07	9.00E+05	0.06	0.8	1.00E+07	9.00E+05	0.007	0.7
9	1.00E+08	2.00E+06	0.1	1	4.00E+07	1.00E+06	0.03	0.7
12	7.00E+08	9.00E+06	0.9	1.2	9.00E+07	6.00E+06	0.09	1
15	1.00E+09	2.50E+07	1.3	1.3	2.00E+08	9.00E+06	0.2	1
18	1.30E+09	6.00E+07	2	1.5	8.00E+08	2.00E+07	1	1.2
21	1.70E+09	1.00E+08	3	1.7	1.00E+09	6.00E+07	1.4	1.4
24	2.20E+09	1.30E+08	3.8	1.7	1.30E+09	9.00E+07	2.2	1.6
30	2.40E+09	2.20E+08	4.5	1.8	1.80E+09	1.50E+08	3.2	1.7
36	2.50E+09	2.80E+08	5.2	2	2.20E+09	2.00E+08	4.2	1.9
42	3.00E+09	3.40E+08	6.6	2.2	2.70E+09	2.80E+08	5.7	2.1
48	2.90E+09	4.20E+08	7.5	2.5	2.60E+09	3.40E+08	6	2.3
54	2.80E+09	4.00E+08	6.5	2.3	2.50E+09	3.34E+08	5	2
60	2.60E+09	3.80E+08	5.6	2.1	2.40E+09	3.20E+08	4	1.6

21417	Synthetic medium (fermentor)				Sludge (fermentor)			
Time (h)	TC (CFU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SPA (IU/10 ⁹ cells)	TC (CFU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SPA (IU/10 ⁹ cells)
0	2.00E+06	4.00E+04	0	0	5.00E+05	5.00E+04	0	0
3	4.00E+06	6.00E+04	0	0	9.00E+05	9.00E+04	0	0
6	9.00E+06	1.00E+06	0.005	0.5	3.00E+06	3.00E+05	0.0008	0.2
9	2.00E+07	7.00E+06	0.01	0.5	7.00E+06	7.00E+05	0.003	0.4
12	9.00E+07	2.00E+07	0.08	0.8	2.00E+07	2.00E+06	0.01	0.5
15	2.00E+08	8.00E+07	0.2	1	7.00E+07	9.00E+06	0.06	0.8
18	7.00E+08	1.40E+08	0.9	1.2	1.00E+08	3.00E+07	0.1	1
21	1.00E+09	2.00E+08	1.3	1.3	6.00E+08	1.00E+08	0.8	1.3
24	1.40E+09	2.40E+08	2.2	1.5	1.00E+09	1.70E+08	1.4	1.4
30	2.00E+09	2.90E+08	3.2	1.7	1.50E+09	2.50E+08	2.3	1.5
36	2.50E+09	3.50E+08	4.5	1.8	2.00E+09	3.10E+08	3.3	1.6
42	2.30E+09	3.40E+08	3.5	1.5	1.80E+09	3.00E+08	2.6	1.4
48	2.20E+09	3.35E+08	3	1.3	1.70E+09	2.90E+08	2.2	1.2
54	2.00E+09	3.30E+08	2.2	1.1	1.50E+09	2.80E+08	1.5	1
60	1.90E+09	3.20E+08	1.6	0.8	1.40E+09	2.69E+08	1	0.7

