

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Eau, Terre et Environnement

**ÉTUDE DE STRATÉGIES VISANT À STIMULER LA PRODUCTION DE
PROTÉASES ALCALINES PAR *BACILLUS LICHENIFORMIS* EN
UTILISANT DES BOUES D'ÉPURATION MUNICIPALES COMME
SUBSTRAT**

Par

Mathieu Drouin

Thèse présentée

pour l'obtention du grade *Philosophiae Doctor* (Ph.D) en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Examineurs externes :

Dr. YANN LEBIHAN (Centre de Recherche Industriel du Québec)

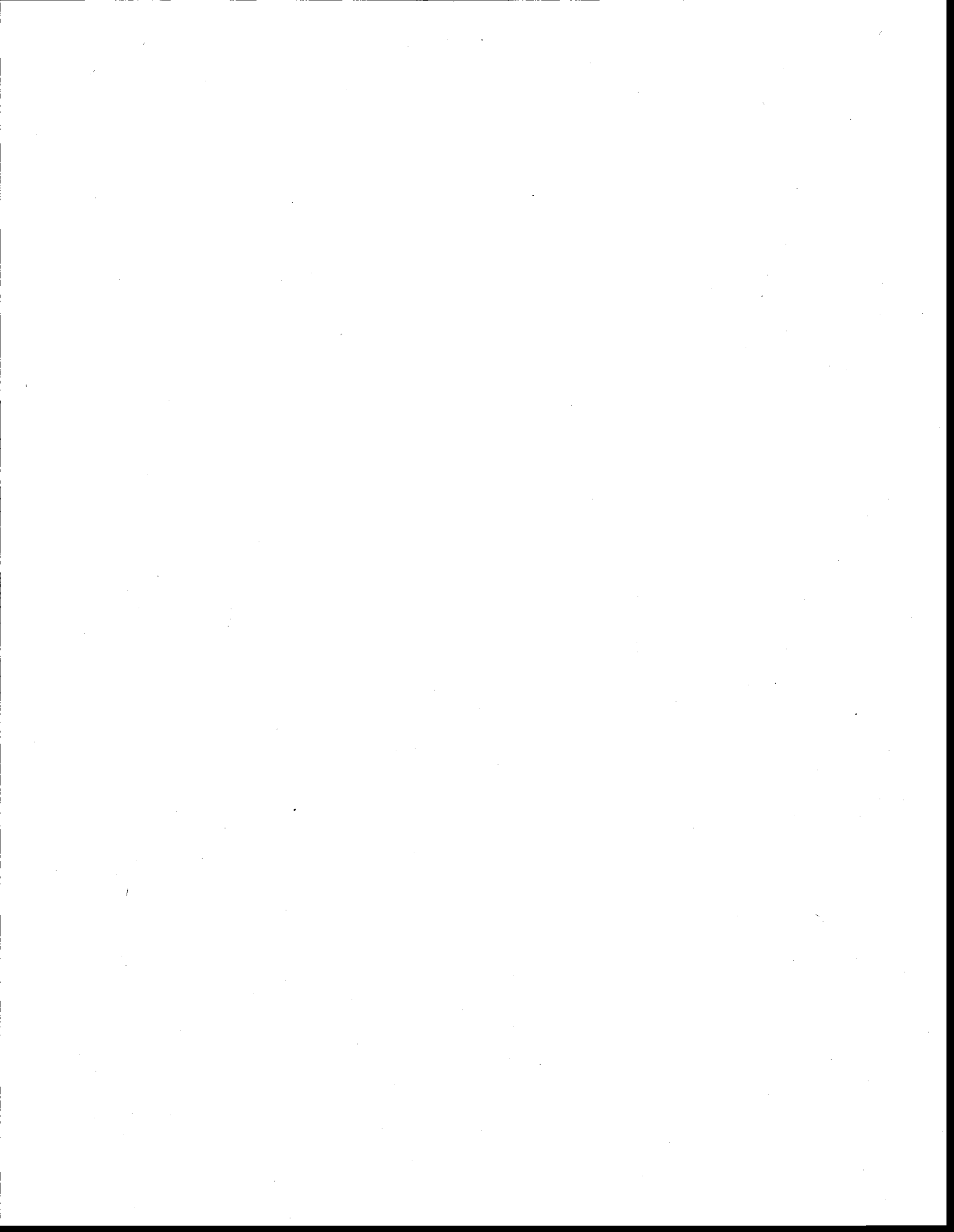
Dr. RICHARD TRUDEL (Société de Protection des Forêts contre les Insectes et les Maladies)

Examineur interne

Prof. JEAN-FRANÇOIS BLAIS (INRS-ETE)

Directeur de Recherche

Prof. RAJESHWAR D. TYAGI (INRS-ETE)



REMERCIEMENTS

La réalisation de ces travaux n'aurait pu être possible sans le support et la contribution de nombreuses personnes. Je tiens donc à leur exprimer toute ma gratitude.

En premier lieu, je désire témoigner ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le professeur **Rajeshwar D. Tyagi** pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer des études doctorales dans un domaine de recherche me passionnant. De plus, sans son expertise, son support, ses conseils, ses encouragements, sa disponibilité et sa patience, il m'aurait été impossible de mener à bien ces travaux.

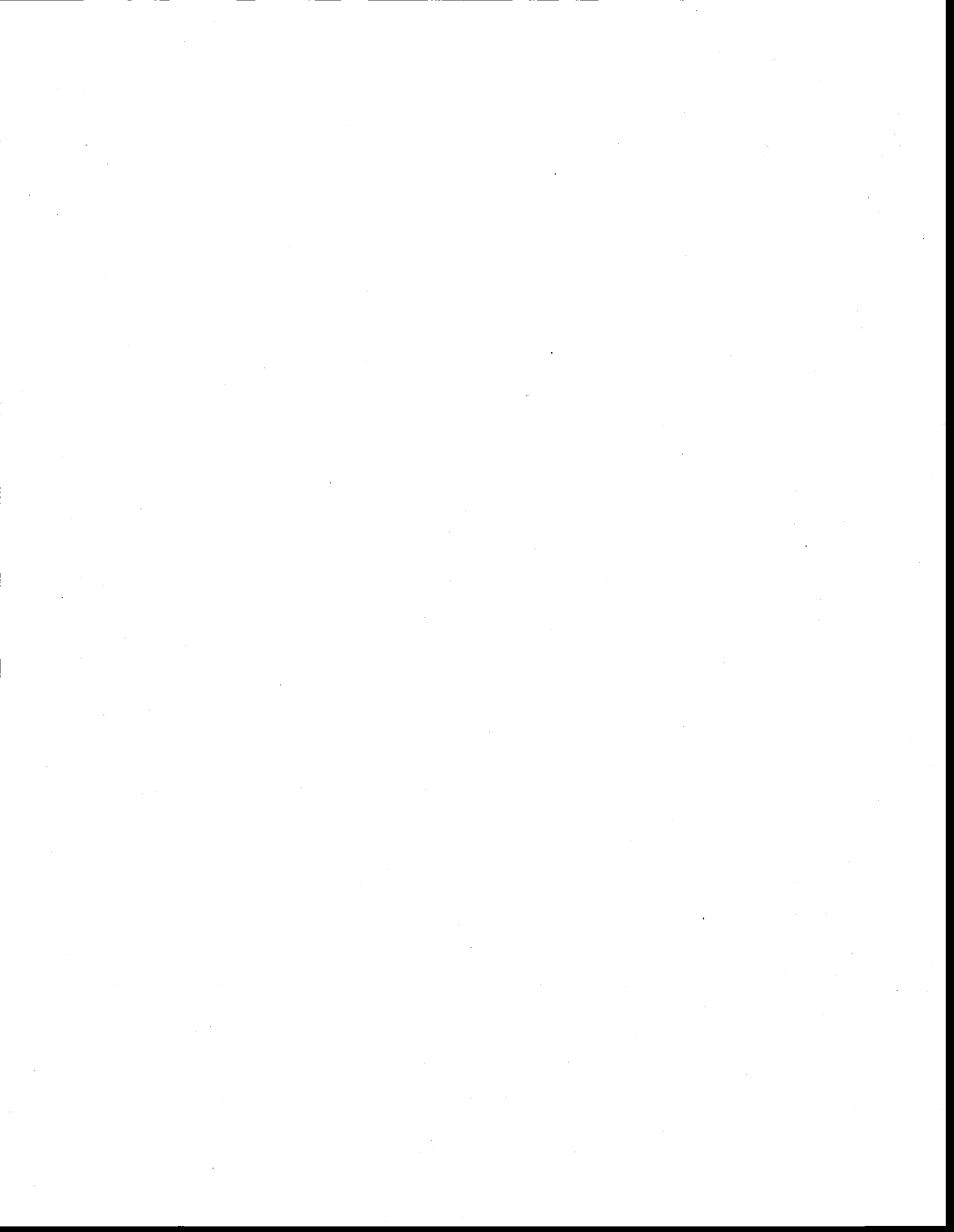
Aussi, un merci tout spécial au Dr. **Simon Barnabé** pour son aide précieuse lors de mon arrivée au laboratoire, ainsi que pour ces encouragements et conseils tout au long de mes travaux. Mes remerciements vont aussi au Dr. **Song Yan** pour son aide technique à la rédaction des articles, au professeur **Guy Mercier** pour la supervision de mon mini-projet, ainsi qu'au professeur **Claude Fortin** et aux Dr. **José R. Valéro** et **Keith C. Lai** pour leur aide et support. Je remercie particulièrement le professeur **Jean-François Blais**, ainsi que les Dr. **Yann LeBihan** et **Richard Trudel** pour avoir accepté de prendre de leur temps pour évaluer ma thèse.

Ma reconnaissance va aussi à tous mes collègues de laboratoire (**Kokou, Khanh, Bala, Jean-Philippe, Josée-Anne, Ha, Jean-Robert, Jyothi, François, Amine, Mausam, Tung**), que j'ai eu la chance de connaître et de côtoyer au fil des années et dont beaucoup sont devenus des amis chers. Un grand merci aussi aux membres du personnel administratif et technique de l'INRS, **Stéphane, Sey-Hana, Michelle, Pauline, René, Marc, Sébastien, Johanne, Dominique** et plus particulièrement **Suzanne, Gilles et André**, à qui je désire transmettre toute ma reconnaissance.

Pour terminer, je remercie **ma famille** pour leur amour, leur soutien et leurs encouragements sur lesquels j'ai pu compter en tout temps, ainsi que ma conjointe, **Caroline**, pour sa patience, sa compréhension et son affection à mon égard.

Je vous suis à tous très reconnaissant.

Mathieu DROUIN



PUBLICATIONS DANS CETTE THÈSE

DROUIN M., LAI C.K., TYAGI R.D. et 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 Science and Technology* 57 (3): 423-429.

DROUIN M., YAN S., LAI C.K., TYAGI R.D. et SURAMPALLI R.Y. Improvement of municipal wastewater sludge biodegradability to enhance the production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis*. Soumis à *Bioresource Technology*.

DROUIN M., YAN S., TYAGI R.D. et SURAMPALLI R.Y. Study on different pH-control strategies to stimulate the protease production by *Bacillus licheniformis* using municipal wastewater sludge as raw material. Soumis à *Bioprocess and Biosystems Engineering*.

DROUIN M., BEZAWADA J., TYAGI R.D. et SURAMPALLI R.Y. Impact of oxygen transfer conditions on protease production by *Bacillus licheniformis* in submerged fermentation process using municipal wastewater sludge as raw material. Soumis à *Process Biochemistry*.

DROUIN M., BEZAWADA J., TYAGI R.D. et SURAMPALLI R.Y. Evaluation of the potential of municipal wastewater sludge as a new, abundant and widely available raw material for alkaline protease production. En préparation

PUBLICATION HORS THÈSE

BORDELEAU G., DROUIN M. et MARTEL R. Biodegradation of nitroglycerin from double-base propellant residues at legacy antitank ranges. En préparation

RAPPORT CONFIDENTIEL

DROUIN M., 2009. Rapport d'étude de la traitabilité des eaux résiduelles du procédé BIOCMPACT pour la valorisation du lactosérum de la Fromagerie Perron, 46 pages. Rapport soumis à la compagnie Horizon Environnement Technologies (HET) et à l'INRS- ETE.

CONGRÈS ET CONFÉRENCES

DROUIN M., LAI C.K., TYAGI R.D., SURAMPALLI R.Y. *Bacillus licheniformis* proteases as high value added products from fermentation of wastewater sludge: pre-treatment of sludge to increase the performance of the process. *Moving forward wastewater biosolids sustainability. IWA international specialist conference. Moncton, le 27 juin 2007.*

ADJALLÉ K.D., DROUIN M., TYAGI R.D. Utilisation de rejets industriels, municipaux et agricoles comme matière première pour la fabrication de Bioproduits. *Journée Porte ouverte, Événement Imagine, Institut national de la recherche scientifique, centre Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE), le 30 octobre 2006.*

BEZAWADA J., DROUIN M., TYAGI R.D. Isolation of alkaline protease producing bacterial strains from lakes and rivers. *22^e congrès de l'est du Canada de l'association canadienne sur la qualité de l'eau. Université Concordia, le 3 novembre 2006.*

RÉSUMÉ

Les présents travaux s'inscrivent dans le cadre d'un projet de recherche visant à mettre au point un procédé de production de protéases alcalines performant et économique en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat de production. Les protéases alcalines produites par des microorganismes tels que *Bacillus licheniformis* comptent actuellement parmi les enzymes les plus utilisées au niveau industriel. Par contre, l'emploi des enzymes est souvent limité par leurs coûts de production élevés. Il est donc indispensable que l'industrie parvienne à produire des enzymes à moindres coûts. Comme une grande partie des coûts de production provient du milieu de culture utilisé, l'emploi de milieux de culture moins coûteux est une solution à privilégier. À ce propos, les boues d'épuration municipales, dont la disposition représente un défi sans cesse grandissant auquel doivent faire face les sociétés, constituent un substrat prometteur. En effet, des travaux antérieurs ont démontré que les boues d'épuration présentent un potentiel intéressant pour la production de protéases. Néanmoins, de nombreux éléments devaient encore être étudiés et optimisés.

D'une part, la composition du milieu de fermentation a une grande influence sur la production de protéases. La composition des boues dépend de la composition des eaux usées et du type de traitement des eaux appliqué. De plus, différents composés (ex: flocculants, coagulants) sont fréquemment ajoutés dans les eaux usées ou les boues afin d'améliorer les rendements épuratoires des procédés de traitement des eaux, ce qui modifie la composition et les caractéristiques des boues. Une partie de ce travail consistait donc à évaluer l'effet de ces paramètres sur la production de protéases. Également, une proportion importante des nutriments potentiels des boues est sous forme difficilement biodégradable et certaines caractéristiques physiques des boues (présence de floccs, viscosité élevée) sont contraignantes pour la fermentation. Ainsi, ce travail consistait aussi à évaluer le potentiel d'un pré-traitement (hydrolyse thermo-alcaline) des boues visant à en améliorer les caractéristiques physiques et nutritionnelles pour la production de protéases.

Les paramètres opérationnels (pH, aération, agitation) qui interviennent dans le procédé de fermentation ont aussi un effet considérable sur la production de protéases. Une partie de ce travail a donc consisté à en étudier leur impact afin de développer des stratégies de gestion adaptées de ces paramètres visant à augmenter les rendements du procédé.

Afin de réaliser les objectifs fixés, de nombreux essais de fermentation ont été réalisés en bioréacteurs de 7,5 et 15L, en utilisant comme substrat de fermentation des boues provenant des stations d'épuration des villes de Québec et de Victoriaville.

Les résultats ont démontré que la présence de chlorure ferrique dans les boues de la ville de Victoriaville, ajouté durant le procédé de traitement afin de favoriser l'enlèvement du phosphore, ne semble pas avoir d'effet marqué sur la production de protéases. Par contre, l'ajout d'alun et de polymères dans les eaux usées de la ville de Québec, afin de favoriser la floculation et la décantation des particules, a eu un effet bénéfique (+16%) sur la production de protéases. Les activités protéolytiques obtenues dans les boues de la ville de Québec ont été assez constantes (-6% à +9%) d'un échantillon de boue à l'autre, alors que les activités protéolytiques obtenues dans les différents échantillons de boues de la ville de Victoriaville ont présenté de plus importantes variations (-22% à +32%).

Les travaux effectués dans les boues de la ville de Québec ont démontré qu'un milieu de culture composé uniquement de boues ayant subi une hydrolyse thermo-alkaline (boues hydrolysées) n'est pas souhaitable pour la production de protéases. En revanche, l'emploi d'un mélange (boues *MIX*) de boues hydrolysées (25%) et non-hydrolysées (75%) a permis une augmentation considérable de l'activité protéolytique, de l'ordre de 78%, en comparaison avec les boues n'ayant pas subi de pré-traitement (boues *RAW*). Les protéases produites dans les boues *RAW* et *MIX* sont actives sous une vaste gamme de pH et de température et ont généré un maximum d'activité protéolytique à pH 10 et à T 55°C.

De faibles concentrations en cellules et production de protéases ont été obtenues en conditions de pH non-contrôlé. En comparaison, les activités protéolytiques obtenues en conditions de pH contrôlé ont été considérablement plus élevées. Dans les boues *RAW*, les activités protéolytiques ont été 65% plus élevées lors de l'emploi de NH_4OH en remplacement de NaOH pour le contrôle du pH. À l'opposé l'emploi de CH_3COOH en remplacement de H_2SO_4 a fortement inhibé la production de protéases et donc la combinaison $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ a été trouvée la plus souhaitable. Dans les boues *MIX*, l'emploi de NH_4OH a eu un effet inhibiteur sur la croissance et la production de protéases, et donc la combinaison $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ est celle qui a permis d'obtenir les activités protéolytiques les plus élevées.

Des fermentations ont été menées en employant plusieurs combinaisons de taux d'aération et d'agitation, correspondant à des conditions de transfert d'oxygène faible, moyenne et élevée. Les résultats ont démontré que la production de protéases est grandement stimulée (activité protéolytique/cellule élevée) sous des conditions de transfert d'oxygène élevées (taux agitation et d'aération élevés). Cependant, lorsque de telles conditions ont été maintenues tout au long de la fermentation, de faibles concentrations en cellules ont été obtenues, affectant négativement les activités protéolytiques. De plus, la formation abondante de mousse associée à des taux d'agitation et d'aération élevés s'est avérée très problématique, particulièrement pendant les premières heures de la fermentation. À l'opposé, la chute des concentrations en oxygène dissous sous la barre des 10% de saturation lors de l'emploi de plus faibles taux d'aération et d'agitation a fortement inhibé la production de protéases. L'emploi de conditions de transfert d'oxygène variables (taux d'agitation et d'aération variables) tenant compte des résultats précédemment cités à permis d'augmenter considérablement les activités protéolytiques tout en limitant la formation de mousse pendant la fermentation.

La centrifugation du bouillon de fermentation permet de récupérer les enzymes dans le surnageant des boues. Cependant, il a été démontré qu'une quantité appréciable de protéases demeure adsorbée sur les solides des boues et n'est donc pas récupérée lors de l'étape de la centrifugation. L'augmentation du pH du bouillon de fermentation de 7,5 à 10 avant la centrifugation a permis une désorption efficace des protéases, résultant en des augmentations d'activités protéolytiques de l'ordre de 11% et 12% dans les boues *RAW* et *MIX*, respectivement.

La combinaison de toutes les conditions (pH, agitation, aération, désorption) les plus favorables pour la production de protéases dans les boues a permis d'augmenter considérablement les activités protéolytiques obtenues : les protéases produites dans les boues *RAW* et *MIX* lors de cette dernière série de fermentations ont généré des activités maximales de 66.74 U.I./ml et 80.93 U.I./ml, respectivement, à pH 10 et à T 55°C. Il a aussi été démontré que l'emploi des boues pour la production de protéases permet une diminution importante du volume de boues résiduelles.



ABSTRACT

The present work is part of a research project which is aimed at developing an effective and economic protease production process using municipal wastewater sludge as raw material. Alkaline proteases produced by microorganism such as *Bacillus licheniformis* are among the most used industrial enzymes. However, the use of enzymes is often limited by their high production costs. Thus, it is indispensable for industry to find cheaper ways to produce enzymes. As a great part of production costs originate from the culture medium, the use of cheaper raw materials is an interesting avenue. In this vein, municipal wastewater sludge, whose disposal is an increasing challenge which many societies have to face, constitutes a promising raw material. Previous works have showed that wastewater sludge represents a great potential for protease production. Nevertheless, many elements still have to be studied and optimized.

First, the composition of the fermentation media is having a great influence on protease production. The wastewater sludge composition depends on wastewater composition and on the type of wastewater treatment applied. Also, various compounds (flocculants, coagulants) are often added into wastewaters or sludge in order to increase the purification yields of the treatment processes, which can modify composition and characteristics of sludge. So, a part of this work consisted in the evaluation of the effect of these parameters on protease production. Also, a significant portion of sludge potential nutrients is the parts of which are difficult to biodegrade, and some sludge inconvenient physical characteristics (presence of flocks, high viscosity) restrained the potential of sludge as a fermentation media. Thus, another part of this work was to evaluate the potential of a pre-treatment (thermal-alkaline hydrolysis) to improve the sludge physical and nutritional characteristics for protease production.

Moreover, the operational parameters (pH, aeration, agitation) in fermentation processes also have a considerable effect on protease production. The impact of these parameters was also studied in order to increase protease production yields using activated sludge.

In order to attain the different fixed objectives, many fermentation essays were realized in 7.5 and 15 L bioreactors, using sludge from Québec and Victoriaville municipal wastewater treatment plants.

With the Sludge from Victoriaville, the results demonstrated that the presence of ferric chloride, added during the treatment process in order to favor phosphorus removal, did not affect protease production. On the other hand, the addition of alum and polymers in Québec wastewaters in order to favor the particles flocculation and sedimentation had a beneficial effect (+16%) on protease production. The protease activities obtained in Québec sludge were fairly constant (-6% to +9%) from one batch to another, whereas the protease activities obtained in the different sludge batches from Victoriaville presented more considerable variations (-22% to +32%).

The results obtained in Québec sludge demonstrated that a fermentation medium consisting of thermal-alkaline (hydrolyzed) pre-treated sludge only is not suitable for protease production. On the other hand, the use of a mixture (*MIX* sludge) of hydrolyzed sludge (25%) and non-hydrolyzed sludge (75%) permitted a significant increase (78%) in protease activities, in comparison with non-pretreated sludge (*RAW* sludge) only. The proteases produced in *RAW* and *MIX* sludge are active under wide pH and temperature ranges and generated maximum protease activity at pH 10 and T 55°C.

Low cell concentration and protease activities were obtained under uncontrolled pH conditions. In comparison, the protease activities obtained under controlled pH conditions were considerably higher. In *RAW* sludge, the proteases activities were 65% higher when NH_4OH was employed in replacement of NaOH as pH-control agent. On the other hand, the use of CH_3COOH in replacement of H_2SO_4 significantly inhibited protease production. Therefore, $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ was found the most suitable combination of pH-control agents. In *MIX* sludge, the use of NH_4OH had an inhibition effect on cell growth and protease production and the $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ combination permitted to obtain the highest protease activities.

Fermentations were carried under different combinations of aeration and agitation rates, classified as low, medium and high oxygen transfer conditions. The results demonstrated that protease production was highly stimulated (high protease activity/cells) under high oxygen transfer conditions (high aeration and agitation rates). However, when such conditions were maintained throughout the whole fermentation, low cell concentrations and low protease activities were obtained. Also, the abundant foam formation associated with high aeration and agitation rates was a major concern, more particularly during the first hours of the fermentation. On the other hand, the drop of dissolved oxygen concentrations below 10% when lower agitation and aeration rates were employed strongly inhibited protease production. Thus, the use of variable oxygen transfer

conditions (variable agitation and aeration rates) taking into account the aforementioned results permitted a significant increase in protease activities, as well as a better foam control during fermentation.