21424	Synthetic medium (fermentor)				Sludge (fermentor)			
Time (h)	TC (CFU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SPA (IU/10 ⁹ cells)	TC (CFU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SPA (IU/10 ⁹ cells)
0	4.00E+05	1.00E+04	0	0	3.00E+05	2.00E+04	0	0
3	8.00E+05	7.00E+04	0	0	6.00E+05	8.00E+04	0	0
6	1.00E+07	2.00E+06	0.01	1	3.00E+07	5.00E+05	0.02	0.6
9	5.00E+07	6.50E+06	0.06	1.2	9.00E+07	9.00E+05	0.1	1.1
12	3.00E+08	1.00E+07	0.5	1.6	3.00E+08	3.00E+06	0.4	1.3
15	8.00E+08	6.00E+07	1.4	1.7	8.00E+08	9.00E+06	1.2	1.5
18	1.00E+09	9.00E+07	1.9	1.9	1.00E+09	1.00E+07	1.8	1.8
21	1.50E+09	1.50E+08	3.2	2.1	1.30E+09	6.00E+07	2.8	2.1
24	2.00E+09	2.00E+08	4.5	2.2	2.00E+09	1.40E+08	4.5	2.2
30	2.90E+09	2.70E+08	7	2.4	2.50E+09	2.60E+08	6	2.4
36	4.00E+09	3.30E+08	10	2.5	3.20E+09	3.70E+08	8.5	2.6
42	3.80E+09	4.50E+08	12	3.15	3.70E+09	4.10E+08	11	2.9
48	3.70E+09	4.45E+08	10.6	2.8	3.60E+09	3.90E+08	9	2.5
54	3.50E+09	4.35E+08	9.2	2.6	3.40E+09	3.79E+08	7.5	2.2
60	3.40E+09	4.20E+08	8	2.3	3.30E+09	3.65E+08	6	1.8

Raw data of Figure 3. Correlation of protease activity with viable spore count count of different media [synthetic soy medium (a) and sludge (b)] in fermentor by different *B. licheniformis* strains. (SC- spore count, PA- Protease activity)

Synthetic soy medium						
Time (h)	21415		21417		21424	
	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)
0	3.00E+04	0	4.00E+04	0	1.00E+04	0
3	5.00E+04	0	6.00E+04	0	7.00E+04	0
6	9.00E+05	0.06	1.00E+06	0.005	2.00E+06	0.01
9	2.00E+06	0.1	7.00E+06	0.01	6.50E+06	0.06
12	9.00E+06	0.9	2.00E+07	0.08	1.00E+07	0.5
15	2.50E+07	1.3	8.00E+07	0.2	6.00E+07	1.4
18	6.00E+07	2	1.40E+08	0.9	9.00E+07	1.9
21	1.00E+08	3	2.00E+08	1.3	1.50E+08	3.2
24	1.30E+08	3.8	2.40E+08	2.2	2.00E+08	4.5
30	2.20E+08	4.5	2.90E+08	3.2	2.70E+08	7
36	2.80E+08	5.2	3.50E+08	4.5	3.30E+08	10
42	3.40E+08	6.6	3.40E+08	3.5	4.50E+08	12
48	4.20E+08	7.5	3.35E+08	3	4.45E+08	10.6
54	4.00E+08	6.5	3.30E+08	2.2	4.35E+08	9.2
60	3.80E+08	5.6	3.20E+08	1.6	4.20E+08	8

Sludge						
Time (h)	21415		21417		21424	
	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SC (CFU/mL)	PA (IU/mL)
0	4.20E+04	0	5.00E+04	0	2.00E+04	0
3	6.50E+04	0	9.00E+04	0	8.00E+04	0
6	9.00E+05	0.007	3.00E+05	0.0008	5.00E+05	0.02
9	1.00E+06	0.03	7.00E+05	0.003	9.00E+05	0.1
12	6.00E+06	0.09	2.00E+06	0.01	3.00E+06	0.4
15	9.00E+06	0.2	9.00E+06	0.06	9.00E+06	1.2
18	2.00E+07	1	3.00E+07	0.1	1.00E+07	1.8
21	6.00E+07	1.4	1.00E+08	0.8	6.00E+07	2.8
24	9.00E+07	2.2	1.70E+08	1.4	1.40E+08	4.5
30	1.50E+08	3.2	2.50E+08	2.3	2.60E+08	6
36	2.00E+08	4.2	3.10E+08	3.3	3.70E+08	8.5
42	2.80E+08	5.7	3.00E+08	2.6	4.10E+08	11
48	3.40E+08	6	2.90E+08	2.2	3.90E+08	9
54	3.34E+08	5	2.80E+08	1.5	3.79E+08	7.5
60	3.20E+08	4	2.69E+08	1	3.65E+08	6

ANNEX 3

Raw data

**Augmentation of protease production by supplementing carbon and nitrogen sources
to wastewater sludge medium (chapitre 3)**

Raw data of Figure 1. Effect of different carbon sources on alkaline protease production (TC- total cell count, VS- viable spore count, PA- protease activity and SA- specific activity)

Time (h)	Control				Glucose			
	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	5.00E+06	1.00E+04	0	0	5.80E+06	2.00E+04	0.1	0.03
6	3.90E+07	1.00E+06	0.08	0.03	4.50E+07	4.00E+06	0.3	0.1
12	3.00E+08	9.00E+06	0.45	0.09	9.00E+08	1.10E+07	0.7	0.25
18	9.70E+08	5.00E+07	1.4	0.3	2.50E+09	4.50E+07	1.5	0.6
24	1.70E+09	9.00E+07	2	0.6	6.50E+09	2.00E+08	1.9	0.73
30	2.00E+09	1.50E+08	2.3	0.9	8.30E+09	6.70E+08	2.4	0.9
36	2.30E+09	1.80E+08	2.5	1.2	9.40E+09	9.80E+08	2.9	1.1
42	2.50E+09	1.90E+08	2.8	1.4	1.10E+10	1.20E+09	3.2	1.4
48	2.60E+09	2.00E+08	3.1	1.6	9.80E+09	1.10E+09	2.8	1.2
54	2.40E+09	1.95E+08	2.65	1.2	9.60E+09	1.00E+09	2.5	1.1
60	2.20E+09	1.85E+08	2	0.8	9.40E+09	9.80E+08	2.1	1
Time (h)	Lactose				Fructose			
	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	6.90E+06	2.50E+04	0.2	0.06	5.90E+06	2.00E+04	0.15	0.05
6	7.00E+07	5.00E+05	0.7	0.2	5.50E+07	3.50E+06	0.5	0.17
12	6.80E+08	1.60E+07	1.2	0.43	5.30E+08	1.30E+07	1	0.3
18	3.00E+09	8.50E+07	1.8	0.7	9.80E+08	4.00E+07	1.5	0.6
24	6.00E+09	2.00E+08	2.5	1	3.30E+09	1.00E+08	2.2	0.9
30	9.50E+09	8.70E+08	3	1.2	7.50E+09	5.70E+08	2.8	1.1
36	1.40E+10	1.20E+09	3.4	1.42	1.00E+10	1.00E+09	3.1	1.2
42	2.00E+10	1.70E+09	3.8	1.72	1.50E+10	1.40E+09	3.4	1.5
48	1.80E+10	1.50E+09	3.3	1.57	1.30E+10	1.30E+09	3.1	1.4
54	1.60E+10	1.40E+09	2.6	1.3	1.40E+10	1.10E+09	2.8	1.2
60	1.50E+10	1.20E+09	2	1	1.30E+10	1.00E+09	2.5	1.1

Time (h)	Maltose				Starch			
	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	5.10E+06	1.00E+04	0	0	4.50E+06	1.00E+03	0	0
6	3.70E+07	9.80E+05	0.07	0.02	6.90E+06	1.00E+04	0	0
12	2.80E+08	8.70E+06	0.42	0.14	2.00E+07	8.00E+05	0.25	0.08
18	9.50E+08	4.70E+07	0.9	0.33	8.70E+07	4.00E+06	0.5	0.16
24	1.50E+09	8.60E+07	1.9	0.7	1.10E+08	1.00E+07	0.8	0.3
30	1.80E+09	1.10E+08	2.1	0.8	4.00E+08	3.00E+07	1.2	0.4
36	2.10E+09	1.40E+08	2.4	0.9	6.50E+08	3.40E+07	1.6	0.6
42	2.40E+09	1.70E+08	3	1.3	8.50E+08	4.00E+07	1.9	0.8
48	2.30E+09	2.00E+08	2.6	1.1	8.30E+08	3.80E+07	1.6	0.6
54	2.10E+09	1.90E+08	2.3	1	8.10E+08	3.60E+07	1.3	0.5
60	2.00E+09	1.70E+08	1.8	0.8	8.00E+08	3.50E+07	0.9	0.3