At the end of the fermentation, the centrifugation of the fermentation broth allows the recovery of the protease in the supernatant, but the present work demonstrated that an appreciable amount of protease stay adsorbed on the solid fraction and is not recovered by the centrifugation step. However, the increase of the fermentation broth pH from 7.5 to 10 before the centrifugation step permitted a more efficient recovery of protease, resulting in increases of 11% and 12% of protease activity in *RAW* and *MIX* sludge, respectively.

The combination of all the aforementioned most suitable conditions for protease production in sludge resulted in an important increase in protease activities: maximum protease activities produced in *RAW* and *MIX* sludge under all the combined optimal conditions were 66.74 I.U./ml and 80.93 I.U./ml, respectively, at pH 10 and T 55°C. It also have been demonstrated that the protease production process from sludge allowed a considerable residual sludge volume reduction.



TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
PUBLICATIONS DANS CETTE THÈSE.....	V
PUBLICATION HORS THÈSE.....	V
RAPPORT CONFIDENTIEL.....	V
CONGRÈS ET CONFÉRENCES.....	VI
RÉSUMÉ.....	VII
ABSTRACT.....	XI
TABLE DES MATIÈRES.....	XV
LISTE DES TABLEAUX.....	XXI
LISTE DES FIGURES.....	XXIII

CHAPITRE 1: SYNTHÈSE.....	1
1.1 INTRODUCTION.....	3
1.2 PROBLÉMATIQUES GÉNÉRALES.....	5
1.2.1 <i>Problématique des coûts de production des protéases</i>	5
1.2.1.1 Substrats alternatifs pour la production de protéases à moindres coûts.....	6
1.2.2 <i>Problématique de la gestion des boues d'épuration</i>	7
1.2.2.1 La production de protéases à partir des boues d'épuration.....	8
1.3 PROBLÉMATIQUES SPÉCIFIQUES.....	9
1.4 REVUE DE LITTÉRATURE.....	11
1.4.1 <i>Rôle et actions des enzymes</i>	11
1.4.2 <i>Origine des enzymes industrielles</i>	12
1.4.3 <i>Enzymes protéolytiques</i>	13
1.4.3.1 Protéases sérines.....	14
1.4.4 <i>Applications industrielles des protéases</i>	15
1.4.4.1 Emploi des protéases dans les détergents.....	16
1.4.5 <i>Bacillus licheniformis</i>	18
1.4.5.1 Caractéristiques générales.....	18
1.4.5.2 Croissance et métabolisme.....	18
1.4.5.3 La production de protéases chez <i>Bacillus licheniformis</i>	19
1.4.5.4 Mécanismes régulateurs de la synthèse des protéases.....	22
1.4.6 <i>Milieux de culture pour la production de protéases</i>	22
1.4.6.1 Milieux conventionnel pour la production de protéases.....	22
1.4.6.1.1 Source de carbone.....	22
1.4.6.1.2 Source d'azote.....	23
1.4.6.1.3 Autres éléments.....	24
1.4.6.2 Les boues d'épuration comme milieu de culture pour la production de protéases.....	25
1.4.6.2.1 Composition des boues.....	25
1.4.6.2.2 Pré-traitement des boues.....	26
1.4.7 <i>Influence des paramètres opérationnels</i>	28
1.4.7.1 pH.....	28
1.4.7.2 Aération et agitation.....	28
1.4.7.2.1 Agitation.....	28

1.4.7.2.2 Transfert d'oxygène.....	29
1.4.7.2.3 Formation de mousse.....	29
1.5 HYPOTHÈSES, OBJECTIFS ET ORIGINALITÉ	31
1.5.1 Hypothèses de recherche.....	31
1.5.1.1 Hypothèse 1.....	31
1.5.1.2 Hypothèse 2.....	32
1.5.1.3 Hypothèse 3.....	32
1.5.2 Objectifs de recherche.....	33
1.5.3 Originalité de la recherche	34
1.6 DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE	35
1.6.1 Provenance et échantillonnage des boues.....	35
1.6.2 Souche microbienne employée	35
1.6.3 Étude d'un pré-traitement d'hydrolyse thermo-alkaline des boues visant à améliorer les caractéristiques des boues pour la production de protéases.....	36
1.6.4 Comparaison de boues d'épuration issues de différents procédés de traitement des eaux pour la production de protéases.....	37
1.6.5 Fortification en nutriments des boues d'épuration par l'emploi de différents agents de contrôle de pH afin de stimuler la production de protéases.....	38
1.6.6 Évaluation de l'effet des conditions de transfert d'oxygène sur la production de protéases	38
1.7 RÉSULTATS.....	41
1.7.1 Étude d'un pré-traitement d'hydrolyse thermo-alkaline des boues visant à améliorer les caractéristiques des boues pour la production de protéases.....	41
1.7.1.1 Effet du pré-traitement d'hydrolyse thermo-alkaline sur la production de protéases	41
1.7.1.2 Emploi de différents mélanges de boues hydrolysées et non-hydrolysées sur la production de protéases	42
1.7.1.3 Désorption des protéases de la fraction solide des boues	43
1.7.1.4 Caractéristiques des protéases produites dans les boues hydrolysées et non-hydrolysées ..	43
1.7.1.5 Diminution du volume de boues résiduelles.....	43
1.7.2 Comparaison de boues d'épuration issues de deux procédés de traitement des eaux pour la production de protéases.....	43
1.7.3 Effet des paramètres opérationnels.....	44
1.7.3.1 Effet de différentes stratégies de contrôle du pH sur la production de protéases	44
1.7.3.1.1 Conditions de pH non-contrôlé.....	44
1.7.3.1.2 Évaluation de l'effet de différents agents pour le contrôle du pH	45
1.7.3.2 Effet des conditions de transfert d'oxygène sur la production de protéases.....	46
1.7.4 Combinaison des meilleures stratégies	47
RÉFÉRENCES	49
CHAPITRE 2: PRÉ-TRAITEMENT DES BOUES.....	61
(RÉSULTATS DES OBJECTIFS 1 ET 2).....	61
PARTIE 1	63
<i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i> PROTEASES AS HIGH VALUE ADDED PRODUCTS FROM FERMENTATION OF WASTEWATER SLUDGE: PRE-TREATMENT OF SLUDGE TO INCREASE THE PERFORMANCE OF THE PROCESS.....	63
RÉSUMÉ	65
ABSTRACT	67
2.1 INTRODUCTION	69
2.2 MATERIAL AND METHODS.....	71

2.2.1 <i>Bacillus licheniformis</i> strain	71
2.2.2 Sludge samples and medium composition	71
2.2.3 Sludge pre-treatment	71
2.2.4 Inoculum preparation	72
2.2.5 Fermentation procedure	72
2.2.6 Analytical	73
2.2.6.1 Cell and spore counts	73
2.2.6.2 Protease activity assay	73
2.3 RESULTS AND DISCUSSION	75
2.4 CONCLUSIONS	79
ACKNOWLEDGEMENTS	81
REFERENCES	83
PARTIE 2	87
IMPROVEMENT OF MUNICIPAL WASTEWATER SLUDGE BIODEGRADABILITY TO ENHANCE THE PRODUCTION OF ALKALINE PROTEASE BY <i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i>	87
RÉSUMÉ	89
ABSTRACT	91
2.5 INTRODUCTION	93
2.6 MATERIALS AND METHODS	95
2.6.1 <i>Bacillus licheniformis</i> strain	95
2.6.2 Sludge sampling	95
2.6.3 Sludge pre-treatment	95
2.6.4 Inoculum preparation	96
2.6.5 Fermentation procedure	96
2.6.6 Analytical	97
2.6.6.1 Soluble chemical oxygen demand (SCOD)	97
2.6.6.2 Viscosity measurements	97
2.6.6.3 Measurement of volumetric oxygen transfer coefficient ($K_L a$), OTR and OUR	97
2.6.6.4 Cell and spore counts	97
2.6.6.5 Protease activity assay	98
2.6.6.6 Desorption of enzyme from solid phase	98
2.7 RESULTS	101
2.8 DISCUSSION	103
2.8.1 Relation between cell, spore count and protease activity	103
2.8.2 Effect of sludge pre-treatment on growth and protease activity	103
2.8.2.1 Effect on growth	103
2.8.2.2 Effect on protease activity	105
2.8.2.3 Mixture of raw and hydrolyzed sludge to improve the protease activity	106
2.8.3 Desorption of protease from sludge solids	106
2.8.4 Influence of sludge composition on protease characteristics	107
2.8.5 Residual sludge from the process	107
2.9 CONCLUSIONS	109
ACKNOWLEDGEMENTS	111
REFERENCES	113

CHAPITRE 3: ÉTUDE DES PARAMÈTRES OPÉRATIONNELS	127
PARTIE 1	129
(RÉSULTATS DES OBJECTIFS 4 ET 5).....	129
STUDY ON DIFFERENT PH-CONTROL STRATEGIES TO STIMULATE THE PROTEASE PRODUCTION BY <i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i> USING MUNICIPAL WASTEWATER SLUDGE AS RAW MATERIAL	129
RÉSUMÉ.....	131
ABSTRACT	133
3.1 INTRODUCTION.....	135
3.2 MATERIALS AND METHODS.....	137
3.2.1 <i>Bacillus licheniformis</i> strain	137
3.2.2 Sludge sampling.....	137
3.2.3 Sludge pre-treatment.....	137
3.2.4 Inoculum preparation.....	137
3.2.5 Fermentation procedure.....	138
3.2.5.1 Uncontrolled pH conditions	138
3.2.5.2 Controlled pH conditions	138
3.2.6 Analytical	139
3.2.6.1 Cell and spore counts	139
3.2.6.2 Protease activity assay.....	139
3.3 RESULTS.....	141
3.4 DISCUSSION.....	143
3.4.1 Uncontrolled vs. controlled pH conditions	143
3.4.2 Influence of pH control agents during fermentation in RAW sludge.....	144
3.4.2.1 NaOH vs. NH ₄ OH	145
3.4.2.2 H ₂ SO ₄ vs. CH ₃ COOH.....	146
3.4.3 Influence of pH control agents during fermentation in MIX sludge.....	147
3.5 CONCLUSIONS	149
ACKNOWLEDGEMENT	151
REFERENCES	153
PARTIE 2	161
(RÉSULTATS DE L'OBJECTIF 6).....	161
IMPACT OF OXYGEN TRANSFER CONDITIONS ON PROTEASE PRODUCTION BY <i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i> IN A SUBMERGED FERMENTATION PROCESS USING MUNICIPAL WASTEWATER SLUDGE AS RAW MATERIAL.	161
RÉSUMÉ.....	163
ABSTRACT	165
3.6 INTRODUCTION.....	167
3.7 MATERIALS AND METHODS.....	169
3.7.1 <i>Bacillus licheniformis</i> strain	169
3.7.2 Sludge sampling.....	169
3.7.3 Inoculum preparation.....	169
3.7.4 Fermentation procedure.....	170
3.7.4.1 Constant oxygen transfer conditions	170
3.7.4.2 Variable oxygen transfer conditions.....	170

3.7.5 Analytical	171
3.7.5.1 Measurement of volumetric oxygen transfer coefficient (K_La), OTR and OUR	171
3.7.5.2 Cell and spore counts	171
3.7.5.3 Protease activity assay	172
3.8 RESULTS AND DISCUSSION	173
3.8.1 <i>Effect of constant agitation and aeration rates</i>	173
3.8.1.1 Sludge limitations for oxygen transfer	173
3.8.1.2 Evolution of DO, K_La , OTR and OUR profiles	175
3.8.1.3 Impact on cell growth and protease production	177
3.8.1.4 Combination of oxygen transfer conditions	179
3.8.2 <i>Effect of variable agitation and aeration rates</i>	180
3.9 CONCLUSIONS	183
ACKNOWLEDGEMENT	185
REFERENCES	187
CHAPITRE 4: INFLUENCE DU PROCÉDÉ DE TRAITEMENT DES EAUX SUR LA PRODUCTION DE	
 PROTÉASES	199
(RÉSULTATS DE L'OBJECTIF 3)	199
EVALUATION OF THE POTENTIAL OF MUNICIPAL WASTEWATER SLUDGE AS A NEW, ABUNDANT AND	
WIDELY AVAILABLE RAW MATERIAL FOR ALKALINE PROTEASE PRODUCTION	201
RÉSUMÉ	203
ABSTRACT	205
4.1 INTRODUCTION	207
4.2 MATERIAL AND METHODS	209
4.2.1 <i>Bacillus licheniformis</i> strain	209
4.2.2 <i>Sludge sampling</i>	209
4.2.2.1 Samples from Québec (Québec, Canada) wastewater treatment plant	209
4.2.2.2 Samples from Victoriaville (Québec, Canada) wastewater treatment plant	209
4.2.3 <i>Sludge pre-treatment</i>	210
4.2.4 <i>Inoculum preparation</i>	210
4.2.5 <i>Fermentation procedure</i>	211
4.2.5.1 7.5 L bioreactor	211
4.2.5.2 15 L bioreactor	211
4.2.6 <i>Analytical</i>	212
4.2.6.1 Viscosity measurements	212
4.2.6.2 Cell and spore counts	212
4.2.6.3 Protease activity assay	212
4.2.6.4 Desorption of enzyme from solid phase	213
4.3 RESULTS AND DISCUSSION	215
4.3.1 <i>Effect of the addition of alum and polymer to sludge on protease production</i>	215
4.3.2 <i>Effect of the addition of ferric chloride to sludge on protease production</i>	216
4.3.3 <i>Reproducibility of the results</i>	217
4.3.4 <i>Combination of the most suitable conditions for protease production</i>	218
4.4 CONCLUSIONS	221
ACKNOWLEDGEMENT	223
REFERENCES	225

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	233
CONCLUSIONS	235
RECOMMANDATIONS	239
ANNEXES	241
ANNEXE 1	243
EFFECT OF SLUDGE PRETREATMENTS ON PROTEASE PRODUCTION (CHAPITRE 2, PARTIE 1)	243
ANNEXE 2	247
EFFECT OF SLUDGE PRETREATMENTS ON PROTEASE PRODUCTION (CHAPITRE 2, PARTIE 2)	247
ANNEXE 3	253
EFFECT OF DIFFERENT PH CONTROL STRATEGIES ON PROTEASE PRODUCTION (CHAPITRE 3, PARTIE 1) ...	253
ANNEXE 4	259
EFFECT OF OXYGEN TRANSFER CONDITIONS ON PROTEASE PRODUCTION (CHAPITRE 3, PARTIE 2)	259
ANNEXE 5	265
INFLUENCE OF THE WASTEWATER TREATMENT PROCESS ON PROTEASE PRODUCTION (CHAPITRE 4).....	265

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1	Exemple de substrats alternatifs pour la production de protéases faisant l'objet de travaux de recherche.....	6
Tableau 2	Principales classes d'enzymes selon Meunier (1999).....	13
Tableau 3	Emploi des protéases dans différents domaines industriels	15
Tableau 4	Taux d'aération et d'agitation employés lors des fermentations visant à évaluer l'effet des conditions de transfert d'oxygène sur la production de protéases.	39

CHAPITRE 2, PARTIE 1

Table 1.	<i>Bacillus licheniformis</i> process performance in pre-treated and raw sludge.....	85
----------	--	----

CHAPITRE 2, PARTIE 2

Table 1.	Characteristics of secondary sludge obtained from CUQ.....	117
Table 2.	Process Performance of <i>Bacillus licheniformis</i> in different sludge tested	118
Table 3.	Residual protease activity (I.U./g SS) of enzymes desorbed from solids with different pH buffers in RAW and MIX 1 sludge	119

CHAPITRE 3, PARTIE 1

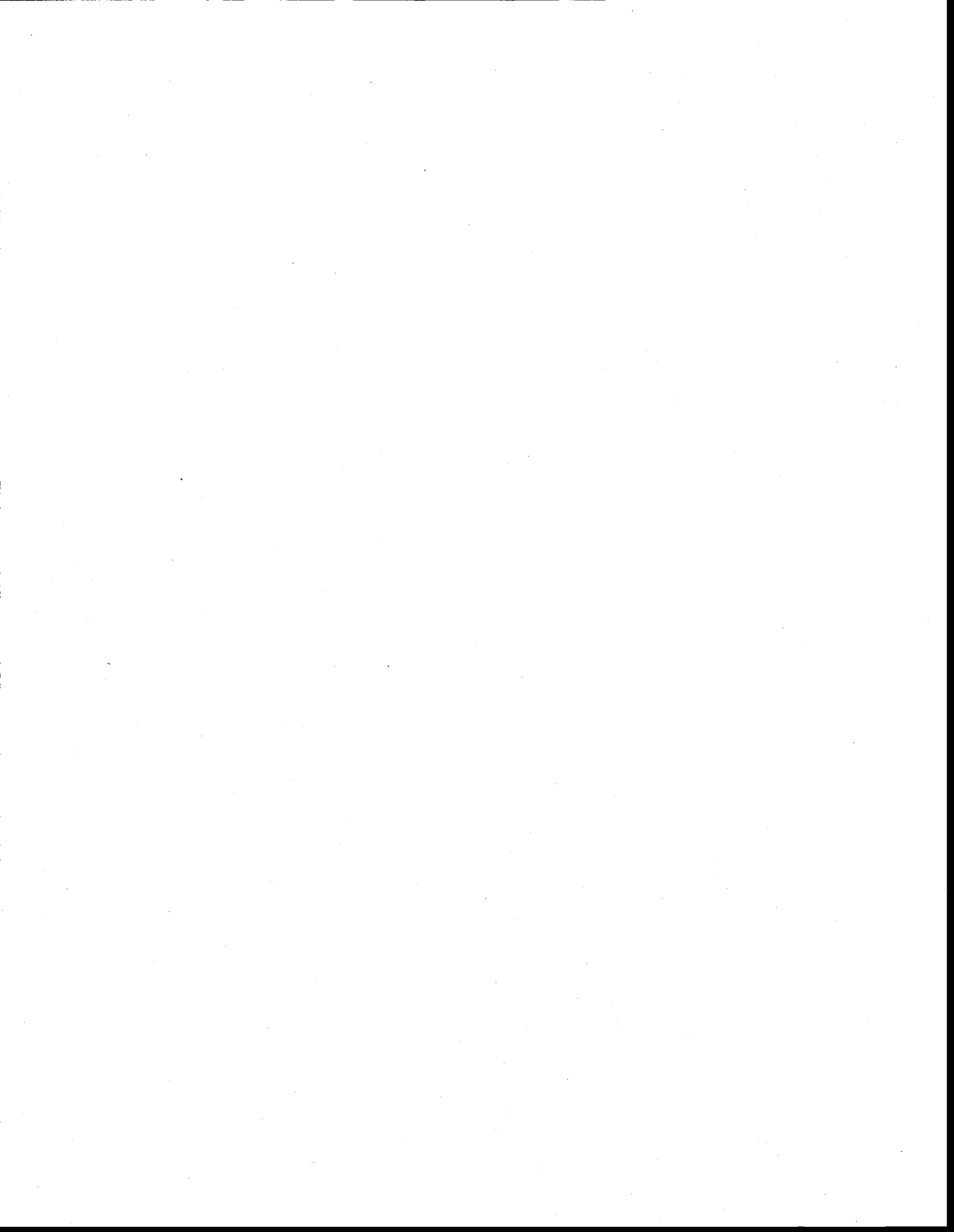
Table 1	Process Performance of <i>Bacillus licheniformis</i> with different pH control strategies tested.	157
---------	--	-----

CHAPITRE 3, PARTIE 2

Table 1.	Description of oxygen transfer conditions employed.	191
Table 2.	Process Performance of <i>B. licheniformis</i> under different oxygen transfer conditions.....	192

CHAPITRE 4

Table 1.	Previous studies on the influence of different parameters on protease production by <i>Bacillus licheniformis</i> in Quebec (Quebec, Canada) municipal wastewater sludge.....	227
Table 2.	Process Performance of <i>Bacillus licheniformis</i> in different sludge tested.....	228
Table 3.	Protease activities obtained during fermentation of different sludge batches from Quebec and Victoriaville under the same operational conditions.....	229
Table 4.	Process Performance of <i>Bacillus licheniformis</i> in sludge from Quebec with the combination of conditions found the most suitable for protease production in previous work.....	230



LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1 Courbe de croissance microbienne en mode discontinu. 20

CHAPITRE 2, PARTIE 1

Figure 1 Evolution of total count (TC), viable spores (VS) (a), protease activity (b) and viscosity (c) during *Bacillus licheniformis* growth in different pre-treated sludges..... 86

CHAPITRE 2, PARTIE 2

Figure 1: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), K_{La} , OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates during *Bacillus licheniformis* growth in RAW sludge..... 120

Figure 2: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa , OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates during *Bacillus licheniformis* growth in TAH sludge..... 121

Figure 3: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa , OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates during *Bacillus licheniformis* growth in MIX 1 sludge. 122

Figure 4: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa , OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates during *Bacillus licheniformis* growth in MIX 2 sludge. 123

Figure 5: Evolution of the viscosity (a) and soluble COD (b) during *Bacillus licheniformis* growth in different sludges. 124

Figure 6: Effect of pH and temperature on the protease produced in RAW (a) and TAH (b) sludges..... 125

CHAPITRE 3, PARTIE 1

Figure 1: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), pH and protease activity (PA) during *Bacillus licheniformis* growth in RAW sludge in uncontrolled (a) and controlled (b) pH conditions..... 158

Figure 2: Evolution of total viable cell count (a), viable spore count (b) and protease activity (c) during *Bacillus licheniformis* growth in RAW sludge with different pH control agents tested..... 159

Figure 3: Evolution of total viable cell count (a), viable spore count (b) and protease activity (c) during *Bacillus licheniformis* growth in MIX sludge with different pH control agents tested..... 160

CHAPITRE 3, PARTIE 2

- Figure 1: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa, OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates (c) during *Bacillus licheniformis* growth in HOT experiment..... 193
- Figure 2: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa, OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates (c) during *Bacillus licheniformis* growth in MOT experiment..... 194
- Figure 3: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a) and profiles of DO, agitation and aeration rates (b) during *Bacillus licheniformis* growth in LOT experiment. 195
- Figure 4: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa, OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates (c) during *Bacillus licheniformis* growth in MOT/HOT experiment..... 196
- Figure 5: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa, OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates (c) during *Bacillus licheniformis* growth in VOT 1 experiment..... 197
- Figure 6: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa, OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates (c) during *Bacillus licheniformis* growth in VOT 2 experiment..... 198

CHAPITRE 4

- Figure 1: Evolution of total viable cell count (a), viable spore count (b) and protease activity (c) during *Bacillus licheniformis* growth in Quebec wastewater sludge with and without added alum and polymer..... 231
- Figure 2: Evolution of total viable cell count (a), viable spore count (b) and protease activity (c) during *Bacillus licheniformis* growth in Victoriaville wastewater sludge with and without added ferric chloride..... 232

CHAPITRE 1: SYNTHÈSE



1.1 INTRODUCTION

L'utilisation industrielle de divers produits chimiques est responsable d'une pollution environnementale qui fait l'objet d'une préoccupation grandissante. Les alternatives biologiques, compatibles avec l'environnement, sont de plus en plus privilégiées. Parmi ces alternatives, l'emploi d'enzymes industrielles est très profitable à la fois sur le plan énergétique et environnemental. En effet, dans plusieurs procédés, l'emploi de produits chimiques peu spécifiques occasionne des pertes de rendement importantes et génère des sous-produits souvent difficiles et coûteux à éliminer. Plus spécifiques dans leur activité, les enzymes sont de plus en plus favorisées car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés. Également, les enzymes présentent de nombreux autres avantages : biodégradabilité, faible toxicité et formation de sous-produits plus souvent compatibles avec l'environnement.

Actuellement, l'industrie des enzymes est en pleine progression et son chiffre d'affaire global croît à un rythme régulier. Une grande partie de ce marché est liée aux enzymes de type hydrolytique comme les protéases, les lipases et les cellulases. Cependant, les enzymes restent sous employées car la domination des produits chimiques moins dispendieux tend à demeurer. Afin de rendre les enzymes plus compétitives par rapport aux produits chimiques, il est essentiel d'en abaisser les coûts de production. Généralement, les protéases sont produites dans des milieux synthétiques complexes et coûteux. Donc, afin de réduire leurs coûts de production, des efforts de recherche sont orientés dans le but de trouver des substrats alternatifs moins coûteux et efficaces pour la production des enzymes.