Raw data of Figure 2. Effect of different concentrations of lactose on alkaline protease production (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)

Time (h)	0.5%				1%			
	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	3.90E+06	2.70E+03	0.12	0.04	6.90E+06	2.50E+04	0.2	0.06
6	9.50E+06	5.50E+04	0.5	0.2	7.00E+07	5.00E+05	0.7	0.2
12	4.80E+07	1.80E+06	1	0.4	6.80E+08	1.60E+07	1.2	0.43
18	9.20E+07	8.80E+06	1.4	0.6	3.00E+09	8.50E+07	1.8	0.7
24	4.00E+08	2.70E+07	2.1	0.72	6.00E+09	2.00E+08	2.5	1
30	9.50E+08	9.00E+07	2.7	1.04	9.50E+09	8.70E+08	3	1.2
36	1.50E+09	1.50E+08	3.1	1.3	1.40E+10	1.20E+09	3.4	1.42
42	7.80E+09	3.00E+08	3.4	1.5	2.00E+10	1.70E+09	3.8	1.72
48	7.60E+09	2.80E+08	3	1.4	1.80E+10	1.50E+09	3.3	1.57
54	7.50E+09	2.60E+08	2.4	1.1	1.60E+10	1.40E+09	2.6	1.3
60	7.40E+09	2.50E+08	1.8	0.9	1.50E+10	1.20E+09	2	1
Time (h)	1.5%				2%			
	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	6.50E+06	3.00E+03	0.2	0.06	4.50E+06	1.50E+03	0.2	0.06
6	7.00E+07	5.70E+05	0.9	0.3	5.10E+07	4.00E+05	0.6	0.2
12	7.50E+08	1.90E+07	1.4	0.5	5.50E+08	1.40E+07	1.1	0.4
18	5.00E+09	9.70E+07	2	0.7	1.00E+09	8.70E+07	1.8	0.7
24	8.60E+09	4.00E+08	2.9	1	6.60E+09	2.00E+08	2.3	0.9
30	1.40E+10	9.80E+08	3.6	1.4	9.80E+09	7.50E+08	2.9	1
36	2.60E+10	1.50E+09	4	1.7	1.20E+10	1.10E+09	3.5	1.4
42	5.70E+10	2.90E+09	4.7	2.24	3.00E+10	1.90E+09	4.1	1.8
48	5.50E+10	2.70E+09	3.9	1.9	2.80E+10	1.70E+09	3	1.4
54	5.30E+10	2.60E+09	2.8	1.5	2.60E+10	1.50E+09	2	1
60	5.10E+10	2.40E+09	1.7	1	2.50E+10	1.40E+09	1.1	0.6

Time (h)	2.5%				3%			
	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	3.50E+06	2.40E+03	0.1	0.03	1.50E+06	1.40E+03	0.08	0.02
6	9.00E+06	5.10E+04	0.4	0.13	7.00E+06	2.10E+04	0.3	0.09
12	4.30E+07	1.40E+06	0.8	0.3	2.30E+07	1.00E+06	0.6	0.2
18	8.70E+07	8.30E+06	1.2	0.4	5.70E+07	5.30E+06	1	0.37
24	3.60E+08	2.20E+07	1.9	0.63	1.60E+08	1.30E+07	1.5	0.52
30	9.10E+08	8.50E+07	2.4	0.9	7.10E+08	5.60E+07	2	0.7
36	1.20E+09	1.10E+08	3	1.2	1.00E+09	9.40E+07	2.6	1
42	7.40E+09	2.60E+08	3.3	1.4	5.40E+09	1.40E+08	2.8	1.2
48	7.20E+09	2.40E+08	3	1.3	5.20E+09	1.20E+08	2.1	0.9
54	7.10E+09	2.20E+08	2.3	1.1	5.10E+09	1.10E+08	1.6	0.7
60	7.00E+09	2.10E+08	1.7	0.85	5.00E+09	9.80E+07	1	0.45

Raw data of Figure 3. Effect of different nitrogen sources on alkaline protease production (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)

Time (h)	Soya bean meal				Casaminoacids			
	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	6.60E+06	2.00E+04	0.2	0.06	6.00E+06	1.00E+04	0.1	0.03
6	6.50E+07	3.90E+05	0.8	0.3	5.80E+07	1.90E+05	0.7	0.23
12	6.50E+08	1.40E+07	1.3	0.5	5.90E+08	1.00E+07	1.1	0.4
18	2.00E+09	8.50E+07	1.9	0.7	1.00E+09	6.50E+07	1.7	0.7
24	6.50E+09	2.00E+08	2.7	0.93	4.00E+09	1.00E+08	2.6	1
30	8.50E+09	7.70E+08	3.4	1.2	7.50E+09	6.70E+08	3.3	1.2
36	1.20E+10	1.00E+09	3.5	1.35	1.00E+10	9.80E+08	3.7	1.5
42	1.80E+10	1.50E+09	4.3	2	1.40E+10	1.30E+09	4.3	2
48	1.60E+10	1.40E+09	4	1.8	1.20E+10	1.20E+09	4	1.8
54	1.50E+10	1.20E+09	3.5	1.6	1.10E+10	1.10E+09	3.3	1.5
60	1.40E+10	1.10E+09	2.8	1.4	9.90E+09	1.00E+09	2.7	1.3
Time (h)	Peptone				(NH ₄) ₂ SO ₄			
	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	5.20E+06	1.00E+04	0.09	0.03	3.50E+06	1.00E+03	0	0
6	4.30E+07	1.20E+06	0.2	0.06	4.90E+06	1.00E+04	0.06	0.02
12	3.30E+08	9.30E+06	0.65	0.2	9.60E+06	8.00E+05	0.15	0.05
18	1.00E+09	5.20E+07	1.5	0.54	6.70E+07	4.00E+06	0.4	0.15
24	1.90E+09	9.40E+07	2.1	0.72	9.50E+07	1.00E+07	0.7	0.3
30	2.60E+09	1.80E+08	2.5	0.83	2.10E+08	3.00E+07	1.3	0.5
36	3.50E+09	2.20E+08	2.8	1.1	4.30E+08	3.40E+07	1.6	0.6
42	4.60E+09	2.50E+08	3.5	1.5	6.70E+08	4.00E+07	2	0.8
48	4.40E+09	2.30E+08	3.2	1.4	6.60E+08	3.80E+07	1.4	0.5
54	4.30E+09	2.20E+08	2.6	1.18	6.40E+08	3.60E+07	1	0.4
60	4.10E+09	2.10E+08	2.1	1	6.30E+08	3.50E+07	0.6	0.2

Raw data of Figure 4. Effect of different concentrations of soybean meal on protease production
(TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)