En ce sens, les eaux usées industrielles et les boues d'épuration municipales, dont la gestion constitue une véritable problématique pour les pouvoirs publics et les milieux industriels, pourraient constituer un substrat prometteur pour la production de protéases. En effet, la quantité d'eaux usées et de boues d'épuration ne cesse d'augmenter et il est primordial de trouver de nouvelles façons de disposer ou de revaloriser ces rejets. Des travaux effectués par le *Groupe de recherche en assainissement et en technologies environnementales* de l'INRS-ETE ont jusqu'à maintenant démontré que les boues d'épuration ont le potentiel de devenir une matière première pour l'obtention de plusieurs produits microbiens. Suivant ces résultats, l'idée de mettre à profit le potentiel nutritif des boues d'épuration pour la production de protéases a été avancée. Le

présent projet, portant la production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* à partir des boues d'épuration, se donne comme défi de faire de la problématique de la gestion de cette matière résiduelle une solution à la problématique des coûts de production élevés des protéases.

La suite du présent chapitre comporte six parties: La première aborde de façon plus détaillée les problématiques générales que sont les coûts de production élevés des protéases et de la gestion des boues d'épuration. Dans la seconde y sont présentées les problématiques spécifiques ayant justifiées les présents travaux. La troisième présente une synthèse bibliographique afin de définir les objectifs spécifiques de cette étude. La quatrième partie décrit les hypothèses et objectifs de l'étude. Enfin, la démarche méthodologique ainsi qu'un survol des principaux résultats qui seront discutés en détail dans les chapitres suivants constituent les dernières parties.

1.2 PROBLÉMATIQUES GÉNÉRALES

1.2.1 Problématique des coûts de production des protéases

Grâce aux progrès importants des trente dernières années, l'industrie des enzymes est en pleine progression puisque son chiffre d'affaires global a connu une importante augmentation depuis le début des années 80. En effet, le marché mondial des enzymes industrielles était estimé à 400 millions US\$ en 1983, à 720 millions US\$ en 1990 alors qu'en 1995, le marché atteignait le cap du milliard US\$. En 2000, le marché était évalué à plus de 1,6 milliards US\$ et en 2005, le marché mondial des enzymes devait se situer entre 2 et 2,5 milliards US\$ (Barnabé *et al.*, 2003; Godfrey et West, 1996). Ces chiffres excluent le marché des enzymes thérapeutiques et médicales comme les enzymes pour les techniques moléculaires (exemple : la *taq* polymérase).

De toutes les enzymes industrielles, les protéases sont de loin le groupe le plus important. En effet, les protéases représentent à elles seules entre 40-60% du total des ventes d'enzymes et la dominance des protéases dans le marché des enzymes industrielles tend à s'accroître. Les protéases alcalines, issues principalement de microorganismes tels que *Bacillus licheniformis* sont très utilisées dans les détergents et occupent une grande part du marché. En effet, de toutes les protéases produites au cours des dernières années, 70 à 80 % étaient destinées au marché des détergents (Godfrey et West, 1996; Gupta *et al.*, 2002a; Kumar et Takagi, 1999; Rao *et al.*, 1998, Shrinivas *et al.*, 2012).

Bien que les marchés des enzymes soient en pleine croissance, ils sont toujours sous développés car l'offre est faible et la domination des produits chimiques moins dispendieux décourage les investissements pour leur commercialisation (Barnabé *et al.*, 2003). Afin d'assurer son expansion, il est indispensable que l'industrie parvienne à produire des enzymes à coûts moindres. Le milieu de culture employé pour la production des enzymes représente généralement entre 30% et 40% des coûts de production totaux (Kumar et Parrack, 2003; Joo *et al.*, 2002). *Il est donc impératif de mettre au point des milieux de culture moins coûteux et stimulant la production de protéases. Il s'agit de la première problématique générale justifiant ces travaux de recherche.*

1.2.1.1 Substrats alternatifs pour la production de protéases à moindres coûts

Des efforts de recherche sont actuellement orientés dans le but de trouver des substrats alternatifs moins coûteux et efficaces pour la production des enzymes. L'emploi de différentes sources de carbone et d'azote peu coûteuses pour la production de protéases a été abondamment rapporté dans la littérature. Le tableau suivant fait état de quelques unes de ces sources de carbone et d'azote.

Tableau 1 Exemples de substrats alternatifs pour la production de protéases faisant l'objet de travaux de recherche

Substrat	Microorganisme	Référence
Sardinella powder	<i>Bacillus cereus</i>	Sellami-Kamoun <i>et al.</i> (2011)
	<i>Bacillus mojavensis</i>	Haddar <i>et al.</i> (2010)
Alkali-extracted soybean	<i>Bacillus licheniformis</i>	Mabrouk <i>et al.</i> (1999)
Arrowroot starch	<i>Bacillus lentus</i>	Kumar et Parrack (2003)
Fish flour	<i>Bacillus subtilis</i>	Ellouz <i>et al.</i> (2001)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ellouz <i>et al.</i> (2003)
Cheese whey	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	De Souza <i>et al.</i> (2001)
Molasses	<i>Bacillus subtilis</i>	Calik <i>et al.</i> (2004a)
Pigeon pea waste	<i>Bacillus sp.</i>	Johnvesly <i>et al.</i> (2002)
Feather Meal, Corn Steep Liquor	<i>Streptomyces sp.</i>	De Azeredo <i>et al.</i> (2006)
Chicken Feather	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Gessesse <i>et al.</i> (2003)
	<i>Microbacterium sp.</i>	Thys <i>et al.</i> (2005)
Green Gram Husk	<i>Bacillus sp.</i>	Prakasham <i>et al.</i> (2006)
Shrimp wastes	<i>Bacillus licheniformis</i>	Haddar <i>et al.</i> (2011)

Dans plusieurs travaux, les sources de carbone et d'azote peu dispendieuses sont constituées de matières résiduelles issues de différents procédés de transformation. Ces matières résiduelles, disponibles à coûts moindres, représentent une solution pouvant amener des diminutions

importantes dans les coûts de production des protéases. Cependant, l'emploi de ces différentes sources de nutriments présente certaines limites. En premier lieu, ces résidus sont pour la plupart utilisés en remplacement des sources de carbone et d'azote conventionnelles utilisées dans les milieux de culture pour la production de protéases. Très peu de ces substrats ont été trouvés efficaces pour la production de protéases lorsque employés seuls, ce qui limite la capacité réelle de ces substrats de diminuer les coûts de production. En second lieu, certains de ces substrats ne sont pas disponibles directement. Leur obtention exige certaines étapes de traitement préalables parfois contraignantes (extraction, broyage), ce qui représente une limite à leur utilisation. Également, les coûts de ces pré-traitements doivent être pris en compte dans les coûts de production globaux du procédé, limitant ainsi la capacité de diminution des coûts.

1.2.2 Problématique de la gestion des boues d'épuration

Au Canada, selon des estimations faites en 1999, les effluents urbains représentaient à eux seuls 14,4 millions de mètres cubes d'eaux usées traitées par jour par 1 118 municipalités (Environnement Canada, 1999). Ces eaux usées sont traitées dans des stations d'épuration avant d'être rejetées dans l'environnement (rivières, cours d'eau, fleuves). Ces traitements qui sont de plus en plus sophistiqués génèrent d'importantes quantités de boues d'épuration. Actuellement, les boues d'épuration des eaux usées municipales sont majoritairement éliminées par incinération et enfouissement sanitaire. Au Québec, de 1981 à 2002, la production annuelle de boues municipales est passée de 82 000 à environ 200 000 tonnes de boues sèches (Dufresne, 2004). En 2002, sur les 218 000 tonnes de boues produites, 11% ont été valorisées en agriculture, 40% ont été enfouies et 45% ont été incinérées (Recyc-Québec, 2003). D'après le MDDEP (2003), les quantités de boues générées par les stations d'épuration n'ont cessé d'augmenter. Puisque la quantité de boues valorisées a plafonné depuis 1994, la proportion de boues municipales revalorisées a donc régressé. L'enfouissement des boues, jadis une pratique privilégiée car peu coûteuse, est aujourd'hui limitée par la réduction des sites d'enfouissement, les réglementations de plus en plus contraignantes et les taxes en augmentation. Pour ce qui est de l'incinération, elle est onéreuse vu la nécessité de déshydrater les boues au préalable, de disposer les cendres et de dépolluer les gaz de combustion. *Donc, face à la congestion provoquée par l'augmentation rapide de la quantité de boues à gérer et à la limitation des lieux et des méthodes pour en disposer, la gestion des boues d'épuration devient de plus en plus problématique et coûteuse. Il s'agit de la seconde problématique générale à laquelle s'adressent ces travaux de recherche.*

Cette problématique nécessite de trouver de nouvelles façons de gérer les boues d'épuration et des efforts de recherche soutenus amènent de nombreuses avancées technologiques (Eskicioglu *et al.*, 2010; Mannan *et al.*, 2007; Ndegwa *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2009). Ces travaux ont tous en commun de mettre en évidence le grand potentiel nutritif des boues d'épuration pour supporter la croissance de divers microorganismes. Il y a donc intérêt à tirer profit de ce potentiel pour la production d'une variété de produits microbiens à valeur ajoutée (Barnabé, 2004).

1.2.2.1 La production de protéases à partir des boues d'épuration

Le *Groupe de recherche en assainissement et en technologies environnementales* de l'INRS-ETE explore la capacité des boues à supporter la croissance de microorganismes industriels et la production de leurs dérivés microbiens d'intérêt commercial. Entre autres, la possibilité d'effectuer la bioconversion des boues d'épuration en biopesticides (*Bacillus thuringiensis*) a fait l'objet de plusieurs travaux et un procédé efficace a ainsi pu être mis au point (Tirado-Montiel, 2001; Sachdeva *et al.*, 1999 et 2000; Barnabé, 2004; Yezza *et al.*, 2004; Adjallé, 2010). Également, un procédé de bioconversion des boues en biofertilisant à base de *Rhizobium* est également à l'étude (Ben Rebah, 2001; Dufresne, 2004). Des travaux portant sur la production de bioplastiques dans les boues d'épuration ont également été réalisés (Yan *et al.*, 2006). Tous ces travaux ont jusqu'à maintenant démontré que les boues d'épuration ont le potentiel de devenir une matière première abondante et économique pour l'obtention de plusieurs produits microbiens.

L'intérêt de valoriser les boues d'épuration et la nécessité de trouver un substrat alternatif bon marché pour la production de protéases, ont amené le *Groupe de recherche en assainissement et en technologies environnementales* de l'INRS-ETE à étudier la possibilité d'utiliser ces boues comme milieu de culture pour la production de protéases. Ce projet consiste plus spécifiquement à substituer les boues d'épuration municipales aux milieux de culture conventionnels utilisés actuellement dans les procédés de fermentation pour la production de protéases par *Bacillus licheniformis*. L'intérêt de ces travaux est double. Dans un premier temps, ces travaux visent à produire des protéases à moindres coûts à partir d'un substrat abondant et peu dispendieux en utilisant les procédés conventionnels de culture microbienne en bioréacteur. En second lieu, les gains financiers découlant de la mise en marché des protéases issues de ce bioprocédé permettraient de réduire considérablement les coûts de gestion des boues d'épuration.

1.3 PROBLÉMATIQUES SPÉCIFIQUES

Les premiers essais de production de protéases dans les boues d'épuration en utilisant *Bacillus licheniformis* ont été tentés par Meunier (1999). Ces travaux, réalisés en fioles, ont permis de démontrer que les boues d'épuration peuvent supporter la croissance de *B. licheniformis*. Par la suite, des travaux en bioréacteurs ont été entrepris. Ces travaux ont démontré que des conditions contrôlées (bioréacteur) permettent d'obtenir des activités protéolytiques plus élevées que des conditions non contrôlées (erlenmeyer). De plus, ces travaux ont également permis de déterminer la concentration optimale des boues en MES (35 g/L) pour la production de protéases. Également, des travaux ont été réalisés afin d'évaluer l'effet des caractéristiques de l'inoculum (physiologie, âge et volume) sur la croissance de *Bacillus licheniformis* lors de fermentations dans les boues d'épuration, afin de mettre au point une procédure efficace de préparation de l'inoculum. Jusqu'ici, ces travaux ont permis d'obtenir des rendements comparables à ceux obtenus lors de fermentation effectués dans un milieu synthétique de référence (Drouin, 2005).

Néanmoins, malgré ces premiers résultats prometteurs, le projet en est à ses premières étapes. En effet, de nombreux éléments doivent être étudiés et optimisés afin de mettre au point un procédé de production de protéases performant à partir des boues d'épuration.

Parmi ces éléments, les paramètres opérationnels (pH, aération, agitation) qui interviennent dans les procédés de fermentation ont un effet considérable sur les performances de ces procédés. Il importe donc de développer des stratégies de gestion adaptées de ces paramètres afin d'obtenir de meilleurs rendements en production de protéases. *Cependant, le manque de connaissance sur l'effet des différents paramètres opérationnels (pH, aération, agitation) sur la production de protéases par Bacillus licheniformis dans les boues d'épuration constitue la première problématique spécifique de cette étude de recherche.*

Également, puisque les boues d'épuration constituent le substrat employé pour supporter la croissance microbienne et la production de protéases, les caractéristiques et la composition de ces boues auront une grande influence sur les performances du procédé. La composition des boues dépend de la composition des eaux usées et du type de traitement des eaux appliqué. De plus, différents composés (ex: flocculants, coagulants) sont fréquemment ajoutés dans les eaux usées ou les boues afin d'améliorer les rendements épuratoires des procédés de traitement des eaux, ce qui

modifie la composition et les caractéristiques des boues. Également, les nutriments potentiels des boues peuvent être présents sous différentes formes, parfois difficilement biodégradables, et certaines caractéristiques physiques des boues (présence de floccs, viscosité élevée) sont contraignantes pour la fermentation. Les caractéristiques des boues d'épuration peuvent être grandement variables selon le type de procédé de traitement des eaux dont elles sont issues et selon les traitements qu'elles ont subis. *L'absence de connaissances sur l'effet de la composition et des caractéristiques des boues d'épuration sur la production de protéases par Bacillus licheniformis constitue la seconde problématique spécifique de cette étude de recherche.*

C'est dans le but de répondre à ces problématiques qu'ont été réalisés les présents travaux de recherche. Une revue de littérature présentant les informations pertinentes à la réalisation de ces travaux est présentée dans la section suivante.

1.4 REVUE DE LITTÉRATURE

1.4.1 Rôle et actions des enzymes

Les enzymes sont des protéines de hautes masses moléculaires (10 000 à 100 000 daltons) et sont constituées de longues chaînes d'acides aminés unis par des liens peptidiques. Ce sont des macromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaires. Elles sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires. Autre fonction importante, les enzymes sont responsables de la dégradation des molécules complexes en molécules plus facilement assimilables (Meunier, 1999).

Les enzymes agissent comme catalyseurs de plusieurs réactions chimiques. Une caractéristique importante des enzymes est leur très grande sélectivité à catalyser des réactions chimiques précises. En effet, contrairement aux agents chimiques qu'elles tendent à remplacer, les enzymes sont plus spécifiques.

De façon générale, la majorité des réactions enzymatiques peut être représentée de la façon suivante (Meunier, 1999) :



Les enzymes catalysent les réactions chimiques en abaissant leur énergie d'activation : quand deux molécules se rencontrent pour réagir, elles forment un complexe à l'état de transition. L'énergie d'activation est requise pour que les molécules puissent former le complexe. Ce complexe pourra par la suite se décomposer pour donner les produits. Cependant, la réaction n'aura pas lieu si une quantité d'énergie suffisante (l'énergie d'activation) n'est pas fournie. Les enzymes abaissent les énergies d'activation. Une moins grande quantité d'énergie est alors nécessaire pour l'accomplissement de la réaction, ce qui permet d'accélérer cette réaction (Prescott *et al.*, 1995).

1.4.2 Origine des enzymes industrielles

De par leurs nombreuses propriétés intéressantes, les enzymes sont de plus en plus utilisées. Dans plusieurs procédés, les réactions sont normalement accomplies par des produits chimiques peu spécifiques qui occasionnent des pertes de rendement importantes et génèrent des sous-produits souvent difficiles et coûteux à éliminer. Spécifiques dans leur activité et exigeant moins d'énergie de réaction, les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coût-efficacité des procédés. Également, les enzymes présentent de nombreux avantages au niveau environnemental : biodégradabilité, action spécifique, faible toxicité et formation de sous-produits compatibles avec l'environnement (Barnabé *et al.*, 2003).

Les enzymes industrielles sont d'origine végétale, animale ou microbienne (Meunier, 1999; Rao *et al.*, 1998; Coultouly, 1991). L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. C'est pourquoi la production d'enzymes à partir de microorganismes est privilégiée par les producteurs puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants. En fait, les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (Meunier, 1999).

Les protéases provenant de microorganismes sont d'origine bactériennes (ex: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, etc.) ou fongiques (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, etc.). *Bacillus licheniformis* est un des plus importants producteurs de protéases employés en industrie. En effet, jusqu'au début des années 80, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus amyloliquefaciens* ont produit près de 50% des enzymes de fermentation employées en industrie (Meunier, 1999).

À l'heure actuelle, de nombreux efforts sont orientés vers la biologie moléculaire afin de modifier les souches productrices de façon à les rendre plus performantes pour la production de protéases et de façon à améliorer les caractéristiques catalytiques des protéases produites. Ces efforts ont pour but d'améliorer les performances des procédés et d'accroître davantage l'étendue des applications enzymatiques (Barnabé, 2003). Également, de nouvelles souches productrices de

protéases aux propriétés intéressantes font l'objet de nombreux travaux de recherche (El-Hadj-Ali *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2009; Ramnani *et al.*, 2005)

1.4.3 Enzymes protéolytiques

Les enzymes peuvent être divisées en plusieurs classes selon leur action spécifique. Chacune des six classes principales est décrite dans le Tableau 2 (Meunier, 1999).

Tableau 2 Principales classes d'enzymes selon Meunier (1999)

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductases	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atomes d'hydrogène)
Transférases	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, etc.)
Hydrolases	Réactions d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau)
Lyases	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse
Isomérases	Réactions d'isomérisation (réaction où un composé est transformé en un de ses isomères)
Ligases	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP

Au niveau industriel, la classe d'enzyme la plus importante est la classe des hydrolases ou enzymes hydrolytiques. Au cours de la dernière décennie, 75% des enzymes destinées à l'industrie étaient hydrolytiques (Rao *et al.*, 1998). Les protéases, ou enzymes protéolytiques, font partie de cette classe. En effet, les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique.

Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur site d'action, soit les protéases intracellulaires et extracellulaires. Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques comme la sporulation et la différenciation, la maturation d'hormones et d'enzymes, et la maintenance du pool de protéines cellulaires. Ce type de protéase est moins intéressant à utiliser en industrie car ces enzymes nécessitent une étape de lyse

cellulaire pour en faire l'extraction. Les protéases extracellulaires, excrétées à l'extérieur de la cellule, sont importantes pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement extérieur de la cellule et aident ainsi la cellule à assimiler les produits de cette hydrolyse (Kalisz, 1988). Ces enzymes sont plus intéressantes à utiliser en industrie car elles ne nécessitent pas d'étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Une centrifugation suffit pour les séparer des cellules.

Les protéases se différencient également selon leur mode d'action: les endopeptidases et les exopeptidases. Les exopeptidases sont des protéases qui hydrolysent les liens peptidiques près des extrémités N ou C-terminales des protéines. Ces enzymes sont très peu utilisées en industrie. La plupart des enzymes utilisées en industrie sont des endopeptidases. Elles sont caractérisées par leur action hydrolytique à un site spécifique de la chaîne polypeptidique loin des extrémités N-terminale et C-terminale. La présence d'un groupement amino ou carboxyl libre peut avoir un effet répresseur sur l'activité de ces protéases. Les endopeptidases sont divisées en 4 classes selon leur mécanisme catalytique: les protéases cystéines, les métallo-protéases, les protéases aspartiques et les protéases sérines (Rao *et al.*, 1998; Fogarthy et Kelly, 1990).

1.4.3.1 Protéases sérines

La très grande majorité des protéases alcalines, très employées en industrie, sont des protéases de type sérine. Ces protéases sont caractérisées par la présence d'un résidu sérine au niveau de leur site actif, ainsi que de résidus aspartate et histidine formant le complexe actif avec le résidu sérine. Elles sont présentes chez les virus, les bactéries et les eucaryotes. Ces protéases ont généralement un pH optimal de 10, mais il peut varier entre 7 et 11. Ces enzymes sont inhibées par le diisopropyl fluorophosphate (DFP) et le phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Certaines protéases sérines sont aussi inhibées par des agents thiols, comme le p-chloromercuribenzoate (PCMB), à cause de la présence d'un résidu cystéine près du site actif. Leur masse moléculaire se situe généralement entre 18 et 35 kDa. Les protéases sérines peuvent dépendre du Ca^{2+} pour leur stabilité. La *Subtilisin Carlsberg* et la *Subtilisin Novo* sont les protéases alcalines les plus connues. La protéase *Subtilisin Carlsberg*, produite par *Bacillus licheniformis*, a été découverte en 1947. Elle est produite commercialement depuis 1960 par la compagnie Novo Nordisk (Danemark). La protéase est constituée d'une simple chaîne de peptide avec 274 résidus d'acides aminés. Le site actif est formé par les résidus Ser 221, His 64 et Asp 32. Contrairement à plusieurs protéases sérines, les ions Ca^{2+} ne sont pas nécessaires pour assurer la stabilité de la protéase. Le pH optimal est de 10 et la température optimale de la protéase est de 50°C. Le poids

moléculaire de la protéase est de 27,2 kDa. Quant à la *Subtilisin Novo*, produite par *Bacillus amyloliquefaciens*, elle contient 275 acides aminés. Il y d'ailleurs une homologie avec la *Subtilisin Carlsberg* puisque seulement 28 des 275 résidus d'acides aminés sont différents. Le site actif comprend les résidus Ser 221, His 54 et Asp 32. Son poids moléculaire est de 27,5 kDa (Rao *et al.*, 1998; Meunier, 1999; Polgar, 1989).

1.4.4 Applications industrielles des protéases

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Le tableau suivant donne un aperçu des secteurs industriels employant des protéases.

Tableau 3 Emploi des protéases dans différents domaines industriels

Secteur industriel	Utilisation
Industrie alimentaire	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation du fromage (Fogarthy et Kelly, 1990; Rao <i>et al.</i>, 1998) • Boulangerie (Rao <i>et al.</i>, 1998) • Fabrication de produits à base de soya (Rao <i>et al.</i>, 1998) • Synthèse de l'aspartame (Rao <i>et al.</i>, 1998)
Domaine pharmaceutique et médical	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement de déficiences du système digestif (Kudrya et Simonenko, 1994) • Traitement de plaies et de brûlure (Kudrya et Simonenko, 1994)
Textiles	<ul style="list-style-type: none"> • Délainage enzymatique, reverdissage des peaux, dégommage de la soie (Gupta <i>et al.</i>, 2002a; Kumar et Takagi, 1999; Lenting, 2007; Rao <i>et al.</i>, 1998; Tang <i>et al.</i>, 2004)
Procédés de traitement ou de revalorisation/bioconversion de résidus	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement des eaux résiduelles et résidus riches en protéines (Gupta, 2002a, Ichida <i>et al.</i>, 2001; Kumar et Takagi, 1999; Maurer, 2007) • Nettoyage/Dé-colmatage de membrane (Maurer, 2007) • Production/extraction de protéines à partir de plumes de volailles (Dalev, 1994; Haddar <i>et al.</i>, 2011) • Extraction/production de chitine à partir de carcasses de crevettes (Haddar <i>et al.</i>, 2011)
Détergents	<ul style="list-style-type: none"> • Additif dans les formulations de détergents

1.4.4.1 Emploi des protéases dans les détergents

Bien que l'emploi des protéases soit très diversifié dans le monde industriel, le secteur des détergents est depuis plusieurs années responsable de la majeure partie de la demande en protéases (Gupta *et al.*, 2002a). Le marché des détergents est aujourd'hui un marché très large qui englobe les détergents pour usage domestique (détergents à lessive, détergents à vaisselle), les produits de nettoyage pour usage industriel et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le plus important marché au niveau des détergents est de loin celui des détergents à lessive. À titre d'exemple, le marché de la protéase alcaline appelée « subtilisine » était estimé à plus de 200 millions US\$ (Demain, 2000) et la production estimée à plus de 500 tonnes par année (Rao *et al.*, 1998).