Time (h)	0.5%				1%			
	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	6.60E+06	2.00E+04	0.2	0.06	6.60E+06	2.00E+04	0.25	0.07
6	6.50E+07	3.90E+05	0.8	0.3	6.20E+07	3.50E+05	0.8	0.2
12	6.50E+08	1.40E+07	1.3	0.5	6.70E+08	1.50E+07	1.5	0.5
18	2.00E+09	8.50E+07	1.9	0.7	3.30E+09	8.60E+07	2	0.7
24	6.50E+09	2.00E+08	2.7	0.93	5.50E+09	2.20E+08	2.8	1
30	8.50E+09	7.70E+08	3.4	1.2	8.80E+09	7.90E+08	3.5	1.2
36	1.20E+10	1.00E+09	3.5	1.35	1.30E+10	1.20E+09	3.9	1.44
42	1.80E+10	1.50E+09	4.3	2	2.00E+10	1.90E+09	4.5	2
48	1.60E+10	1.40E+09	4	1.8	1.80E+10	1.70E+09	4	1.8
54	1.50E+10	1.20E+09	3.5	1.6	1.70E+10	1.60E+09	3.6	1.7
60	1.40E+10	1.10E+09	2.8	1.4	1.50E+10	1.50E+09	2.8	1.5
Time (h)	1.5%				2%			
	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	6.50E+06	2.50E+04	0.3	0.08	6.00E+06	1.50E+04	0.3	0.08
6	5.90E+07	3.20E+05	1.2	0.4	6.20E+07	3.00E+05	1	0.3
12	7.80E+08	1.90E+07	2.1	0.8	7.70E+08	1.70E+07	1.8	0.6
18	2.90E+09	9.60E+07	3	1.1	1.60E+09	8.90E+07	2.4	0.8
24	9.90E+09	2.50E+08	3.7	1.3	7.70E+09	2.50E+08	3	1
30	1.90E+10	9.90E+08	4.3	1.6	1.20E+10	8.30E+08	3.7	1.2
36	2.90E+10	1.80E+09	4.8	2	2.20E+10	1.50E+09	4.2	1.6
42	4.90E+10	3.20E+09	5.2	2.5	3.50E+10	2.50E+09	4.7	2
48	4.70E+10	2.80E+09	4.6	2.3	3.30E+10	2.30E+09	4.1	1.8
54	4.40E+10	2.60E+09	3.5	1.8	3.10E+10	2.10E+09	3.4	1.5
60	4.30E+10	2.50E+09	2.3	1.3	3.00E+10	2.00E+09	2.2	1.1

Time (h)	2.5%				3%			
	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	3.60E+06	8.80E+03	0.08	0.02	3.60E+06	8.80E+03	0	0
6	3.50E+07	8.90E+04	0.4	0.1	8.50E+06	4.90E+04	0.08	0.02
12	3.45E+08	6.40E+06	0.9	0.3	3.40E+07	6.40E+05	0.2	0.06
18	7.80E+08	1.00E+07	1.4	0.5	7.80E+07	1.00E+06	0.7	0.2
24	1.50E+09	9.70E+07	2	0.65	1.50E+08	9.70E+06	1.2	0.4
30	5.50E+09	2.00E+08	2.6	0.8	5.50E+08	2.00E+07	1.8	0.5
36	9.00E+09	7.50E+08	3	1.1	9.00E+08	7.50E+07	2.15	0.7
42	1.20E+10	1.10E+09	3.3	1.4	1.50E+09	1.30E+08	2.5	0.9
48	1.00E+10	1.00E+09	2.8	1.2	1.40E+09	1.10E+08	1.8	0.6
54	9.90E+09	9.80E+08	2	0.9	1.20E+09	1.00E+08	1.1	0.4
60	9.80E+09	9.70E+08	1.4	0.6	1.10E+09	9.80E+07	0.7	0.3

Raw data of Figure 5a. Validation of optimum carbon and nitrogen sources for alkaline protease production in the shake flask. (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)

Time (h)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	6.70E+06	2.70E+04	0.3	0.09
6	6.10E+07	3.40E+05	1.4	0.4
12	7.90E+08	2.10E+07	2.5	0.9
18	3.00E+09	9.80E+07	3.1	1.1
24	1.00E+10	2.70E+08	3.9	1.3
30	2.00E+10	1.01E+09	4.5	1.7
36	3.10E+10	2.00E+09	5	2.1
42	6.00E+10	3.70E+09	5.7	2.6
48	5.40E+10	3.20E+09	4.7	2.2
54	4.70E+10	2.80E+09	3.6	1.9
60	4.40E+10	2.60E+09	2.5	1.4

Raw data of Figure 5b. Validation of optimum carbon and nitrogen sources for alkaline protease production in the fermentor. (TC- total cell count, VS- viable spore, PA- protease activity and SA- specific activity)