Les protéases jouent un rôle important dans l'efficacité des détergents. Dans les procédés de lavage, les conditions alcalines et la présence de surfactants, combinés à des agents séquestrants, vont suffire pour dissoudre ou disperser la plupart des saletés incrustées dans les tissus. Cependant les saletés de nature protéique ne seront pas toujours enlevées par ces traitements. De plus, les protéines toujours accrochées aux tissus seront capables de retenir, par coagulation, d'autres composés. Par exemple, des taches composées de sécrétions corporelles et qui ne sont pas visibles à l'œil nu donneront après quelques lavages des vêtements ayant une apparence terne, de par la capacité des protéines à coaguler d'autres particules. L'utilisation d'enzymes protéolytiques permet de résoudre ce problème. Les protéases hydrolysent les protéines dissoutes et coagulées et les composés solubles qui en résultent sont plus facilement rincés hors du tissu (Meunier, 1999; Fogarthy et Kelly, 1990).

Aujourd'hui, les préparations d'enzymes pour les détergents sont sous forme liquide ou granulaire. Les granules sont généralement formés d'un noyau contenant les enzymes, entouré d'une enveloppe faite souvent de cire pour réduire le risque que de la poussière soit relâchée si les granules sont soumis à l'abrasion. Le noyau peut contenir des ligands et des fibres de cellulose pour rendre les granules plus résistants et plus flexibles. Les préparations d'enzymes liquides sont conçues pour être incorporées facilement aux détergents liquides. Elles consistent pour la plupart du temps en une solution claire d'enzymes dans un solvant fait d'eau et de propylène glycol. Des agents stabilisants sont aussi fréquemment ajoutés pour accroître la stabilité à long terme des préparations (Eriksen, 1996).

Les protéases incorporées aux détergents doivent avoir une activité protéolytique appréciable à des températures et pH élevés, et être résistantes aux surfactants et aux agents de blanchiment présents dans les détergents, comme le peroxyde d'hydrogène ou le perborate de sodium (El Hadj-Ali *et al.*, 2007; Johnvesly et Naik, 2001; Joo *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2009; Sellami-kamoun *et al.*, 2008). La plupart des protéases répondant à ces caractéristiques sont produites par des *Bacillus sp*, dont *Bacillus licheniformis*, abondamment employé en industrie. De plus, comme *B. licheniformis* a aussi la capacité de produire des surfactants, la production simultanée de surfactants et de protéases, tous deux pouvant être incorporés aux détergents, est une avenue intéressante actuellement à l'étude (Ramnani *et al.*, 2005).

Des essais ont été réalisés sur plusieurs préparations commerciales de détergents en poudre. Pour toutes les préparations évaluées, les protéases y étant incorporées génèrent une activité protéolytique maximale à pH 10 et à 50 °C, qui diminue par la suite lorsque la température augmente (60 °C). La thermostabilité des enzymes est aussi importante. Lorsque les préparations sont dissoutes dans de l'eau distillée et mises à incuber à pH 10 et à 50 °C, l'activité enzymatique résiduelle demeure élevée après 30 minutes (80-90%). Par contre, après une heure d'incubation dans ces mêmes conditions, l'activité protéolytique résiduelle chute considérablement (0-10%) pour toutes les préparations (Banik et Prakash, 2004). La *Subtilisin Carlsberg*, une protéase abondamment employée dans les détergents, a une demi-vie rapportée de 2,5 minutes à 60 °C (Gupta *et al.*, 1999).

Outre les protéases, les détergents peuvent également contenir des lipases, des amylases et des cellulases. Néanmoins, les protéases sont les enzymes les plus utilisées à l'heure actuelle (Eriksen, 1996; Herbots, 2007; Ito *et al.*, 1998).

Le marché des détergents est un marché en constante évolution. Bien que l'emploi des enzymes dans les détergents, et plus particulièrement des protéases, soit un concept relativement simple et connu depuis longtemps, le défi de rendre les détergents davantage performants est plus que jamais présent. Les efforts de recherche sont donc considérables afin de découvrir ou de mettre au point de nouvelles enzymes avec des propriétés améliorées (Herbots, 2007).

1.4.5 *Bacillus licheniformis*

1.4.5.1 Caractéristiques générales

Bacillus licheniformis est une bactérie hétérotrophe chémoorganotrophe qui s'apparente étroitement à *Bacillus subtilis*. Les cellules de *B. licheniformis* sont des bâtonnets droits mesurant entre 1 et 2 µm de longueur et ayant un diamètre de moins de 0,9 µm. Elles sont mobiles et se présentent à l'état seul ou en chaînes de longueurs variables. Il s'agit d'une bactérie Gram positif. Sporulante, cette bactérie produit une seule spore de forme ellipsoïdale, qui est située en position sub-terminale dans la cellule. Sur gélose nutritive, *B. licheniformis* produit des colonies à la morphologie changeante. Les jeunes colonies sont petites, ondulées, rondes à bordure régulière et transparente. Les colonies plus âgées grossissent et deviennent plates, rondes à bordure crénelée, opaques et dures, évoquant l'aspect du lichen. De plus, elles adhèrent fortement à la gélose.

Bien que reconnu pour produire de nombreux métabolites d'intérêt commercial, *B. licheniformis* est principalement utilisé pour la production de protéases alcalines. Les protéases alcalines produites par *B. licheniformis* sont des protéases de type sérine (Calik *et al.*, 1998, 1999 et 2000a).

1.4.5.2 Croissance et métabolisme

Bacillus licheniformis tire son énergie de molécules organiques et utilise préférentiellement les glucides comme source d'énergie et de carbone. Durant la croissance, *B. licheniformis* catabolise les glucides présents dans la cellule en l'un des intermédiaires des principales voies de dégradation des glucides, soit la voie d'Embden-Meyerhof (glycolyse) et la voie des pentoses-phosphates (Deutscher *et al.*, 2002). Comme plusieurs de ces intermédiaires sont des acides organiques, leur accumulation peut contribuer à la diminution du pH du milieu de culture durant la croissance. *B. licheniformis* assimile préférentiellement l'azote sous forme de NH_4^+ , mais il peut utiliser une grande variété de composés comme source d'azote. *B. licheniformis* croît de façon optimale en milieu aérobie, mais peut croître en anaérobiose grâce à sa capacité de fermenter les sucres (Fisher et Débarbouillé, 2002). *B. licheniformis* peut croître sur une grande plage de température, allant de 20°C jusqu'à 60°C. Cependant, les températures optimales pour la production de protéases alcalines rapportées dans la littérature se situent le plus souvent autour de

35-37°C. Le pH optimal de croissance varie entre 7,0 et 7,5 (Calik *et al.*, 2002; Mabrouk *et al.*, 1999; van Putten *et al.*, 1996).

B. licheniformis produit et sécrète des protéases dans le milieu afin de subvenir à ses besoins en azote et en acides aminés à partir des protéines. De plus, *B. licheniformis* a la capacité d'utiliser les protéines comme source d'énergie et de carbone. Les protéases hydrolysent alors les protéines et les polypeptides en acides aminés qui sont ensuite transportés à l'intérieur de la cellule pour être métabolisés.

La première étape du catabolisme d'un acide aminé est une désamination qui lui retire son groupe aminé. Le groupe aminé est transféré sur une molécule accepteuse (un cétoacide). L'acide organique résultant de la désamination peut être converti en pyruvate, en acétyl-CoA ou en un intermédiaire du cycle des acides tricarboxyliques et oxydé pour libérer de l'énergie. Il peut aussi servir de source carbonée pour la synthèse de constituants cellulaires.

B. licheniformis peut produire deux types de protéases extracellulaires : des protéases neutres et des protéases sérines alcalines (Calik *et al.*, 2001).

1.4.5.3 La production de protéases chez *Bacillus licheniformis*

Pour la production de protéases, les fermentations ont le plus souvent cours en mode discontinu (« batch culture ») dans lequel le milieu de culture n'est pas régénéré (Meunier, 1999). Les procédés en continu ou en semi-continu ne sont pas couramment utilisés en industrie pour la production de protéases, même si certains procédés expérimentaux s'avèrent efficaces (Frankena *et al.*, 1985; Giesecke *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 2002a). En mode discontinu, *B. licheniformis* croît selon un modèle représenté graphiquement par une courbe ayant quatre phases bien distinctes (Figure 1) (Prescott *et al.*, 1995).

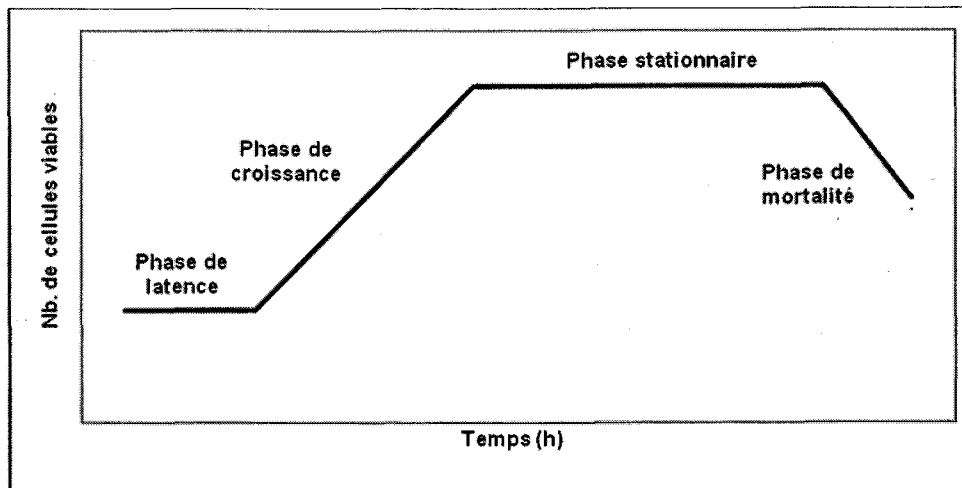


Figure 1 Courbe de croissance microbienne en mode discontinu

Lors de l'inoculation d'un milieu de culture frais, les cellules ne se multiplient pas immédiatement. Cette période représente la phase de latence pendant laquelle les cellules sont actives et procèdent à la synthèse de nouveaux constituants cellulaires de façon à s'adapter au nouveau milieu sans toutefois se multiplier. La durée de la période de latence est grandement influencée par la quantité et l'âge de l'inoculum ainsi que la composition du nouveau milieu par rapport à la composition du milieu d'origine. Lors des fermentations, l'emploi d'un inoculum déjà adapté au milieu de culture permet de réduire au minimum la durée de la phase de latence. Pour la production de protéases dans les boues d'épuration par *Bacillus licheniformis*, une procédure de préparation de l'inoculum a été mise au point (Drouin *et al.*, 2005).

Suite à cette période d'adaptation, les microorganismes commencent à se multiplier. Ils entrent alors en phase de croissance. À ce moment, la vitesse de croissance bactérienne est maximale. Les cellules se dédoublent à une vitesse et à un intervalle régulier, et durant cette phase, la population est homogène. Durant la phase de croissance, la cellule croît en utilisant préférentiellement les sources de carbone et d'azote facilement assimilables (Doi, 1974; Gupta *et al.*, 2002a et b; Kumar et Takagi, 1999;

La phase stationnaire commence au moment où les nutriments du milieu s'épuisent. La population devient alors stable. Chez *B. licheniformis*, les cellules entrent graduellement en phase de sporulation. Le déclin des cellules viables s'observe durant la phase de mortalité où l'accumulation des déchets métaboliques inhibiteurs et l'épuisement des nutriments essentiels entraînent la mort cellulaire (Prescott *et al.*, 1995).

Chez *Bacillus licheniformis*, la production de protéase est associée à la phase stationnaire (Gupta *et al.*, 2002a et b; Calik *et al.*, 2000b). Durant la phase de croissance, la cellule croît aux dépens des substrats les plus facilement assimilables (ex. glucose et autres sucres simples, acides aminés). La présence de tels substrats peut avoir un effet inhibiteur sur la production de protéases (Kumar et Takagi, 1999). Par contre, au début de la phase stationnaire, les nutriments facilement assimilables s'épuisent et les déchets métaboliques commencent à s'accumuler dans le milieu. La production de protéases s'enclenche donc en réponse à la disparition de l'effet inhibiteur associé à la présence de ces substrats (Kumar et Takagi, 1999; Kumar et Parrack, 2003). Également, la production de protéase pourrait s'enclencher en réponse aux conditions de croissance qui deviennent plus difficiles (Calik *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002b).

Le procédé de production de protéases chez *Bacillus licheniformis* peut donc être sommairement divisé entre deux phases distinctes : La phase de croissance pendant laquelle les cellules se multiplient et où la synthèse des protéases est de faible à nulle, et la phase stationnaire durant laquelle les protéases sont produites. Fréquemment, les conditions de culture qui permettent l'atteinte d'un nombre maximum de cellules ne sont souvent pas celles qui permettent d'atteindre les valeurs d'activité protéolytique les plus élevées (Kumar et Takagi, 1999).

En fin de phase stationnaire, l'activité protéolytique mesurée tend à diminuer. En effet les travaux de Drouin *et al.* (2005) montrent qu'une diminution survient à la fin de la fermentation. Quelques hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette baisse de l'activité protéolytique. La diminution pourrait être causée par une limitation des nutriments dans les boues. Les travaux de Beg *et al.* (2002) et de Puri *et al.* (2002) suggèrent que la production de protéases diminue lorsque la concentration en nutriments devient limitante. Également, la diminution de l'activité protéolytique pourrait s'expliquer par une désactivation des protéases produites. Selon Chu *et al.* (1992), cette désactivation pourrait être causée par un phénomène d'auto-digestion ou par la digestion des protéases extracellulaires par certaines protéases intracellulaires larguées dans le milieu suite à la lyse cellulaire à la fin du processus de la sporulation. À la fin de la fermentation, un taux de désactivation supérieur au taux de synthèse des protéases amènerait ainsi une baisse de l'activité protéolytique mesurée.

1.4.5.4 Mécanismes régulateurs de la synthèse des protéases

Comme la production de protéases est associée avec la phase stationnaire, qui est marquée par la transition entre la croissance végétative et la sporulation, certains auteurs avancent que la sporulation et la production de protéases seraient intimement reliées. Ainsi, l'analyse de mutants asporogènes montre que plusieurs ne produisent pas de protéases. La réversion de ces mutations permet aux cellules de retrouver la capacité de produire des protéases (Gupta *et al.*, 2002b; Doi, 1974).

À l'inverse, certains rapports suggèrent que la sporulation et la production de protéases, même si elles ont lieu simultanément, ne sont pas reliées directement. Ainsi, il a été établi que certains mutants asporogènes de *B. licheniformis* avaient la capacité de produire des protéases (Gupta *et al.*, 2002b; Fleming *et al.*, 1995). L'absence de protéases a été notée chez les mutants bloqués lors des étapes d'initiation de la sporulation, alors que les mutants bloqués dans les étapes subséquentes de la sporulation ont conservé la capacité de produire des protéases. Ainsi, la sporulation et la production de protéases ne seraient pas directement liées. Cependant, un ou des mécanismes communs seraient impliqués dans l'initiation des deux événements, dont des mécanismes de répression catabolique (Doi, 1974; Gupta *et al.*, 2002b). La synthèse et l'excrétion des protéases extracellulaires, tout comme la sporulation, seraient donc partiellement inductibles, pouvant être stimulées sous certaines conditions ou en présence de certaines molécules, tout en étant assujetties à la répression catabolique par certains composés (Calik *et al.*, 2000a et 2002; Doi, 1974; Gupta *et al.*, 2002a et b; Kumar et Takagi, 1999; Mabrouk *et al.*, 1999).

1.4.6 Milieux de culture pour la production de protéases

1.4.6.1 Milieux conventionnel pour la production de protéases

Les milieux servant à la production de protéases en industrie sont généralement complexes et contiennent des concentrations élevées de sources de carbone et d'azote (Kumar et Takagi, 1999).

1.4.6.1.1 Source de carbone

La nature des sources de carbone disponible a une grande influence sur les performances du procédé. Une grande variété de substrats peut être utilisée, notamment de nombreux glucides dont les effets ont été abondamment étudiés. Par exemple, il a été établi que le glucose, bien qu'il

stimule la croissance microbienne, inhibe la production de protéases par un mécanisme de répression catabolique (Ferrero *et al.*, 1996; Frankena *et al.*, 1985; Gupta *et al.*, 2002a; Kumar et Takagi, 1999; Puri *et al.*, 2002; Sinha et Satyanarayana, 1991). En effet, lors d'une fermentation employant le glucose comme source de carbone, la production de protéases commence au moment où le glucose est épuisé dans le milieu (Ferrero *et al.*, 1996; Kumar et Takagi, 1999). D'autres sucres simples (lactose, fructose, etc.) peuvent aussi être utilisés et leurs effets sur la production de protéases sont variables (Mabrouk *et al.*, 1999; Sinha et Satyanarayana, 1991). Par contre, il est généralement admis qu'une diminution dans la production de protéases est observée lorsque tous ces sucres sont présents en grandes concentrations dans les milieux de culture (Kumar et Takagi, 1999; Mabrouk *et al.*, 1999).

Cependant, dans plusieurs travaux de production de protéases avec *Bacillus sp.*, des sources de carbone complexes sont employées en présence ou en absence de sources de carbones simples. Par exemple un milieu soja employant l'amidon ou le son de blé comme source de carbone permet une meilleure production de protéases que le fructose et le lactose (Sinha et Satyanarayana, 1991). Également, des sources de carbone de nature protéique peuvent être employées. Ainsi, la caséine permet une bonne production de protéases (Ferrero *et al.*, 1996). Le petit lait est aussi une source de carbone alternative pour la production de protéases alcalines (Kumar et Takagi, 1999). À cet effet et tel que mentionné à la section 1.2.2.1, des résidus ou des substrats alternatifs peu dispendieux sont employés comme source de carbone complexe pour la production de protéases dans plusieurs travaux de recherche.

1.4.6.1.2 Source d'azote

B. licheniformis peut métaboliser l'azote sous forme organique et inorganique pour produire les acides aminés, les acides nucléiques, les protéines, dont les protéases, et les composantes de parois cellulaires nécessaires à sa survie. La production de protéases est donc dépendante de la biodisponibilité des sources d'azote appropriées (Kumar et Takagi, 1999). Certains auteurs mentionnent que la présence d'azote inorganique est nécessaire pour la production de protéases. Ainsi, dans un milieu à base de caséine, l'ajout d'ion ammonium ou de nitrate en faibles concentrations stimule la production. Par contre, l'ajout d'ion ammonium en grande quantité a un effet répressif (Ferrero *et al.*, 1996; Giesecke *et al.*, 1991). Le même phénomène a été constaté par Mabrouk *et al.* (1999) dans un milieu à base de soja et supplémenté de faibles concentrations de phosphate d'ammonium.

Généralement, de faibles productions de protéases sont obtenues avec l'emploi d'azote inorganique comme seule source d'azote. La synthèse d'enzymes est inhibée par la présence de sources d'azote rapidement métabolisables comme les acides aminés, les peptides de faible poids moléculaire (Ferrero *et al.*, 1996) et l'ion ammonium (Giesecke *et al.*, 1991; Kumar et Takagi, 1999). Le même phénomène est observé chez *B. subtilis* auquel *B. licheniformis* s'apparente étroitement (Kembhavi *et al.*, 1993). Par contre, quelques rapports indiquent l'absence de répression associée à l'usage de sels d'ammonium (Kumar et Takagi, 1999; Sinha et Satyanarayana, 1991). Plusieurs rapports font état de production de protéases plus élevée avec l'utilisation de sources d'azote organique. Par exemple, le soja est une excellente source d'azote qui permet d'obtenir une production de protéases plus élevée (Kumar et Takagi, 1999; Mabrouk *et al.*, 1999; Sinha et Satyanarayana, 1991). Des substrats comme les peptones, la caséine, l'extrait de bœuf, les liqueurs de maïs et le son de blé peuvent aussi être utilisés, mais la production n'est pas aussi élevée que celle observée avec du soja (Mabrouk *et al.*, 1999; Puri *et al.*, 2002; Sinha et Satyanarayana, 1991).

1.4.6.1.3 Autres éléments

Parmi les éléments composants le milieu de culture, certains éléments inorganiques peuvent contribuer à la structure des métabolites et/ou agir comme cofacteurs des enzymes produites ou des enzymes impliquées au niveau des réactions intracellulaires. Ces éléments peuvent fortement influencer la formation des bioproduits en influençant les flux métaboliques (Calik *et al.*, 2004b). Par exemple, certains ions comme le calcium, le cobalt, le cuivre, le bore, le magnésium, le manganèse et le molybdène peuvent avoir un effet bénéfique sur la croissance de *B. licheniformis* et la production de protéases (Calik *et al.*, 2004b). Le calcium a souvent été cité comme contribuant à la stabilité des protéases (Kumar et Takagi, 1999; Mabrouk *et al.*, 1999). Ainsi, l'ajout d'ions calcium permet d'augmenter de façon drastique la demi-vie des protéases en conditions thermo-alcalines (Banerjee *et al.*, 1999). À l'inverse, le zinc semble avoir un effet inhibiteur sur la production de protéases.

Le phosphate de potassium, utilisé dans plusieurs études, semble avoir un effet bénéfique sur la production de protéases lorsqu'employé en faibles concentrations. En revanche, la présence de phosphate en plus fortes concentrations semble avoir un effet inhibiteur sur la production de protéases (Kumar et Takagi, 1999). Calik *et al.* (2004b) ont rapporté que la présence d'ion sulfate (SO_4^{2-}) a un effet inhibiteur sur la production de protéases. Par contre, Hanlon *et al.* (1982) ont

observé une augmentation de la production de protéases avec l'augmentation des concentrations en ions SO_4^{2-} jusqu'à une certaine concentration, alors que la présence de plus fortes concentrations n'a eu aucun impact. Les travaux de Calik *et al.* (2004b) ont aussi démontré que la présence d'ion Cl^- à également un effet inhibiteur sur la production de protéases.

1.4.6.2 Les boues d'épuration comme milieu de culture pour la production de protéases

1.4.6.2.1 Composition des boues

Les boues d'épuration municipales sont générés par le traitement des eaux usées municipales (eaux usées domestiques, eaux pluviales déversées dans les réseaux d'égouts). Les boues d'épuration sont constituées de 40 à 80% de matières organiques biodégradables. Ce pourcentage varie selon le type de traitement des eaux usées qui génèrent les boues. La charge organique provient des excréments humains et d'un mélange complexe de polysaccharides (sucres, cellulose, lignine), d'azote organique (protéines et acides aminés) et inorganique (N-NH_4^+ et N-NO_2^- - NO_3^-), de phosphore organique et inorganique (P-PO_4), de graisses (huiles, lipides et acides gras), de métaux ainsi que de matières humiques, fulviques, lignocellulosiques. Une forte proportion de ce matériel organique est sous forme de microorganismes morts ou vivants (bactéries, virus, protozoaires ou autres), unicellulaires ou en floccs, et procure une large surface pour l'adsorption des résidus organiques hydrophobes. L'adsorption de ces composants organiques sur les microorganismes ou les particules des boues peut réduire leur dégradation et les rendre moins accessibles aux microorganismes actifs. Ainsi, certains composés peuvent être facilement biodégradables alors que d'autres nécessitent des procédés de dégradation par hydrolyse, ozonation, ultrasonication, etc. (Pham *et al.*, 2009). Mis à part le nickel qui est soluble, très peu de métaux se retrouvent sous forme dissoute dans les boues. Normalement, ils sont sous forme de sulfures, d'oxydes, d'hydroxydes, de silicates, de phosphates, de carbonates et de sels insolubles. Ils peuvent aussi être adsorbés ou associés à la matière organique des boues (Barnabé, 2004). Fréquemment, les boues contiennent aussi différents composés ajoutés afin de favoriser la floculation des particules (ex : ajout d'alun et/ou polymères aux eaux de lavage de biofiltres), ou l'enlèvement de certains éléments (ex : déphosphatation par ajout de chlorure ferrique à la liqueur mixte) au cours des procédés de traitement des eaux.