Time (h)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (IU/mL)	SA (IU/mg)
0	2.20E+07	3.00E+05	0.4	0.11
3	8.50E+07	7.50E+05	0.8	0.3
6	6.10E+08	7.50E+06	1.5	0.5
9	1.30E+09	1.30E+08	2.8	1
12	4.90E+09	4.20E+08	4.7	1.6
15	7.20E+09	7.10E+08	6.2	2
18	9.80E+09	9.80E+08	8.3	3
21	3.20E+10	1.90E+09	9.8	3.8
24	6.20E+10	5.50E+09	11	4.6
30	8.50E+10	7.70E+09	12.1	5.8
36	1.00E+11	9.50E+09	13.2	7.3
42	1.5E+11	1.2E+10	15	8.8
48	1.2E+11	1E+10	12	8.5

ANNEX 4

Raw data

Recovery of *Bacillus licheniformis* alkaline protease from supernatant of fermented wastewater sludge using ultrafiltration and its characterization (chapter 4)

Raw data of Figure 1. Protease activity and protein concentration in the retentate at different transmembrane pressures

TMP	Protease activity (IU/ml)	Protein concentration (mg/ml)
70	51	5.78
80	61.5	6.9
90	69	7.8
100	60	6.8
110	47	5.3

Raw data of Figure 2. Total solids (TS) and suspended solids (SS) concentration in the retentate at different transmembrane pressures

TMP	TS (g/180 ml)	SS (g/180 ml)
70	7.38	0.37
80	8.86	0.44
90	9.9	0.48
100	8.3	0.42
110	6.84	0.34

Raw data of Figure 3. Protease activity and protein concentration in the retentate at different feed flux rates

Feed flux	Protease activity (IU/ml)	Protein concentration (mg/ml)
455	58.5	6.63
714	67.3	7.6
1250	53	6
1667	44.5	5
2500	39	4.4

Raw data of Figure 4. Total solids (TS) and suspended solids (SS) concentration in the retentate at different feed flux rates

Feed flux	TS (g/180 ml)	SS (g/180 ml)
455	8.4	0.42
714	9.72	0.45
1250	7.56	0.38
1667	6.48	0.32
2500	5.6	0.28

Raw data of Figure 5. Effect of pH on the activity and stability of alkaline protease in the absence and presence of 10mM CaCl₂

pH	Residual/Relative alkaline protease activity (%)		
	Optimum pH with 10mM CaCl ₂	Optimum pH without 10mM CaCl ₂	pH stability
5	30	39	35
6	51	60	52
7	69	78	67
8	75	85	83
9	80	90	88
10	92	100	100
11	80	85	65
12	58	68	55

Raw data of Figure 6. Effect of temperature profiles on activity of enzyme in the absence and presence of 10mM CaCl₂

Temperature (°C)	Relative alkaline protease activity (%)	
	Optimum temperature with 10mM CaCl ₂	Optimum temperature without 10mM CaCl ₂
30	45	35
40	67	57
50	82	75
60	110	90
70	80	65
80	50	30
90	25	20

Raw data of Figure 7. Effect of temperature on stability of alkaline protease enzyme (ultrafiltrated samples) in the presence of 10mM CaCl₂

Time (min)	Residual alkaline protease activity (%) (stability)			
	60°C	70°C	75 °C	80 °C
0	100	100	100	100
30	100	85	40	55
60	99	72	0	35
90	98	65	0	0
120	98	55	0	0
150	97	47	0	0
180	97	41	0	0

ANNEX 5

Raw data

**Alkaline protease production using cheese whey as raw material with *B. licheniformis*
(preliminary results)**

Table 1. Protease production using cheese whey as raw material in shake flask (TC- total cell count, VS- viable spore count, PA – Protease activity)