Les boues peuvent être classées en différentes catégories selon le type de traitement appliqué. Les boues primaires sont obtenues après une simple décantation des eaux usées. Elles sont très concentrées en matières minérales (sable, terre, etc) et en matières organiques en pleine évolution. Les boues physico-chimiques sont obtenues par décantation améliorée des eaux usées par des flocculants (sel de fer, d'aluminium, polymères, etc.) pour agglomérer les particules fines qui se décantent difficilement. Enfin, les boues secondaires ou biologiques sont obtenues après un traitement biologique (boues activées, biofiltration, etc.). Ces boues essentiellement organiques sont principalement composées de bactéries et de leurs métabolites extracellulaires. (Adjallé, 2010).

1.4.6.2.2 Pré-traitement des boues

Tel que vu précédemment, les boues d'épuration constituent un substrat potentiellement prometteur pour la production de protéases. Cependant, certaines caractéristiques des boues d'épuration limitent grandement leur potentiel à être employées comme milieu de culture en fermentation. En premier lieu, les boues d'épuration sont composées d'une grande diversité de sources de carbone et d'azote, simples et complexes, facilement et difficilement biodégradables (Tirado-Montiel *et al.*, 2001). La biodégradabilité est la qualité d'une substance pouvant être dégradée par des microorganismes ou des catalyseurs biologiques en molécules simples réduites ou oxydées. Le niveau de biodégradabilité dépend principalement de la taille des molécules. Ainsi, les molécules hautement ramifiées sont moins susceptibles à la dégradation que les molécules non ramifiées. Dans les boues d'épuration, une proportion importante des sources potentielles de nutriments est présente sous forme difficilement biodégradable, par exemple sous forme de microorganismes ou de débris cellulaires. Afin d'augmenter la quantité d'éléments nutritifs disponibles pour la bactérie, la concentration en matières en suspension (MES) des boues ne peut indéfiniment être augmentée, car des boues trop concentrées en MES présentent des caractéristiques trop contraignantes pour la fermentation (Drouin *et al.*, 2005). La dégradation des constituants des boues en éléments plus facilement attaquables par les cellules bactériennes est donc souhaitable. Par exemple, la lyse des cellules microbiennes et des débris cellulaires permet de libérer les produits intracellulaires qui peuvent par la suite être utilisés par les microorganismes producteurs de protéases lors de la fermentation (Barnabé, 2004; Barjenbruch et Kopplow, 2003; Mantzavinos et Psillakis 2004; Muller *et al.* 2004).

Également, le transfert de masse de l'oxygène entre les phases gaz-liquide est un facteur limitant pour les fermentations aérobies alors qu'il est essentiel à la formation des produits microbiens désirés. La viscosité d'un fluide influence grandement le transfert de l'oxygène qui y diffuse et plus la viscosité est élevée, plus le transfert d'oxygène devient difficile (Ozergin-Ulgen et Mavituna, 1998) : une viscosité du milieu plus faible permet à l'oxygène d'être distribuée plus facilement et de façon plus uniforme dans le milieu, sous forme de petites bulles d'air (Ozbek et Gayik, 2001). La plus faible vélocité de l'air associée à des bulles de petites tailles permet à l'oxygène de demeurer plus longtemps dans le milieu de fermentation, permettant une meilleure dissolution de l'oxygène dans le milieu. Les boues d'épuration sont souvent caractérisées par une viscosité élevée principalement causée par la présence de polymères extracellulaires complexes, sans compter la présence fréquente de polymères ajoutés au cours des processus d'épuration des eaux afin de favoriser la floculation et la déshydratation des boues. La viscosité élevée des boues limite grandement le transfert d'oxygène pendant les fermentations. De plus, les boues d'épuration sont constituées de nombreux floes dans lesquels les cellules bactériennes tendent à s'incruster afin d'en soutirer les nutriments. Cette situation peut rendre difficile le transfert de l'oxygène vers ces cellules (Brar *et al.*, 2005). Le bris ou solubilisation de ces polymères extracellulaires et des floes peut donc permettre de diminuer la viscosité des boues et de favoriser un meilleur transfert d'oxygène lors des fermentations.

Barnabé (2004) a exploré l'application d'un pré-traitement physico-chimique des boues pour accroître la biodisponibilité des éléments nutritifs et accroître le rendement de la bactérie *B. thuringiensis* en termes de cellules, de spores et de toxines insecticides. Plusieurs type de pré-traitements ont été étudiés et l'hydrolyse thermo-alcaline s'est avérée la plus efficace. Il a en outre été démontré que l'hydrolyse des boues à température et pH élevés permet de dégrader les molécules complexes en molécules plus simples, ce qui améliore la biodisponibilité des nutriments pour la bactérie, et diminue la viscosité des boues, permettant ainsi un meilleur transfert d'oxygène dans le milieu, le tout permettant une meilleure croissance de la bactérie et une plus forte production de produits entomotoxiques (Barnabé *et al.*, 2004; Yezza *et al.*, 2005a).

1.4.7 Influence des paramètres opérationnels

1.4.7.1 pH

Le pH est un facteur important qui influence la croissance des microorganismes en affectant fortement les procédés enzymatiques et le transport des divers composants à travers les membranes cellulaires (Kumar et Takagi, 1999). Le pH a également une forte influence sur la production de protéases, affectant les mécanismes de régulation métabolique chez *B. licheniformis* (Calik *et al.*, 2002; Hornbaek *et al.*, 2004). Dans plusieurs études, le pH est contrôlé et maintenu constant durant la culture microbienne (Kumar et Takagi, 1999). À l’opposé, Hameed *et al.* (1999) et Calik *et al.* (2002) ont obtenu des productions de protéases maximales par *B. subtilis* et *B. licheniformis* lorsque le pH est demeuré incontrôlé durant la fermentation. Par contre, certains auteurs rapportent que des variations importantes de pH au cours de la fermentation peuvent mener à la désactivation des protéases excrétées dans le milieu (Kumar et Takagi, 1999).

Également, pouvant être source d’éléments assimilables par les cellules bactériennes, les agents acides et alcalins employés pour le contrôle du pH modifient la composition du milieu, et peuvent donc avoir un effet important sur les rendements du procédé de fermentation. Ainsi, au cours de travaux portant sur la production de bioinsecticide à base de *Bacillus thuringiensis* dans les boues d’épuration, Yezza *et al.* (2005b) ont démontré que l’emploi de l’hydroxyde d’ammonium, (source d’ion ammonium) et de l’acide acétique (source de carbone facilement assimilable) en remplacement de l’hydroxyde de sodium et de l’acide sulfurique pour le contrôle du pH a eu pour effet de stimuler la production d’endotoxines pendant la fermentation.

1.4.7.2 Aération et agitation

1.4.7.2.1 Agitation

Une agitation adéquate pendant la fermentation est nécessaire afin d’assurer un environnement nutritionnel et physique homogène pour toutes les cellules. Un tel environnement est indispensable pour une production maximale de protéases (Calik *et al.*, 2000a). Cependant, le maintien d’une agitation trop vigoureuse augmente les forces de cisaillement dans le milieu de

culture, pouvant mener à la dénaturation des protéases excrétées à l'extérieur de la cellule bactérienne (Calik *et al.*, 2000a; Hameed *et al.*, 1999; Kumar et Parrack, 2003).

1.4.7.2.2 Transfert d'oxygène

L'aération et l'agitation influent aussi grandement sur le transfert d'oxygène. En fermenteur, l'oxygène est habituellement fourni au milieu de fermentation en expulsant des bulles d'air sous des chicanes dans un fermenteur agité. Lors de la fermentation, le transfert d'oxygène varie avec l'intensité de l'agitation, le taux d'aération, la dimension et les caractéristiques hydrodynamiques (formation, bris, coalescence) des bulles d'air, la surface de l'interface gaz-liquide, la rhéologie du milieu de fermentation (densité, viscosité) ainsi que la géométrie du système (type et position du dispositif d'aération, nombre et position des pales et chicanes, volume du bioréacteur, etc.) (Barnabé, 2004).

Au cours des fermentations aérobies, le transfert de l'oxygène dans les cellules microbiennes affecte considérablement la formation des bioproduits en influençant les flux métaboliques dans la cellule (Calik *et al.*, 1999). L'aération et l'agitation doivent donc être contrôlées afin d'assurer un transfert d'oxygène optimal pour la production de protéases : Calik *et al.* (2000a et 2004a), Hameed *et al.* (1999) et Potumarthi *et al.* (2007) ont démontré que l'optimisation des conditions de transfert d'oxygène permet d'augmenter de façon importante la quantité de protéases produites par *B. licheniformis* et *B. subtilis* en milieu synthétique. Lors de fermentation effectuées dans les boues d'épuration municipales pour la production de bioinsecticide à base de *B. thuringiensis*, il a été démontré que le transfert d'oxygène est un paramètre qui affecte grandement les rendements de production du procédé (Yezza *et al.*, 2004).

1.4.7.2.3 Formation de mousse

La formation de mousse est un phénomène normal lors de fermentations où de l'oxygène est injecté dans le milieu de culture. La mousse est généralement abondante lors de fermentations avec des boues d'épuration municipales. Le phénomène est particulièrement intense lors de l'emploi de taux d'aération et d'agitation élevés (Drouin *et al.*, 2005). Ceci peut être attribué au fait que de nombreux composés contenu dans les boues, comme des polymères extracellulaires, des hydrates de carbone et des protéines, sont reconnus pour contribuer à la formation de mousse (Calik *et al.*, 2005; Pelton, 2002). Également, certains pré-traitements des boues, comme

l'hydrolyse alcaline, peuvent contribuer à libérer des polymères extracellulaires et des protéines, ce qui peut accentuer le problème de formation de mousse (Barnabé, 2004).

La présence abondante de mousse peut devenir problématique lorsqu'elle obstrue la sortie des gaz du fermenteur. De plus, la pénétration de la mousse dans les injecteurs d'acide, de base, d'anti-mousse chimique et dans la sortie des gaz, tous situés dans la partie supérieure du fermenteur, peut mener à des problèmes de contamination ultérieurs (Calik *et al.*, 2005). Également, des nutriments et des métabolites d'intérêts peuvent s'adsorber sur la mousse, ce qui peut affecter négativement les rendements obtenus lors des fermentations.

Outre l'utilisation d'un brise-mousse mécanique, différents agents chimiques anti-mousse sont souvent utilisés pour contrôler la formation de mousse durant la fermentation. Cependant, l'ajout d'anti-mousse chimique peut inhiber la croissance bactérienne et nuire au transfert de l'oxygène à l'interface gaz-liquide pendant la fermentation (Huang *et al.*, 2001). Une bonne stratégie d'aération et d'agitation au cours de la fermentation est donc primordiale afin de minimiser la formation de mousse.

1.5 HYPOTHÈSES, OBJECTIFS ET ORIGINALITÉ

Le développement d'un procédé de production de protéases à partir des boues d'épuration est un concept intéressant puisqu'un tel procédé permettrait d'abaisser les coûts de production des protéases. De plus, ce même procédé constituerait une façon innovatrice de réutiliser les boues d'épuration, permettant de diversifier les filières de revalorisation, tout en générant des revenus par la vente des enzymes. Les travaux réalisés jusqu'ici ont démontré que les boues d'épuration municipales représentent un substrat bon marché, riche en éléments nutritifs et supportant la production de protéases. Toutefois, afin de mettre au point un procédé de production performant, de nombreux éléments doivent encore être étudiés et optimisés.

Le but de ce travail consiste donc à améliorer les performances du procédé, d'une part en améliorant les caractéristiques et la composition des boues, et d'autre part, en développant des stratégies de gestion efficaces des paramètres opérationnels durant la fermentation, le tout afin d'augmenter les rendements de production de protéases.

1.5.1 Hypothèses de recherche

Compte tenu des problématiques spécifiques liées à ce projet et des éléments retrouvés dans la revue de littérature, les hypothèses suivantes peuvent être posées :

1.5.1.1 Hypothèse 1

Tel que mentionné à la section 1.4.6.2, une proportion importante des sources de nutriment des boues d'épuration est constituée de matériel difficilement biodégradable (Tirado-Montiel *et al.*, 2001). De plus, les caractéristiques des boues d'épuration rendent difficile le transfert d'oxygène pendant la fermentation (Brar *et al.*, 2005). Barnabé (2004) ayant démontré que l'hydrolyse thermo-alcaline permet d'améliorer la biodégradabilité des boues et d'améliorer la capacité de transfert d'oxygène durant la fermentation, deux paramètres pouvant influencer sur la croissance bactérienne et la production de protéases, nous amène donc à émettre une première hypothèse :

Hypothèse 1. *L'emploi de boues hydrolysées ou d'un mélange de boues hydrolysées et non hydrolysées comme milieu de fermentation devrait permettre une augmentation de la production de protéases pendant la fermentation.*

1.5.1.2 Hypothèse 2

Également mentionné à la section 1.4.6.2, les procédés de traitement des eaux peuvent nécessiter l'ajout de différents composés (ex :alun, chlorure ferrique, polymères) afin de favoriser la floculation des particules ou encore afin de favoriser l'enlèvement de certains éléments. Ainsi, l'ajout de polymères et d'alun pour aider à la floculation/décantation des boues a pour effet de modifier la composition des boues. De plus, la modification des caractéristiques des boues (formation de flocs et augmentation de la viscosité), suite à l'ajout de ces composés, peut avoir un impact négatif sur les capacités de transfert d'oxygène pendant la fermentation. De la même façon, l'ajout de chlorure ferrique afin de favoriser la décantation du phosphore dans les boues a aussi pour effet de modifier la composition des boues.

Ayant été rapporté dans la littérature que le phosphore a une influence sur la production de protéases (voir section 1.4.6.1.3), alors que l'effet de la présence des autres éléments n'a pas été rapporté, nous amène donc à une deuxième hypothèse :

Hypothèse 2. *La présence d'alun, de polymères ou de chlorure ferrique dans les boues à pour effet de modifier la composition et les propriétés des boues, ce qui pourrait avoir un effet sur la production de protéases lorsque ces boues sont employées comme milieu de fermentation.*

1.5.1.3 Hypothèse 3

L'influence des paramètres opérationnels a été fréquemment rapportée dans la littérature. Ainsi, une agitation adéquate pendant la fermentation est nécessaire afin d'assurer un environnement nutritionnel et physique homogène pour toutes les cellules. De plus, l'aération et l'agitation influent sur les conditions de transfert d'oxygène, un paramètre clé pour la croissance cellulaire et la production de protéases (voir section 1.4.7.2). Le maintien de l'agitation et de l'aération à des niveaux suffisamment élevés est donc souhaitable de façon à ne pas tomber en conditions limitantes. À l'opposé, le maintien d'une agitation/aération inutilement vigoureuse a pour effet d'aggraver le problème de formation de mousse, ce qui peut s'avérer problématique pour la production de protéases (voir section 1.4.7.2.3).

Le pH est aussi un facteur important qui influence la croissance des microorganismes et la production de protéases. Jusqu'à maintenant, pour la majorité des essais de production de protéases menés dans les boues d'épuration, le pH a été maintenu constant. Cependant, des

informations contradictoires sont retrouvées dans la littérature sur la nécessité ou non de contrôler le pH durant la fermentation (voir section 1.4.7.1).

De plus, si des conditions contrôlées de pH sont souhaitables, les agents acides et alcalins employés pour le contrôle du pH modifient la composition du milieu, ce qui peut avoir un effet important sur les rendements des procédés de fermentation (tel que discuté à la section 1.4.7.1). Ainsi, NaOH et H₂SO₄, agents de contrôle du pH fréquemment utilisés, constituent respectivement des sources d'ions sodium Na⁺ et SO₄²⁻, et peuvent donc influencer sur la production de protéases (voir section 1.4.6.1.3). Autre agent de contrôle du pH potentiel, l'hydroxyde d'ammonium constitue une source d'azote inorganique facilement assimilable (ion ammonium), et l'information retrouvée dans la littérature concernant l'effet de l'ammonium sur la production de protéases (section 1.4.6.1.2) est parfois contradictoire et ne permet donc pas de prédire quel pourrait en être l'effet sur la production de protéases dans les boues. Il en va de même pour l'emploi de l'acide acétique qui peut constituer une source de carbone facilement assimilable par les cellules bactériennes (section 1.4.6.1.1). La stratégie de gestion du pH aura donc pour effet d'influencer les performances du procédé.

Donc, en tenant compte de tous ces éléments, il est justifié de penser que :

Hypothèse 3. *Le développement de stratégies efficaces de contrôle des paramètres d'agitation, d'aération et de pH pendant la fermentation devrait permettre une augmentation de la production de protéases.*

1.5.2 Objectifs de recherche

En tenant compte des hypothèses ci-dessus et de la synthèse bibliographique, les objectifs spécifiques de ces travaux de recherche sont les suivants :

1. Évaluer l'effet sur la production de protéases d'un pré-traitement d'hydrolyse thermo-alcaline des boues, en comparant les résultats obtenus dans les boues hydrolysées et dans les boues n'ayant pas subi d'hydrolyse.
2. Évaluer le potentiel de mélanges de boues hydrolysées et non hydrolysées à différents ratios comme milieu de culture pour la production de protéases.

3. Étudier l'effet sur la production de protéases, de l'ajout de différents composés (alun, polymères, chlorure ferrique) aux boues au cours des procédés de traitement des eaux.
4. Comparer des conditions de pH contrôlé et non-contrôlé pour la production de protéases dans les boues d'épuration.
5. Évaluer l'effet sur la production de protéases de différents agents de contrôle de pH.
6. Évaluer l'effet de différentes conditions de transfert d'oxygène sur la production de protéases dans les boues afin de mettre au point une stratégie de gestion des paramètres d'agitation et d'aération adaptée au boues d'épuration et stimulant la production de protéases.

1.5.3 Originalité de la recherche

La production de protéases par de nombreux microorganismes, tels *B. licheniformis*, est généralement bien documentée dans la littérature. Ainsi les effets de la composition des milieux de production et des paramètres opérationnels sur la production de protéases ont été abondamment décrits. Cependant, de telles études ont toujours eu cours en milieu synthétique dont la composition est généralement bien définie. L'idée de mettre à profit le potentiel nutritif des boues d'épuration pour la production de protéases en les employant comme milieu de fermentation constitue une idée novatrice. Cependant, le développement d'un tel procédé constitue un défi car les boues d'épuration, de par leur composition et leurs caractéristiques, constituent un milieu de culture peu comparable avec les milieux synthétiques habituellement employés.

L'amélioration des caractéristiques des boues et le développement de stratégies de gestion des paramètres opérationnels tenant compte des caractéristiques propres aux boues d'épuration contribuera à la mise au point d'un procédé de production de protéases avant-gardiste, efficace et peu coûteux à partir d'une ressource abondante et universellement disponible. Le développement d'un tel procédé contribuera également à l'essor d'une nouvelle avenue novatrice de revalorisation des eaux usées et des boues d'épuration.

1.6 DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE

Un survol de la méthodologie employée pour l'atteinte des objectifs spécifiques est présenté dans la présente section. Les démarches méthodologiques détaillées sont présentées dans les différents chapitres relatifs à ces objectifs : les parties I et II du chapitre 2 portent sur le pré-traitement des boues (Objectifs 1, 2). Les Parties I (Objectifs 4, 5) et II (Objectif 6) du chapitre 3 concernent l'étude des paramètres opérationnels, alors que le chapitre 4 porte sur l'influence des procédés de traitement des eaux (Objectif 3).

1.6.1 Provenance et échantillonnage des boues.

Les travaux ont été effectués avec des boues provenant des stations d'épuration de la ville de Québec (Station-est) et de la ville de Victoriaville. La station de la ville de Québec utilise un procédé de biofiltration comme traitement secondaire de ses eaux usées. Les boues secondaires utilisées lors de cette étude sont produites par la décantation des eaux de lavage des biofiltres. La station d'épuration de la ville de Victoriaville utilise un procédé à boues activées comme seul traitement. Les boues échantillonnées à cette station sont produites par la décantation de la liqueur mixte provenant des bassins de boues activées.

La concentration en matières en suspension (MES) des boues échantillonnées aux deux stations est normalement faible (2 à 8 g/L de MES). Pour les différentes expériences à effectuer, il est nécessaire d'augmenter considérablement la concentration des boues (20-50 g/L de MES). Une étape de décantation est donc nécessaire et permet généralement d'atteindre des concentrations en MES de 35-40 g/L. Pour atteindre des concentrations en MES plus élevées, une étape de centrifugation des boues est aussi nécessaire en aval de la décantation. Les boues échantillonnées sont conservées à 4°C, et préalablement stérilisées avant d'être employées pour la fermentation.

1.6.2 Souche microbienne employée

La souche microbienne employée pour toutes les expériences est *Bacillus licheniformis* ATCC 21424. La procédure de préparation des inoculums pour les fermentations est celle qui a été développée lors de travaux précédents (Drouin *et al.*, 2005)

1.6.3 Étude d'un pré-traitement d'hydrolyse thermo-alkaline des boues visant à améliorer les caractéristiques des boues pour la production de protéases

Des boues d'épuration de la ville de Québec ont été échantillonnées et soumises à différents pré-traitements :

Boues brutes (RAW): les boues ont été décantées afin d'en augmenter la concentration en matières à suspension (MES).

Hydrolyse thermo-alkaline (TAH): les boues ont été concentrées par centrifugation. Le pH des boues a été augmenté à 10 à l'aide d'hydroxyde de sodium concentré (10N). Le pré-traitement (140 °C , 30 min) a été réalisé dans un hydrolyseur d'une capacité de 10L muni d'un agitateur. L'apport de chaleur nécessaire au pré-traitement a été assuré par injection directe de vapeur pressurisée dans les boues.

Mélange de boues brutes et hydrolysées (MIX): trois différents mélanges de boues ont été préparés : un premier mélange contenant 50 % de boues brutes et 50 % de boues hydrolysées, un deuxième contenant 75 % de boues brutes et 25 % de boues hydrolysées, et un troisième contenant 25 % de boues brutes et 75 % de boues hydrolysées.

Hydrolyse in-situ (ISH): les boues ont été concentrées par décantation et le pH des boues a été augmenté à 10 à l'aide d'hydroxyde de sodium concentré (10N). Les boues ont par la suite été stérilisées en fermenteur à 121°C pendant 30 minutes. Ce pré-traitement a donc consisté à combiner l'hydrolyse et la stérilisation des boues en une seule étape.

Les différents échantillons de boues préparés (35 g MES/L) ont été utilisés comme milieu de culture lors de fermentations effectuées en bioréacteur de 15L. Des échantillons ont été retirés à intervalles réguliers pendant les fermentations pour effectuer les analyses concernant les paramètres suivants : croissance (cellules, spores) et production de protéases alcalines (activités protéolytiques (U.I./mL), activités protéolytiques cellulaires spécifiques (U.I./ 10⁹ cellules)). Également, les paramètres additionnels suivants ont été mesurés lors de certaines expériences : coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (k_1a), taux de transfert d'oxygène (OTR), taux de consommation d'oxygène (OUR), évolution de la viscosité des boues et de la demande chimique

en oxygène de la fraction soluble des boues (DCO_{soluble}). Des essais de désorption de protéases de la fraction solide des boues à l'aide de différents tampons (4, 6, 8.2, 10) ont aussi été réalisés.