Time (h)	2%				
	TC (cfu/ml)	VS (cfu/ml)	Protein (mg/ml)	PA (IU/ml)	Lactose (g/L)
0	5.00E+03	3.00E+02	3.8	0	15
6	3.90E+04	4.00E+03	3.5	0	14
12	9.00E+04	9.50E+03	3.2	0.08	12
18	4.70E+05	2.00E+04	2.8	0.1	10
24	9.70E+05	5.60E+04	2.4	0.17	9
30	2.50E+06	1.50E+05	2.1	0.23	8.5
36	3.00E+06	4.80E+05	1.9	0.3	7.2
42	3.80E+06	5.90E+05	1.6	0.4	6.4
48	3.60E+06	5.70E+05	1.4	0.25	5.5
	3%				
0	8.00E+03	5.00E+02	5.5	0	21.5
6	7.90E+04	6.00E+03	5.2	0	21
12	8.00E+05	1.50E+04	4.7	0.1	18
18	1.50E+05	5.50E+04	4.4	0.2	16
24	4.70E+06	1.60E+05	4.2	0.34	14
30	7.00E+06	3.50E+05	3.7	0.55	11
36	9.30E+06	6.50E+05	3.3	0.68	10
42	1.20E+07	2.90E+06	3	0.8	9
48	1.00E+07	2.70E+06	2.6	0.6	7
	4%				
0	1.00E+04	2.00E+03	8.5	0	37
6	5.90E+04	7.00E+03	7.5	0.07	35
12	7.00E+05	5.50E+04	6.5	0.1	33
18	1.00E+06	1.00E+05	6	0.15	30
24	4.80E+06	4.60E+05	5.1	0.4	26
30	7.10E+06	7.50E+05	4.6	0.6	22
36	1.00E+07	9.80E+05	4.1	0.85	18
42	3.20E+07	2.10E+06	3.9	1	17
48	3.10E+07	2.00E+06	3.7	0.7	15

Time (h)	5%				
	TC (cfu/ml)	VS (cfu/ml)	Protein (mg/ml)	PA (IU/ml)	Lactose (g/L)
0	1.00E+04	3.00E+03	7.2	0	29
6	7.90E+04	8.00E+03	7	0.2	28
12	8.00E+05	6.50E+04	6.6	0.4	25
18	1.50E+06	2.00E+05	6.4	0.53	22
24	5.70E+06	5.60E+05	6	0.65	19
30	8.00E+06	8.50E+05	5.7	0.8	16
36	1.30E+07	1.80E+06	5.3	1.1	13
42	6.20E+07	3.50E+06	5	1.2	11
48	6.00E+07	3.40E+06	4.6	1	8.5
6%					
0	6.00E+03	4.00E+02	11	0	41
6	5.90E+04	5.00E+03	9	0	40
12	5.00E+05	1.00E+04	7.5	0.05	37
18	1.00E+06	9.00E+04	6.6	0.08	33
24	2.70E+06	1.60E+05	5.7	0.1	30
30	5.00E+06	3.50E+05	5	0.3	26
36	7.10E+06	6.80E+05	4.5	0.4	22
42	7.80E+06	7.90E+05	4.2	0.6	20
48	7.60E+06	7.70E+05	3.9	0.3	18

Table 2. Protease production using cheese whey as raw material in the fermentor (TC- total cell count, VS- viable spore count, PA – Protease activity)

Time (h)	TC (cfu/ml)	VS (cfu/ml)	PA (IU/ml)	Lactose (g/L)
0	1.10E+04	3.50E+03	0	30
3	5.60E+04	5.60E+03	0.3	28
6	9.80E+04	9.70E+03	0.6	25
9	2.30E+05	2.70E+04	1	22
12	9.50E+05	8.50E+04	1.3	19
15	4.00E+06	2.40E+05	1.6	16
18	1.50E+07	9.80E+05	1.9	13
21	6.50E+07	4.30E+06	2.3	11
24	8.70E+07	9.60E+06	2.7	8.5
30	1.00E+08	1.50E+07	3.3	7
36	3.30E+08	3.00E+07	4	6
42	5.20E+08	4.50E+07	4.5	4.9
48	5.00E+08	4.40E+07	3.6	3.5