1.6.4 Comparaison de boues d'épuration issues de différents procédés de traitement des eaux pour la production de protéases

En premier lieu, des boues d'épuration de la ville de Québec ont été recueillies. Les boues secondaires de la ville de Québec sont produites à partir des eaux de lavage des biofiltres : de l'alun et un polymère de nature anionique sont ajoutés aux eaux de lavages afin de favoriser une floculation rapide et efficace des matières en suspension, et les eaux de lavages sont par la suite acheminées vers deux décanteurs. Des boues d'épuration ont été échantillonnées à deux endroits différents:

1. À la sortie des biofiltres en lavages (boues ne contenant pas d'alun et de polymères).
2. À la base des décanteurs secondaires (boues contenant de l'alun et des polymères).

En second lieu, des boues d'épuration de la ville de Victoriaville ont été recueillies. La ville de Victoriaville utilise un procédé à boues activées pour traiter ces eaux usées. À l'extrémité des bassins de boues activées : du chlorure ferrique est ajoutée à la liqueur mixte sortant des bassins de boues activées (dosage moyen de 14,4 mg Fe /L d'affluent) afin de favoriser la précipitation du phosphore. La liqueur mixte est par la suite acheminée vers deux décanteurs. Des boues d'épuration ont été échantillonnées à deux endroits différents :

3. À la sortie des bassins de boues activées, en amont du point d'injection de chlorure ferrique.
4. À la base des décanteurs secondaires (en aval du point d'injection de chlorure ferrique).

Les différents échantillons de boues (20 g MES/L) ont été par la suite utilisés comme milieu de culture lors de fermentations effectuées en bioréacteur de 7,5 L. Des échantillons ont été retirés à intervalles réguliers pendant les fermentations pour effectuer les analyses concernant les paramètres suivants : croissance (cellules, spores), production de protéases alcalines (activités protéolytiques (U.I./mL), activités protéolytiques cellulaires spécifiques (U.I./ 10^9 cellules)) et évolution de la viscosité des milieux de fermentation.

1.6.5 Fortification en nutriments des boues d'épuration par l'emploi de différents agents de contrôle de pH afin de stimuler la production de protéases

Des boues d'épuration de la ville de Québec (35g MES/ L) ont été utilisées comme milieux de culture pour cette série de fermentations effectuées en bioréacteurs de 7,5 et 15 L. Deux fermentations ont d'abord été menées pour comparer des conditions de pH contrôlé (pH maintenu à 7,5 pendant la fermentation) et non-contrôlé pour la production de protéases dans les boues brutes (*RAW*). Par la suite, trois combinaisons d'agents de contrôle du pH soit NaOH/H₂SO₄ (agents conventionnels de contrôle du pH), NH₄OH/H₂SO₄ et NH₄OH/CH₃COOH ont été utilisées pour maintenir le pH à 7,5 dans les boues brutes (*RAW*). Deux combinaisons d'agents de contrôle du pH (NaOH/H₂SO₄ et NH₄OH/H₂SO₄) ont également été utilisées pour maintenir le pH dans des boues constituées d'un mélange de 75 % de boues brutes et 25 % de boues hydrolysées (*MIX*). Des échantillons ont été retirés à intervalles réguliers pendant les fermentations pour effectuer les analyses concernant les paramètres suivants : croissance (cellules, spores, %sporulation) et production de protéases alcalines (activités protéolytiques (U.I./mL), activités protéolytiques cellulaires spécifiques (U.I./ 10⁹ cellules)).

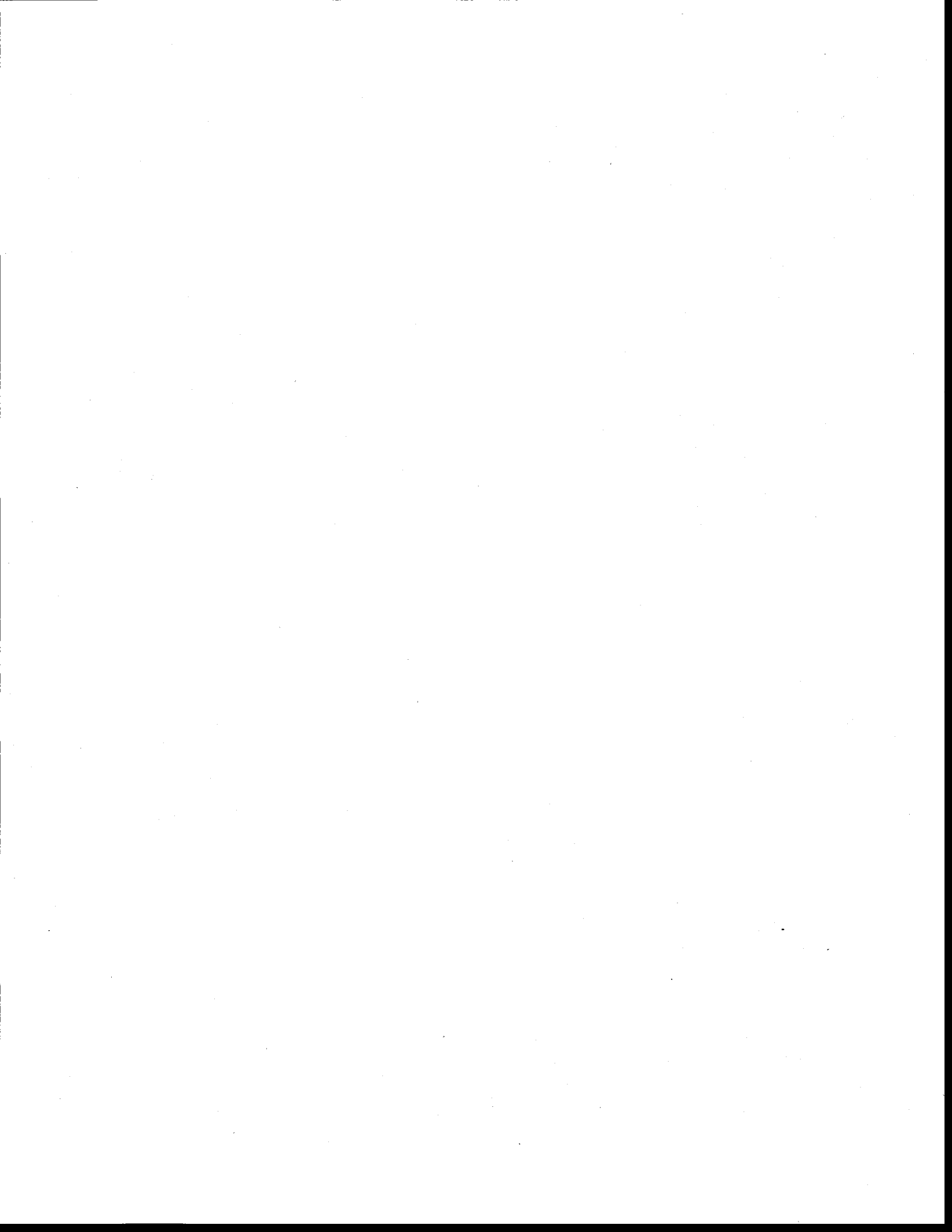
1.6.6 Évaluation de l'effet des conditions de transfert d'oxygène sur la production de protéases

Des boues d'épuration de la ville de Québec (35 g MES/ L) n'ayant pas subi de pré-traitement hydrolytique (boues *RAW*) ont été utilisées comme milieux de culture pour cette série de fermentations. Des fermentations ont été effectuées en fermenteurs de 7,5 L en maintenant des taux d'aération et d'agitation constants tout au long de la fermentation, correspondant à des conditions de transfert d'oxygène faible, moyenne et élevée. En parallèle, des fermentations ont été effectuées en bioréacteurs de 15 L en utilisant des taux d'aération d'agitation variables pendant la fermentation. Les conditions employées lors des diverses fermentations sont décrites dans le tableau suivant.

Tableau 4 Taux d'aération et d'agitation employés lors des fermentations visant à évaluer l'effet des conditions de transfert d'oxygène sur la production de protéases

Expériences	Bioréacteur	Taux d'aération (L/min)	Taux d'agitation (rpm)
LOT (<i>"Low Oxygen Transfer conditions"</i>)	7,5 L	2,5	300
MOT (<i>"Medium Oxygen Transfer conditions"</i>)	7,5 L	3,0	500
HOT (<i>"High Oxygen Transfer conditions"</i>)	7,5 L	4,0	650
MOT/LOT (<i>"Medium/High Oxygen Transfer conditions"</i>)	7,5 L	3,0/3,5	500/600
VOT (<i>"Variable Oxygen Transfer Conditions"</i>)	15 L	variable	variable

Des échantillons ont été retirés à intervalles réguliers pendant les fermentations pour effectuer les analyses concernant les paramètres suivants : croissance (cellules, spores, % sporulation), production de protéases alcalines (activités protéolytiques (U.I./mL), activités protéolytiques cellulaires spécifiques (U.I./ 10⁹ cellules)). Également, les paramètres suivants ont été mesurés lors des fermentations : coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (k_La), taux de transfert d'oxygène (OTR), taux de consommation d'oxygène (OUR).



1.7 RÉSULTATS

1.7.1 Étude d'un pré-traitement d'hydrolyse thermo-alkaline des boues visant à améliorer les caractéristiques des boues pour la production de protéases

1.7.1.1 Effet du pré-traitement d'hydrolyse thermo-alkaline sur la production de protéases

Au cours d'une première série d'expériences, les activités protéolytiques obtenues ont été plus faibles dans les boues *TAH* (9,8 U.I./mL) que dans les boues *RAW* (10,4 U.I./mL). La modification des caractéristiques chimiques et physiques des boues pendant l'hydrolyse thermo-alkaline résulte en une diminution de la viscosité des boues. Cependant, la formation de quantités considérables de mousse durant la fermentation dans les boues *TAH* a obligé l'ajout fréquent de (poly)propylène glycol (PPG : agent anti-mousse chimique). L'emploi de PPG en grande quantité a eu pour effet d'augmenter la viscosité du milieu, qui est donc demeurée considérablement plus élevée dans les boues *TAH* que dans les boues *RAW* tout au long de la fermentation. Les plus faibles activités protéolytiques obtenues dans les boues *TAH* ont d'abord été attribuées à la diminution de la capacité de transfert d'oxygène du milieu causée par la viscosité plus élevée du milieu de fermentation.

Les mêmes fermentations ont été reprises au cours d'une deuxième série d'expériences : cependant le volume de boues employées a été diminué (de 10 à 8,5L) de façon à allouer plus d'espace pour la formation de mousse et un brise-mousse mécanique a été employé pour contrôler la mousse, ce qui a permis de limiter l'ajout de PPG aux boues pendant la fermentation. Ainsi, la viscosité est demeurée considérablement moins élevée tout au long de la fermentation dans les boues *TAH* que dans les boues *RAW*, permettant d'atteindre des valeurs de $K_L a$ plus élevées dans les boues *TAH*. Ainsi, les meilleures capacités de transfert d'oxygène du milieu ont pu contribuer à l'obtention de comptes de cellules plus élevés dans les boues *TAH*. Cependant, les activités protéolytiques mesurées dans les boues *TAH* (5,43 U.I./mL) ont été à nouveau plus faibles que dans les boues *RAW* (10,31 U.I./mL). Les boues contiennent une grande variété de sources de nutriments et il a été déterminé que dans les boues *RAW*, les substrats facilement assimilables ont

été consommés pendant la phase de croissance et la présence de concentrations élevées de substrats complexes a stimulé la production de protéases pendant la phase de production (phase stationnaire). Dans le cas des boues *TAH*, les substrats complexes des boues ont été dégradés en substrats simples durant le pré-traitement d'hydrolyse et la présence de substrats simples pendant la phase de production a eu un effet inhibiteur sur la production de protéases : l'activité protéolytique cellulaire spécifique obtenue a ainsi été considérablement plus faible dans les boues *TAH* (0,83 U.I./10⁹ cellules) que dans les boues *RAW* (4,15 U.I./10⁹ cellules). Ces résultats ont donc démontré que l'emploi de boues *TAH* n'est pas souhaitable pour la production de protéases.

Les boues hydrolysées *in-situ* (boues *ISH*) ont permis d'obtenir des activités protéolytiques (11,5 U.I./mL) légèrement supérieures à celles obtenues dans les boues *RAW*. L'hydrolyse *in-situ* consiste en un pré-traitement aux conditions moins agressives (température moins élevée) que celles auxquelles les boues *TAH* ont été soumises. L'hydrolyse *in-situ* pourrait avoir permis l'hydrolyse de substrats non-biodégradables présents dans les boues en substrats plus facilement biodégradables. Ce phénomène, combiné à la viscosité plus faible des boues *ISH* permettant un meilleur transfert d'oxygène, expliquerait les activités protéolytiques légèrement plus élevées obtenues.

1.7.1.2 Emploi de différents mélanges de boues hydrolysées et non-hydrolysées sur la production de protéases

Parmi les différents ratios de boues brutes et hydrolysées investigués, l'utilisation d'un milieu de culture composé à 75% de boues brutes et à 25% de boues hydrolysées (boues *MIX 1*) a permis une importante augmentation (78%) de l'activité protéolytique par rapport aux boues *RAW*. Il a été déterminé que les substrats facilement assimilables composant la fraction hydrolysée des boues ont stimulé la croissance cellulaire, permettant d'obtenir des concentrations en cellules élevées à la fin de la phase de croissance, alors que la présence de substrats complexes provenant de la fraction non-hydrolysée des boues a stimulé la production de protéases pendant la phase de production. Ainsi, une concentration en cellules élevée associée à une activité protéolytique cellulaire spécifique (U.I./10⁹ cellules) élevée explique l'augmentation des activités protéolytiques obtenues.

1.7.1.3 Désorption des protéases de la fraction solide des boues

À la fin de la fermentation, le bouillon de fermentation est centrifugé et les protéases sont récupérées dans les surnageants. Les résultats ont démontré qu'une fraction des enzymes demeure adsorbée sur la fraction solide des boues et n'est pas récupérée dans le surnageant. Des essais de désorption sur la fraction solide ont été menés à l'aide de tampons de différents pH. Parmi tous les tampons utilisés, les enzymes récupérées de la phase solide à l'aide d'un tampon pH 10 ont générées le maximum d'activité protéolytique, autant dans les boues *RAW* (34,70 U.I./g MES) que dans les boues *MIX 1* (42,38 U.I./g MES). Ces résultats ont démontré que l'ajout d'une étape de désorption des protéases de la phase solide avant la récolte du surnageant est souhaitable.

1.7.1.4 Caractéristiques des protéases produites dans les boues hydrolysées et non-hydrolysées

Les profils d'activité protéolytique en fonction du pH et de la température ont été déterminés pour les protéases produites dans les boues *RAW* et *TAH*. Les profils similaires obtenus dans les deux milieux suggèrent fortement que *B. licheniformis* produit des protéases aux caractéristiques semblables dans les boues *RAW* et *TAH*. Dans les deux milieux, les activités protéolytiques maximales ont été obtenues à pH 10 et à T 55°C. Les protéases demeurent cependant actives à plus haute température (65°C).

1.7.1.5 Diminution du volume de boues résiduelles

Les résultats ont démontré que la fermentation des boues pour la production de protéases permet une diminution importante du volume de boues à disposer. En effet, alors que la concentration en MES a été initialement ajustée à 35 g/L, les concentrations en MES mesurées à la fin des fermentations dans les boues *RAW* et *MIX 1* étaient considérablement moins élevées (21,6 et 22,3 g/L respectivement).

1.7.2 Comparaison de boues d'épuration issues de deux procédés de traitement des eaux pour la production de protéases

Dans les boues provenant de la ville de Québec, les nombres de cellules ($2,07 \times 10^9$ UFC/ml), de spores ($2,33 \times 10^8$ UFC/ml), et l'activité protéolytique (8,18 U.I./ml) obtenus dans les boues

contenant de l'alun et du polymère ont été supérieurs aux valeurs équivalentes mesurées dans les eaux de lavage ne contenant pas d'alun et de polymère ($1,85 \times 10^9$ UFC/ml, $1,03 \times 10^8$ UFC/ml and 7,05 U.I./ml, respectivement). L'ajout d'alun et de polymère aux eaux de lavages permet une meilleure décantation des matières colloïdales. Ces particules ont donc pu constituer une source de nutriments facilement assimilables ayant stimulé la croissance bactérienne. Ainsi, les activités protéolytiques plus élevées obtenues dans les boues contenant de l'alun et du polymère ont été attribuées au plus grand nombre de cellules obtenues, les activités protéolytiques cellulaires spécifiques (U.I./ 10^9 cellules) obtenues dans les deux milieux étant similaires.

Dans les boues provenant de la ville de Victoriaville, les nombres de cellules ($3,06 \times 10^9$ UFC/ml), de spores ($8,36 \times 10^7$ UFC/ml), et l'activité protéolytique (12,12 U.I./ml) mesurés dans les boues contenant du FeCl_3 ont été similaires aux valeurs équivalentes mesurées dans la liqueur mixte ne contenant pas de FeCl_3 ($2,98 \times 10^9$ UFC/ml, $9,44 \times 10^7$ UFC/ml and 11,31 U.I./ml, respectivement). Les résultats ont donc démontré que l'ajout de FeCl_3 aux boues ne semble pas affecter la production de protéases lorsque ces boues sont employées comme milieu de culture.

Les expériences avec les boues de la ville de Québec et de Victoriaville ont été répétées à plusieurs reprises en employant les mêmes conditions pendant la fermentation. La compilation des résultats a démontré que les activités protéolytiques obtenues dans les boues de la ville de Québec ont été plutôt constantes d'un échantillon de boue à l'autre (-6% à +9%), alors que les activités protéolytiques obtenues dans les différents échantillons de boues de la ville de Victoriaville ont présenté d'importantes variations (-22% à +32%).

1.7.3 Effet des paramètres opérationnels

1.7.3.1 Effet de différentes stratégies de contrôle du pH sur la production de protéases

1.7.3.1.1 Conditions de pH non-contrôlé

Les conditions de pH non-contrôlé ont eu un effet négatif sur les performances du procédé: les nombres de cellules ($6,43 \times 10^8$ UFC/mL), de spores ($3,99 \times 10^7$ UFC/mL) et l'activité protéolytique (3,16 U.I./mL) obtenus en conditions de pH non contrôlé ont été considérablement

moins élevés que les valeurs équivalentes obtenues en conditions de pH contrôlé ($1,67 \times 10^9$ UFC/mL, $1,01 \times 10^8$ UFC/mL et 10,12 U.I./mL, respectivement).

Les importantes fluctuations de pH observées pendant la fermentation en conditions de pH non-contrôlé ont pu affecter le métabolisme cellulaire de *B. licheniformis*, expliquant les faibles concentrations en cellules, spores et activités protéolytiques obtenues.

1.7.3.1.2 Évaluation de l'effet de différents agents pour le contrôle du pH

Dans les boues *RAW*, l'emploi de NH_4OH en remplacement de NaOH pour le contrôle du pH a démontré que l'ajout d'une source d'azote inorganique facilement assimilable (NH_4^+) pendant les premières heures (de T-0h à T-12h) de la fermentation permet de stimuler la croissance de *B. licheniformis* sans affecter la production de protéases : les concentrations en cellules et spores obtenues ont été plus importantes avec l'emploi de la combinaison $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ qu'avec la combinaison $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$, alors que les activités protéolytiques cellulaires spécifiques (U.I./ 10^9 cellules) obtenues ont été similaires pour les deux combinaisons. Ainsi, l'emploi de NH_4OH en remplacement de NaOH a permis une augmentation de 52% de l'activité protéolytique. À l'opposé, les plus faibles activités protéolytiques obtenues (-63%) avec l'emploi de CH_3COOH en remplacement de H_2SO_4 ont démontré que l'ajout d'une source de carbone facilement assimilable (CH_3COO^-) pendant la phase de production (T-12h à T-48h) a un effet inhibiteur considérable sur la production de protéases. Ainsi, les résultats ont démontré que NH_4OH et H_2SO_4 constituent la combinaison d'agents de contrôle de pH la plus appropriée pour la production de protéases dans les boues *RAW*.

Dans les boues *MIX*, les concentrations en cellules et spores obtenues ont été plus importantes avec l'emploi de la combinaison $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ qu'avec la combinaison $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$, alors que les activités protéolytiques cellulaires spécifiques (U.I./ 10^9 cellules) obtenues ont été similaires pour les deux combinaisons. La combinaison $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ a ainsi permis d'atteindre des activités protéolytiques 76% plus élevée que la combinaison $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$. Suivant ces résultats, il a été proposé que l'ajout d'ions NH_4^+ aux boues *MIX* durant les premières heures de la fermentation ait augmenté davantage la concentration en source d'azote facilement assimilable déjà élevée au départ. La présence en excès d'azote facilement assimilable a donc limité la croissance cellulaire. Ainsi, NaOH et H_2SO_4 ont été les agents les plus appropriés pour le contrôle du pH dans les boues *MIX*.

1.7.3.2 Effet des conditions de transfert d'oxygène sur la production de protéases

Les résultats ont démontré que la production de protéases est grandement stimulée lorsque des conditions de transfert d'oxygène élevées sont maintenues tout au long de la fermentation: de toutes les conditions utilisées, les activités protéolytiques cellulaires spécifiques (U.I./10⁹ cellules) les plus élevées ont été obtenues en conditions *HOT*. Cependant, les taux d'agitation et d'aération élevés employés ont favorisé la formation de mousse en quantités excessives, rendant celle-ci difficile à contrôler et obligeant l'ajout d'une grande quantité de PPG, particulièrement pendant la phase de croissance. Et malgré les activités protéolytiques cellulaires spécifiques (U.I./10⁹ cellules) élevées, les faibles concentrations de cellules obtenues ont résulté en des activités protéolytiques peu élevées (7,75 U.I./mL). Sous les conditions *LOT*, la concentration en oxygène dissous est demeurée sous la barre des 5% de saturation pendant la majeure partie de la fermentation et de très faibles concentrations en cellules et activités protéolytiques (0,95 U.I./mL) y ont été obtenues. À l'inverse, les conditions *MOT* ont permis d'obtenir la concentration en cellules la plus élevée parmi toutes les conditions employées. Cependant, sous de telles conditions, la production de protéases y a été peu stimulée (faible U.I./10⁹ cellules) et donc les activités protéolytiques obtenues ont été faibles (4,17 U.I./mL).

Une fermentation (*MOT/HOT*) a été réalisée en combinant deux conditions de transfert d'oxygène au cours d'une même expérience (conditions *MOT* pendant la phase de croissance et conditions *HOT* pendant la phase de production). Ces conditions ont permis d'obtenir un nombre de cellules équivalent à celui obtenu en conditions *MOT*, alors que les activités protéolytiques obtenues (5,63 U.I./mL) ont été supérieures à celles obtenues en conditions *MOT*. Ces résultats ont permis de déterminer que le maintien de conditions de transfert d'oxygène élevées pendant la phase de production permet de stimuler la production de protéases. Ces résultats ont aussi démontré que la baisse de la concentration en oxygène dissous sous la barre des 10% en fin de phase de croissance (conditions *MOT*) a un effet inhibiteur important sur la production de protéases.

Suivant ces résultats, des conditions de transfert d'oxygène variables ont été expérimentées. Ainsi, de plus faibles taux d'aération et d'agitation ont été employés en début de fermentation, et graduellement augmentés pendant la phase de croissance de façon à maintenir la concentration en oxygène dissous au dessus de 15% de saturation, ce qui a favorisé la formation de biomasse tout en permettant de garder la formation de mousse sous contrôle, alors que des taux d'agitation et d'aération plus élevés ont été maintenus pendant la phase de production de façon à stimuler la

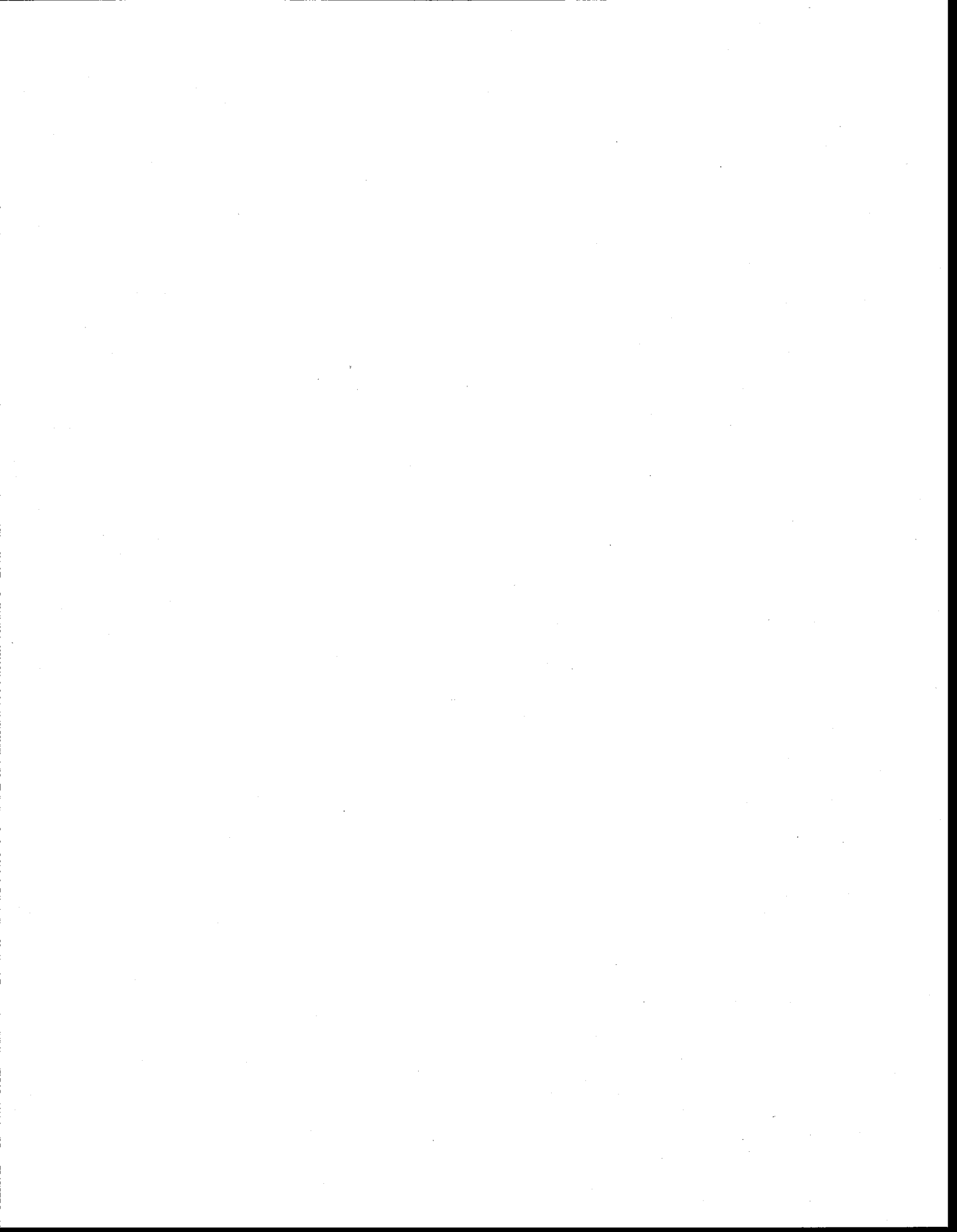
production de protéases, cette stratégie permettant d'obtenir des activités protéolytiques considérablement plus élevées (12,71 U.I./mL).

1.7.4 Combinaison des meilleures stratégies

La réalisation des travaux associés aux objectifs du présent travail ont permis d'identifier les conditions les plus favorables pour la production de protéases. Ces conditions ont été combinées au cours d'une dernière série d'expériences réalisées dans les boues secondaires de la ville de Québec. Ainsi, une fermentation a été réalisée dans les boues non pré-traitées (*RAW*) en employant NH_4OH et H_2SO_4 pour le contrôle du pH. En parallèle, une autre fermentation a été réalisée dans les boues *MIX* (75% de boues brutes et 25% de boues hydrolysées) en employant NaOH et H_2SO_4 pour le contrôle du pH. Pour les deux fermentations, la concentration en matières en suspension des boues a été initialement ajustée à 35 g/L et l'aération et l'agitation ont été contrôlées pendant la fermentation suivant la stratégie développée au cours des travaux précédents. La combinaison des conditions les plus favorables a permis une importante augmentation des activités protéolytiques obtenues : un maximum de 16,52 U.I./mL a été obtenu après 42h de fermentation dans les boues *RAW*, alors que les boues *MIX* ont permis d'atteindre 19,71 U.I./mL après 36 h de fermentation.

Suivant les résultats concernant la désorption des enzymes de la phase solide des boues à partir de différents tampons (section 1.7.1.3), l'augmentation du pH du bouillon de fermentation de 7,5 à 10 à l'aide de NaOH concentré (10N) avant la récolte des enzymes a permis d'augmenter significativement les activités protéolytiques mesurées dans les boues *RAW* et *MIX* (11% et 12% d'augmentation, respectivement) par rapport aux activités protéolytiques mesurés dans les échantillons équivalents récoltés à pH 7,5.

En dernier lieu, les travaux précédents ont démontré que les protéases produites dans les boues par *B.licheniformis* produisent un maximum d'activité protéolytique à pH 10 et à 55 °C. Ainsi, les protéases recueillies dans les boues *RAW* et *MIX* ont générées des activités protéolytiques de 66.74 U.I./ml et 80.93 U.I./ml, respectivement, à pH 10 et à 55 °C.



RÉFÉRENCES

Adjallé K.D. (2010). *Étapes d'ultrafiltration et procédés de formulation dans la production de biopesticides à base de Bacillus thuringiensis en utilisant des eaux usées et des boues d'épuration comme substrat* Thèse de doctorat. INRS-ETE, Université du Québec, Canada. 243 pages

Banerjee U.C., Sani R.K., Azmi W. et Soni R. (1999). Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem.* 35: 213-219.

Banik R.M. et Prakash M. (2004). Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiol. Res.* 159: 135-140.

Barnabé S., Sasseville J.-L., Tyagi R.D. et Valéro J.R. (2003). Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières? *Vecteur environ.* 36 (2): 50-62.

Barnabé S. (2004). *Hydrolyse et oxydation partielle des boues d'épuration comme substrat pour produire Bacillus thuringiensis HD-1*. Thèse de doctorat. INRS-ETE, Université du Québec, Canada. 235 pages.

Barjenbruch M. et Kopplow O. (2003). Enzymatic, mechanical and thermal pre-treatment of surplus sludge. *Adv. Environ. Res.* 7: 715-720

Ben Rebah F. (2001). *Utilisation des boues d'épuration comme milieu de culture pour la production d'inoculants à base de Rhizobium*. Thèse de doctorat. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. 191 pages.

Beg Q.K., Saxena R.K. et Gupta G. (2002). De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. *Process Biochem.* 37: 1103-1109.

Brar S.K., Verma M., Barnabé S., Tyagi R.D., Valéro J.R. et Surampalli R. (2005). Impact of Tween 80 during *Bacillus thuringiensis* fermentation of wastewater sludges. *Process Biochem.* 40: 2695-2705.

- Calik P., Calik G. et Ozdamar T.H. (1998). Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis* : Use of citric acid as the carbon source. *Enzyme Microb. Technol.* 23: 451-461.
- Calik P. et Ozdamar T.H. (1999). Mass flux balance-based model and metabolic pathway engineering analysis for serine alkaline protease synthesis by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme Microb. Technol.* 24: 621-635.
- Calik P., Calik G. et Ozdamar T.H. (2000a). Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Bioeng.* 69 (3): 301-311.
- Calik C., Takac C., Calik G. et Ozdamar T.H. (2000b). Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 45-60.
- Calik P. et Ozdamar T.H. (2001). Carbon sources affect metabolic capacities of *Bacillus* species for the production of industrial enzymes: theoretical analyses for serine and neutral proteases and α -amylase. *Biochem. Eng. J.* 8: 61-81.
- Calik P., Bilir E., Calik G. et 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.
- Calik G., Pehlivan N., Ozcelik L.S., Calik P. et Ozdamar T.H. (2004a). Fermentation and oxygen transfert characteristics in serine alkaline protease production by recombinant *Bacillus subtilis* in molasses-based complex medium. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79: 1243-1250.
- Calik P., Bilir E., Ozcelik I.S., Calik G. et Ozdamar T.H. (2004b). Inorganic compounds have dual effect on recombinant protein production: influence of anions and cations on serine alkaline protease production. *J. Appl. Microbiol.* 96: 194-200.
- Calik P., Ileri N., Erdinc B.I., Aydogan N. et Argun M. (2005). Novel antifoam for fermentation processes: fluorocarbon-hydrocarbon hybrid unsymmetrical bolaform surfactant. *Langmuir* 21:8613-8619.

Chu I.M., Lee C. et Li T.S. (1992). Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme Microbiol. Technol.* 14: 755-761.

Coultouly G. (1991). *Génie enzymatique*. Masson éditeur, Paris, France, 244 pages.

Dalev P.G. (1994). Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresour. Technol.* 48: 265-267

Demain A.L. (2000). Small bugs, big business : the economic power of the microbe. *Biotechnol. Adv.* 18 : 499-514.

De Azeredo L.A.I., De Lima M.B., Coelho R.R.R. et Freire D.M.G. (2006). A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces sp.* 594 using feather meal and corn steep liquor. *Curr. Microbiol.* 53: 335-339.

De Souza JR C.G., Ledingham W.M. et De Morais JR M.A. (2001). Utilisation of cheese whey as an alternative growth medium for recombinant strains of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* 23: 1413-1416.

Deutscher J., Galinier A. et Martin Verstraete I. (2002). Carbonhydrate uptake and metabolism. Dans: *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*, Sonenshein A.L., J.A. Hoch et R.Losick, ASM Press, Washington, États-Unis, pp. 129-150.

Doi R.H. (1974). Role of proteases in sporulation. Dans: *Molecular microbiology*, Kwapinski J. B. G., Wiley, New-York, États-Unis, pp. 1-20.

Dufresne G. (2004). *Valorisation de matières résiduelles pour la production de biofertilisants à base de rhizobium : optimisation du procédé de fermentation avec Sinorhizobium meliloti*. Mémoire de maîtrise. INRS-ETE, Université du Québec. Canada. 126 pages.

Drouin M. (2005). *Étude de production de protéases alcalines par Bacillus licheniformis en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat*. Mémoire de maîtrise. INRS-ETE, Université du Québec, Canada. 103 pages.

- El Hadj-Ali N., Agrebi R., Ghorbel-Frikha B., Sellami- Kamoun A., Kanoun S. et Nasri M. (2007). Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 515-523.
- Ellouz Y., Bayouhd S., Kammoun S., Gharsallah N. et Nasri M. (2001). Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. *Bioresour. Technol.* 80: 49-51.
- Ellouz Y., Ghorbel B., Souissi N., Kammoun S. et Nasri M. (2003). Biosynthesis of protease by *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on fish substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 41-45.
- Environnement Canada (1999). Base de données sur l'utilisation de l'eau par les municipalités (MUD). Ottawa, Ontario.
- Eriksen N. (1996). Detergents. Dans: *Industrial enzymology*, 2^e Édition, Godfrey T. et S.I West, Stockton Press, New-York, États-Unis, pp. 187-200.
- Eskicioglu C. Kennedy K.J. et Droste R.L., (2010). Enhanced disinfection and methane production from sewage sludge by microwave irradiation. *Desalination* 251: 279-285
- Ferrero M.A., Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D. et Sineriz F. (1996). Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29 : isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 327-332.
- Fisher S.H. et Débarbouillé M. (2002). Nitrogen source utilization and its Regulation. Dans : *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*, Sonenshein A.L., J.A.Hoch et R. Losick, ASM Press, Washington, États-Unis, pp. 181-192.
- Fleming A.B., Tangney M., Jorgensen P.L., Diderrichsen B. et Priest F.G. (1995). Extracellular enzyme synthesis in a sporulation-deficient strain of *Bacillus licheniformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (11): 3775-3780.
- Fogarthy W.M. et Kelly C.T. (1990). *Microbial enzymes and biotechnology*, 2^e Édition. Elsevier Science Publishing, New-York, États-Unis, 472 pages.

- Frankena J., Van Verseveld H.W. et Stouthamer A.H. (1985). A continuous culture study of the bioenergetic aspects of growth and production of extracellular protease in *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 169-176.
- Gessesse A., Hatti-Kaul R., Gashe B.A. et Matthiasson B. (2003). Novel alkaline proteases by alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 519-524.
- Giesecke U.E., Bierbaum G., Rudde H., Spohn U. et Wandrey C. (1991). Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 720-724.
- Godfrey T. et West S.I. (1996). Introduction to industrial enzymology. Dans: *Industrial enzymology*, 2^e Édition, Godfrey T. et S.I West, Stockton Press, New-York, États-Unis, pp. 1-8.
- Gupta R., Gupta K., Saxena R.K. et Khan S. (1999). Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus sp.* *Biotechnol. Lett.* 21: 135-138.
- Gupta R., Beg Q.K. et Lorenz P. (2002a). Bacterial alkaline proteases : molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 15-32.
- Gupta R., Beg Q.K., Khan S. et Chauhan B. (2002b). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 381-395.
- Haddar A., Fakhfakh-Zouari N., Hmidet N., Frikha F., Nasri M. et Sellami-Kamoun A. (2010). Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. *J. Biosci. Bioeng.* 110 (3): 288-294.
- Haddar A., Hmidet N., Ghorbel-Bellaaj O., Fakhfakh-Zouari N., Sellami-Kamoun A. et Nasri M. (2011). Alkaline proteases produced by *Bacillus licheniformis* RP1 grown on shrimp wastes: application in chitin extraction, chicken feather degradation and as a dehairing agent. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16: 669-678.
- Hammed A., Keshavarz T. et Evans C. (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.

Hanlon G.W., Hodges N.A. et Russell A.D. (1982). The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*. *J. Gen. Microbiol.* 128: 845-851.

Herbots I., 2007. Enzymes in household detergents. Dans: *Enzymes in industry, production and applications*, 3^e Édition, Aehle W, Wiley-VCH, Weinheim, Allemagne, pp. 154-177.

Hornbaek T., Jakobsen M., Dynesen J. et Nielsen A.K. (2004). Global transcription profiles and intracellular pH regulation measured in *Bacillus licheniformis* upon external pH upshifts. *Arch. Microbiol.* 182: 467-474.

Huang T.K, Wang P.M., et Wu W.T. (2001). Cultivation of *Bacillus thuringiensis* in an airlift reactor with wire mesh draft tubes. *Biochem. Eng. J.* 7 : 35-39.

Ichida J.M., Krizova L., Lefebvre C.A., Keener H.M., Elwell D.L. et Burt Jr E.H. (2001). Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. Microbiol. Methods* 47: 199-208.

Ito S., Kobayashi T., Ara K., Ozaki K., Kawai S. et Hatada Y. (1998). Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles* 2(3): 185-190.

Johnvesly B. et Naik J.R. (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.

Johnvesly B., Manjunath B.R. et Naik J.R. (2002). Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *Bioresour. Technol.* 82: 81-84.

Joo H-S., Kumar C.G., Park G-C., Kim K.T., Paik S.R. et Chang C-S. (2002). Optimisation of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochem.* 38: 155-159.

Joo H.S., Kumar C.G., Park G-C., Kim K.T., Paik S.R. et Chang C-S. (2004). Bleach-resistant alkaline protease produced by a *Bacillus* sp. isolated from the Korean polychaete, *Periserrula leucophryna*. *Process Biochem.* 39: 1441-1447.

Kalisz H.M. (1988). Microbial proteinases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 36: 1-65.

Kembhavi A.A., Kulkarni A. et Pant A. (1993). Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM no. 64. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38: 83-92.

Kudrya V.A. et Simonenko I.A. (1994). Alkaline serine protease and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 505-509.

Kumar C.G. et Takagi H. (1999). Microbial alkaline proteases : From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* 17: 561-594.

Kumar G. et Parrack P. (2003). Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 757-762.

Lenting H.B.M. (2007). Enzymes in textile production. Dans: *Enzymes in industry, production and applications*, 3^e Édition, AEHLE W, Wiley-VCH, Weinheim, Allemagne, pp. 218-231.

Mabrouk S.S., Hashem A.M., El-Shayeb N.M.A., Ismail A.M.S. et Abdel-Fattah A.F. (1999). Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresour. Technol.* 69: 155-159.

Mannan S., Fakhrul-Razi A. et Alam M. Z. (2007). Optimization of process parameters for the bioconversion of activated sludge by *Penicillium corylophilum*, using response surface methodology. *J. Environ. Sci.* 19: 23-28.

Mantzavinos D. et Psillakis E. (2004). Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pretreatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79: 431-454.

Maurer K.H. (2007). Developement of new industrial enzyme applications. Dans: *Enzymes in industry, production and applications*, 3^e Édition, Aehle W, Wiley-VCH, Weinheim, Allemagne, pp. 244-257.

MDDEP (2003). Valorisation des boues municipales comme matières fertilisantes au Québec. Site du ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs. <http://www.mddep.gouv.qc.ca/matieres/articles/valorisation.htm>

Meunier N. (1999). *Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales*. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. 168 pages.

Muller J.A., Winter A. et Strunkmann G. (2004). Investigation and assessment of sludge pre-treatment processes. *Water Sci. Technol.* 49: 97-104.

Ndegwa P.M. et Thompson S.A. (2001). Integrating composting and vermicomposting in the treatment and bioconversion of biosolids. *Bioresour. Technol.* 76: 107-112.

Ozbek B. et Gayik S. (2001). The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochem.* 36: 729-741

Ozergin-Ulgen K. et Mavituna F. (1998). Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces Coelicolor* A3(2) culture in a batch bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73: 243-250.

Pelton R. (2002). A review of antifoam mechanisms in fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29: 149-154.

Pham T.T.H., Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D. et Surampalli R.Y. (2009). Ultrasonication of wastewater sludge – Consequences on biodegradability and flowability. *J. Hazard. Mater.* 163: 891-898.

Polgar L., 1989. *Mechanisms of protease action*. CRC Press. Boca Raton, États-Unis, 211 pages.

Potumarthi R., Subhakar C. et Jetty A. (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.

Prakasham R.S., Subba Rao C. et Sarma P.N. (2006). Green gram husk - an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus sp.* in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 97: 1449-1454.

Prescott L., Harley J.P. et Klein D.A. (1995). *Microbiologie*, 2^e Édition. DeBoeck-Wesmael, Bruxelles, Belgique, 1014 pages.

Puri S., Beg Q.K. et Gupta R. (2002). Optimisation of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. *Curr. Microbiol.* 44: 286-290.

Rai S.K., Roy J.K. et Mukherjee A.K. (2009). Characterisation of a detergent-stable alkaline protease from a novel thermophilic strain *Paenibacillus tezpurensis* sp. nov. AS-S24-II. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: published online.

Ramnani P., Suresh Kumar S. et Gupta R. (2005). Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: Bioformulation as detergent additive. *Process Biochem.* 40: 3352-3359.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. et Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (3): 597-625.

Recyc-Quebec (2003). Bilan 2002 de la gestion des matières résiduelles au Québec. <http://www.recyc-quebec.gouv.qc.ca/upload/Publications/zzBilan2557.pdf>

Sachveda V., Tyagi R.D. et Valéro J.R. (1999). Factors affecting the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *Recent Res. Dev. Microbiol.* 3: 363-375.

Sachveda V., Tyagi R.D. et Valéro J.R. (2000). Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water Sci. Technol.* 42: 211-216.

Sellami-Kamoun A., Haddar A., El Hadj-Ali N., Ghorbel-Frikha B., Kanoun S. et Nasri M. (2008). Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiol, Res.* 163: 299-306.

Sellami-Kamoun A., Ghorbel-Frikha B., Haddar A. et Nasri M. (2011). Enhanced *Bacillus cereus* BG1 protease production by the use of sardinelle (*Sardinella aurita*) powder. *Ann. Microbiol.* 61: 273-280.

Sinha N. et Satyanarayana T. (1991). Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*. *Indian J. Microbiol.* 31 (4): 425-430.

Shrinivas D., Kumar R. et Naik G.R. (2012). Enhanced production of alkaline thermostable keratinolytic protease from calcium alginate immobilized cells of thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39: 93–98.

Tang X.M., Lakay F.M., Shen W., Shao W.L., Fang H.Y., Prior B.A., Wang Z.X. et Zhuge J. (2004). Purification and characterisation of an alkaline protease used in tannery industry from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 26: 1421-1424.

Tirado-Montiel M.L., Tyagi R.D. et Valéro J.R. (2001). Wastewater treatment sludge as raw material for production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Res.* 35(16): 3807-3816.

Thys R.C.S., Guzzon S.O., Cladera-Olivera F. et Brandelli A. (2005). Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. *Process Biochem.* 41: 67-73.

Van Putten A.P.B., Spitzenberger F., Kretzmer G., Hitzmann B., Dors M., Simutis R. et Schugerl K. (1996). Improvement of the production of subtilisin Carlsberg alkaline protease by *Bacillus licheniformis* by on-line process monitoring and control in a stirred tank reactor. *J. Biotechnol.* 49: 83–93.

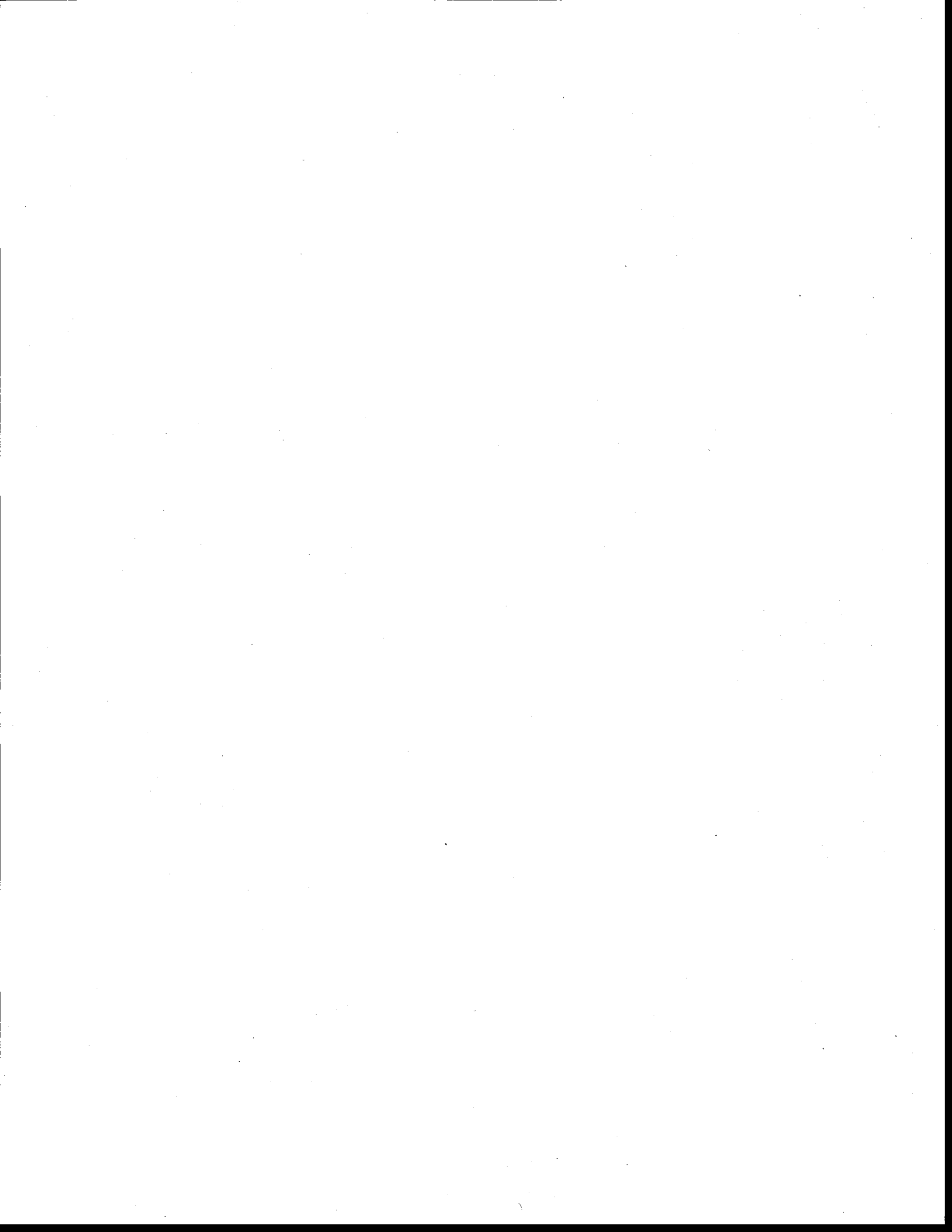
Yan S., Tyagi R.D. et Surampalli R.Y. (2006). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using wastewater as carbon source and activated sludge as microorganisms. *Water Sci. Technol.* 53(6): 175-180.

Yezza A., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y. et Smith J. (2004). Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 545-552.

Yezza A., Tyagi R.D., Valéro J.R. et Surampalli R.Y. (2005a). Wastewater sludge pre-treatment for enhancing entomotoxicity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1165-1174.

Yezza A., Tyagi R.D., Valéro J.R. et Surampalli R.Y. (2005b). Influence of pH control agents on entomotoxicity potency of *Bacillus thuringiensis* using different raw materials. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1549-1558.

Yoshida H., Tokumoto H., Ishii K. et Ishii R. (2009). Efficient high-speed methane fermentation for sewage sludge using subcritical water hydrolysis as pre-treatment. *Bioresour. Technol.* 100 (12): 2933-2939.



CHAPITRE 2:
PRÉ-TRAITEMENT DES
BOUES.

(Résultats des objectifs 1 et 2)



PARTIE 1

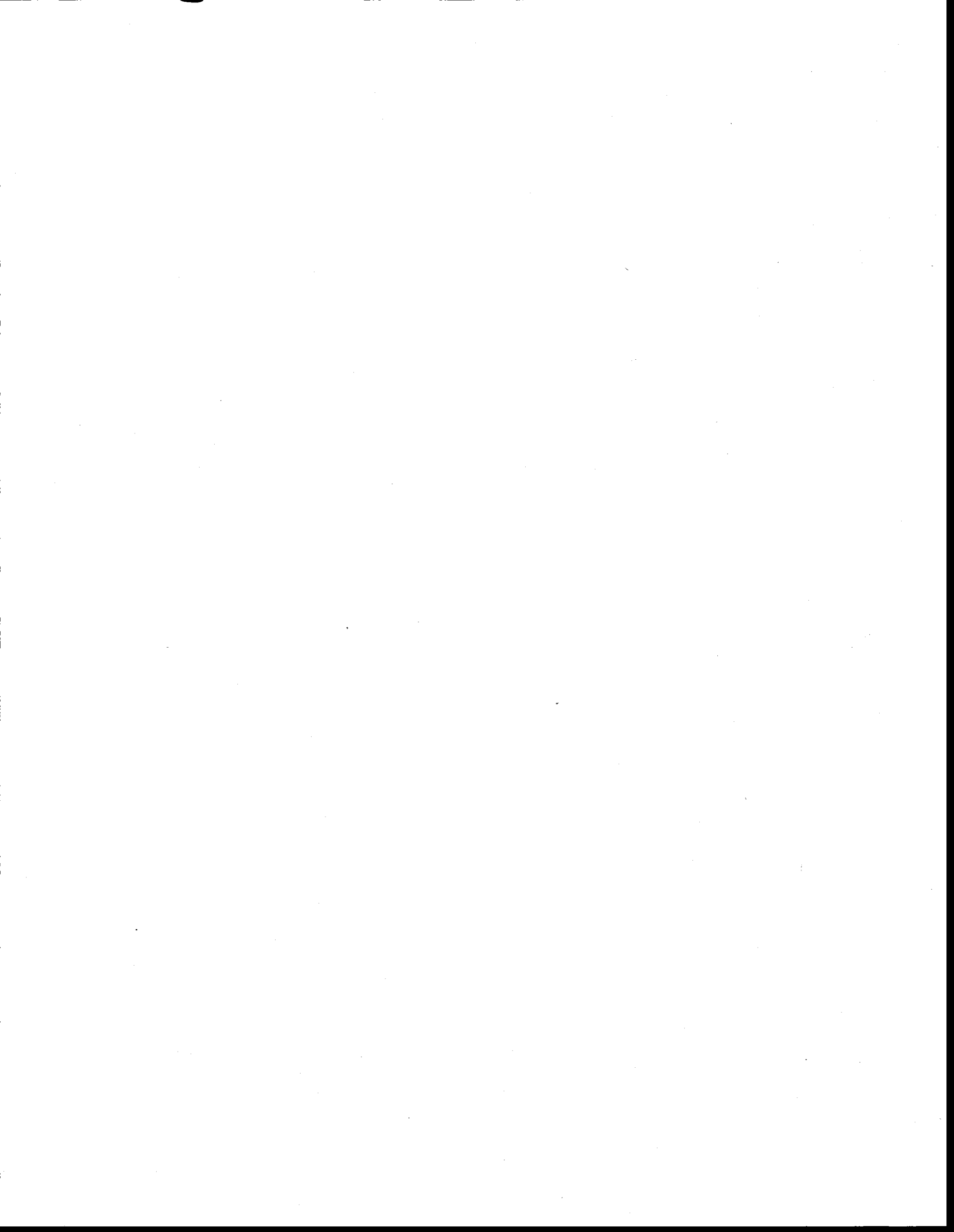
***BACILLUS LICHENIFORMIS* PROTEASES AS HIGH VALUE ADDED PRODUCTS FROM FERMENTATION OF WASTEWATER SLUDGE: PRE-TREATMENT OF SLUDGE TO INCREASE THE PERFORMANCE OF THE PROCESS**

M. Drouin*, C. K. Lai*, R.D. Tyagi* and R.Y. Surampalli**

*Institut National de la Recherche Scientifique, centre Eau, Terre et Environnement, Université
du Québec, 490 de la Couronne, Québec, G1K 9A9, Canada

** US EPA, P.O. Box-17-2141, Kansas City, KS 66117, USA

WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY 57 (3): 2008



RÉSUMÉ

Les boues d'épuration constituent un substrat complexe pouvant supporter la croissance et la production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis*. Dans la présente étude, les boues ont été soumises à différents pré-traitements thermo-alcalins, avant d'être soumises à la fermentation par *Bacillus licheniformis* sous des conditions contrôlées, en fermenteurs de 15 L. Le prétraitement d'hydrolyse thermo-alcaline s'est avéré efficace pour augmenter les activités protéolytiques obtenues dans les boues. Parmi tous les milieux utilisés, un mélange de boues hydrolysées et non-hydrolysées a permis une augmentation de 15% de l'activité protéolytique en comparaison avec les boues non hydrolysées seulement. L'effet bénéfique de l'hydrolyse a été attribué à un meilleur transfert d'oxygène dans le milieu pendant la fermentation causé par la baisse de la viscosité des boues, ainsi qu'à l'amélioration de la biodisponibilité des nutriments contenus dans les boues. La formation de mousse est une problématique importante lors de fermentation avec des boues hydrolysées. Les résultats ont démontré que l'ajout d'agent anti-mousse chimique (polypropylène glycol) pour le contrôle de la mousse pendant la fermentation peut affecter négativement la production de protéase en augmentant la viscosité des boues.

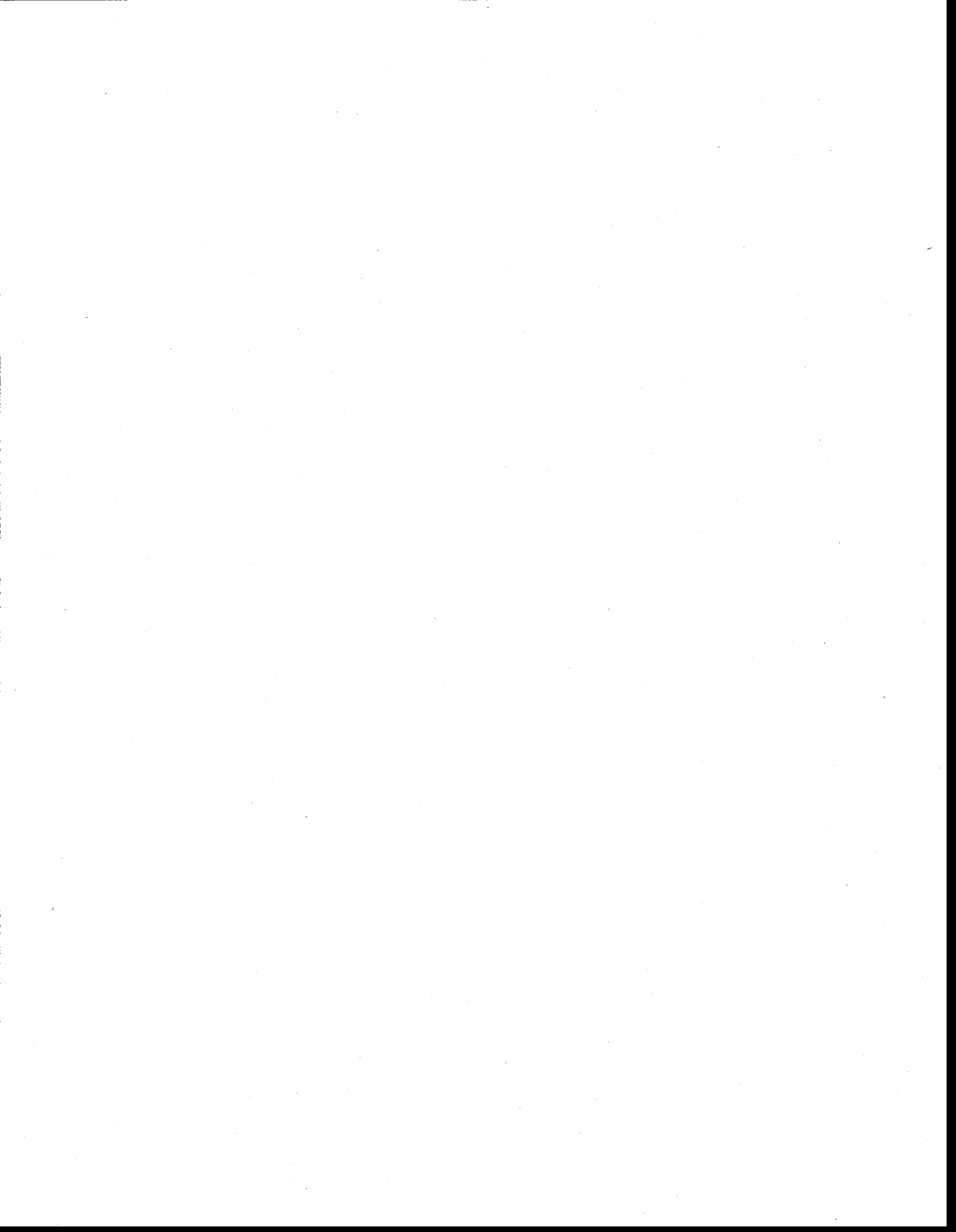
Mots clés protéases alcalines, *Bacillus licheniformis*, prétraitement, boues d'épuration.



ABSTRACT

Wastewater sludge is a complex raw material that can support growth and protease production by *Bacillus licheniformis*. In this study, sludge was treated by different thermo-alkaline pre-treatment methods and subjected to *Bacillus licheniformis* fermentation in bench scale fermentors under controlled conditions. Thermo-alkaline treatment was found to be an effective pre-treatment process in order to enhance the protease activity. Among the different pre-treated sludges tested, a mixture of raw and hydrolysed sludge caused an increase of 15 % in the protease activity, as compared to the untreated sludge. The benefit of hydrolysis has been attributed to a better oxygen transfer due to decrease in media viscosity and to an increase in nutrient availability. Foam formation was a major concern during fermentation with hydrolysed sludge. The studies showed that addition of a chemical anti-foaming agent (polypropylene glycol) during fermentation to control foam could negatively influence the protease production by increasing the viscosity of sludge.

Keywords alkaline protease, *Bacillus licheniformis*, pre-treatment, wastewater sludge.



2.1 INTRODUCTION

Most of the enzymes market is related to hydrolytic type of enzymes such as proteases, lipases and the cellulases (Rao *et al.*, 1998). The proteases alone represent 60 % of the total sales of enzymes (Gupta *et al.*, 2005). At present, the largest part of the hydrolytic enzymes market is occupied by the alkaline proteases, mainly because of their use in detergents. The alkaline proteases resulting mainly from *Bacillus licheniformis* are used in detergents and occupy a large portion of the market (Godfrey and West, 1996). Although use of enzymes has many advantages, the competitiveness of the enzymes compared to the chemicals is limited by their higher production costs. The culture medium is responsible for 30 to 40% of the production costs (Kumar and Parrack, 2003). The use of a less expensive culture medium and concomitant stimulation of protease production/yield would thus considerably lower the production cost. Hence, the use of tertiary matters as alternative substrates, available in large quantities and at less cost, is an interesting option.

Municipal wastewater sludge (a rich source of carbon, nitrogen, phosphorus and others nutrients required for growth and production) can be an interesting low-cost culture medium. Actually, technologies have been developed or are under development to produce biopesticides, biofertilizers or many other value added products from sludge (Barnabé *et al.*, 2003). Drouin *et al.* (2007) showed that municipal wastewater sludge can be a suitable medium to support growth and protease production by *Bacillus licheniformis*. In fact, sludge fermentation in fermenters resulted in protease activity comparable to conventional synthetic medium.

The characteristics of sludge, specifically nutrient content plays an important role in the process performance. Drouin *et al.* (2007) confirmed a concomitant increase in protease activity with sludge suspended solids concentration (SS) from 20 to 35 g SS/L. The maximum protease activity was obtained in a sludge containing 35 g SS/L. However, further increase in SS to 40 g/L resulted in a decrease of protease activity. These results showed that the sludge concentration cannot be increased indefinitely. In highly concentrated sludge, the reduction in enzyme activity was due to either inhibition by the substrate or low oxygen transfer capacity in the culture medium caused by high viscosity associated with high concentrated sludge (Brar *et al.*, 2004).

Meanwhile, wastewater sludge is a complex and heterogeneous material containing different types of organic matter that has been classified as easily biodegradable, biodegradable, difficult to biodegrade and non-biodegradable (Tirado-Montiel *et al.* 2003). Different techniques have been tested to increase the biodegradability of difficult-to-biodegrade material that constitutes wastewater sludge (Ben Rebah *et al.* 2001). Several methods of sludge pre-treatment such as thermal and chemical treatments by acidification, alkaline and peroxide hydrolysis have been introduced in our laboratory (Barnabé, 2004). Among these methods, it has been demonstrated that thermal alkaline sludge hydrolysis is a suitable way to break larger molecules into smaller ones and thus improved the rheology of sludge, providing better oxygen transfer and better nutrient assimilation for *Bacillus thuriangiensis* based biopesticide production (Barnabé, 2004; Brar *et al.*, 2004; Yezza *et al.* 2005). The main objective of this study was to determine the potential of using different thermo-alkaline pre-treated sludges for the production of proteases by *Bacillus licheniformis*. The study was conducted in fermentors under controlled parameters.

2.2 MATERIAL AND METHODS

2.2.1 *Bacillus licheniformis* strain

Bacillus licheniformis ATCC 21424 (BI) was used for all the experiments in this study. An active culture was maintained by streak inoculating nutrient agar plates (3 g/L of beef extract, 5 g/L peptone and 15 g/L agar) and incubating at 35°C for 48 h. The plates were stored at 4°C for later use.

2.2.2 Sludge samples and medium composition

The wastewater secondary sludge samples were collected from Quebec municipal wastewater treatment plant (Communauté Urbaine de Quebec, Quebec, Canada). The experiments were conducted with settled sludge at SS concentration of 35 g/L.

2.2.3 Sludge pre-treatment

Four different types of sludge were used in this study.

Raw sludge (RAW): Secondary sludge was settled by gravity settling to increase the suspended solids concentration in order to obtain the desired SS concentration.

Thermal alkaline hydrolysis of sludge (TAH): the sludge was concentrated by centrifugation (> 60 g/L suspended solids concentration). The pH was adjusted to 10 by adding sodium hydroxide. Thermo-alkaline pre-treatment was conducted in 10 L working volume hydrolyser at 100 rev/min stirrer speed and 140 °C for 30 min. Thermal energy was conveyed into the sludge by direct steam injection. Steam injection provided direct thermal contact with the sludge; however, it increased sludge volume, owing to condensation of a part of the injected steam and reducing the suspended solids (SS) concentrations to around 40 g/L. The concentration of sludge was further adjusted to the desired value.

Mix of raw and hydrolysed sludge (MIX) Mixed sludge contained an equal amount of raw sludge (50%) and the thermo-alkaline treated sludge (50%).

In-situ hydrolysis (ISH): The desired suspended solids concentration was adjusted; the pH was brought to 10 followed by sterilization in fermentor at 121°C for 30 minutes. This way the sludge was hydrolyzed as well as sterilised in one step.

2.2.4 Inoculum preparation

An inoculum prepared in two steps was found to be optimal in a previous study (Drouin *et al.*, 2007). A starting culture was prepared in 100 ml of nutrient broth whose composition was as follows (g/L): beef extract - 3, peptone - 5. The preparation was carried out in an Erlenmeyer of 500 ml. The medium pH was adjusted to 7.5 by addition of 4N NaOH or 4N H₂SO₄ and then autoclaved (121° C, 15 min). The sterilised medium was inoculated with a loopful of *B. licheniformis* grown and stored on nutrient agar. The Erlenmeyers were incubated at 35°C under a constant agitation of 250 revolutions per minute (rpm) for 12 h in an incubator-shaker (Lab-Line, Dubuque, Iowa, USA). A 2% (v/v) of this broth (first stage inoculum) was used as seed culture to inoculate 500 ml Erlenmeyer flask containing 150 ml of the same medium as the fermentation substrate (raw or pre-treated sludge) (second stage inoculum). The suspended solids concentration used to grow the inoculum was 15 g/L. The flasks were then incubated in a rotary shaking incubator at 35 °C and at 250 rpm for 12 h. Finally, a 4.5 % (v/v) of inoculum volume of the actively growing cells of the pre-culture was transferred to the fermentor.

2.2.5 Fermentation procedure

The experiments were carried out in two fermentors (15 L) (Biogénie Inc, Quebec, Quebec, Canada) equipped with agitation, aeration, temperature, pH, foam and dissolved oxygen (DO) control systems. The fermentors were filled with 10 L of culture medium, 20 ml solution of polypropylene glycol (Sigma-Aldrich, Canada) was added to fermentor as anti-foam agent during sterilization. Sterilization was carried out in situ at 121° C for 30 minutes. After cooling to 35°C, the fermentors were inoculated. Fermentations were carried out at 35°C for 48 h. Agitation was controlled between 200 and 500 rpm whereas an aeration rate between 2 – 6 litre per minute (LPM) was used to keep the DO level above 20% of saturation. The pH was automatically controlled at 7.5 using either sterile solutions of sodium hydroxide (NaOH, 4 M) or sulphuric acid (H₂SO₄, 3 M) through computer controlled peristaltic pumps. The foam was controlled by a mechanical foam breaker or by the addition of a solution of 20% (v/v) polypropylene glycol

(PPG). Samples were drawn from the fermentor at regular intervals to determine cell and spore counts and protease activity.

2.2.6 Analytical

2.2.6.1 Cell and spore counts

To determine viable cell and spore count of *B. licheniformis*, the samples serially diluted with sterile saline solution (0.85% w/v NaCl). The appropriately diluted samples (0.1 ml) were plated on TSA plates and incubated at 35°C for 24h to form fully developed colonies. For spore count, the appropriately diluted samples were heated in a silicone bath at 80°C for 10 min and then chilled on ice for 5 min. The cell and spore counts were estimated by counting colonies grown on nutrient agar medium. For all counts, the average of at least three replicate plates was used for each tested dilution. For enumeration, 30 to 300 colonies were enumerated per plate. The results were expressed as colony forming units per ml (CFU/ml). In order to establish the reliability and reproducibility of the plate count technique, 10 independent samples were drawn (at the same time) from the shake flask experiment and were serially diluted and plated. Each dilution was plated in three different plates and the colonies were counted and the standard deviation was calculated. The calculated standard deviation was 6%.

2.2.6.2 Protease activity assay

Protease activity was determined according to Kunitz (1947) with minor modifications. Samples collected from the fermentor were centrifuged at 7650 g for 20 min at 4°C. The supernatant was appropriately diluted with borate buffer, pH 8.2. Alkaline protease activity was assayed by incubating 1 ml of properly diluted enzyme solution with 5 ml of casein solution (1.2% w/v) (Sigma-Aldrich, Canada) for 10 minutes at 37°C in a constant temperature water bath. The reaction was terminated by adding 5 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA). This mixture was incubated for 30 min in order to precipitate the total non-hydrolysed casein. Parallel blanks were prepared with inactivated casein. At the end of this incubation period, the samples as well as the blanks were filtered using Whatman paper 934-AH (Whatman Inc, USA). The absorbance of the filtrate was measured at 275 nm using a Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian Techtron Pty. Ltd., Australia). Validation of the results was established by treating a standard enzyme solution of known enzymatic activity, in the same way and under the same conditions.

One protease activity unit was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μ mole (181 μ g) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37°C. Statistical treatment of the results showed a maximal deviation of 5%.

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

Evolution of viable cells and spore counts, protease activity and viscosity during the fermentation course in raw sludge and in the pre-treated sludges are illustrated in Figure 1. The values of various parameters for the four types of sludge are reported in Table 1. Different pre-treatment had a significant impact on the growth of BI and protease activity. In case of raw and hydrolysed sludge, the exponential growth phase lasted during the first 18 h. In mixed and in-situ hydrolysed sludge, the exponential growth phase was shorter, lasting until 15 h (Fig 1). The highest maximum specific growth rate was obtained in the MIX sludge, whereas the minimum value was recorded in raw sludge. The maximum cell count was observed in raw sludge. The profiles of viable spores obtained showed that there was no significant increase in the spore counts during the exponential phase. In all kinds of sludge, the beginning of sporulation phase coincided with the end of exponential growth phase or beginning of the stationary phase (Fig. 1). The maximum spore count was observed in mixed sludge. The maximum protease activity (13.03 I.U./mL) was observed in the mixed sludge. The minimum value (9.84 I.U./mL) was obtained in TAH sludge. For all types of pre-treated sludge, practically no protease activity was observed during the exponential growth phase. The increase in the protease activity coincided with the transition from exponential growth phase to stationary phase and continued increasing until 36- 42 h, followed by a slight decrease. However, in raw sludge, the production of proteases began earlier (9 h) whereas in the pre-treated sludge the production of protease was delayed (12 h). For all types of sludges tested, the viscosity decreased during the fermentation (Fig 1). The highest viscosity values were obtained in TAH sludge, and the lowest in the IS (in-situ hydrolysed) sludge.

The results showed that there is no direct relation between cell count and protease activity, as reported by Drouin *et al.* (2007). Even if the maximum cell counts were obtained in raw sludge, the highest protease activity values were obtained in MIX pre-treated sludge. There is also no clear relation between spore count and protease activity. In all media, the production of protease activity begins when the cells have already entered in sporulation phase (Fig. 1). Many workers suggested an indirect relation between the sporulation and proteases production (Kumar *et al.*, 1999; Mabrouk *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2002). However, Fig. 1 reveals that increase in protease activity continued even after the spore count reached plateau. In fact a substantial increase in

protease activity could be noticed after cessation of spore count increase, implying a complex relation between spore production and protease activity.

Thermo-alkaline pre-treatment of sludge causes hydrolysis of proteins, polysaccharides, lipids and other intracellular macromolecules secreted from disrupted sludge cells and significantly enhances the amount of dissolved organic matter from wastewater sludge. This phenomenon makes the carbohydrates, proteins and other nutrients accessible for B1 growth. Thus, difficult-to-degrade compounds present in sludge were transformed into easily degradable ones. Furthermore, enhanced nutrient availability and biodegradability in pre-treated sludge favoured the growth of the bacteria (Yezza *et al.*, 2005). This could explain the higher maximum specific growth rate values calculated in MIX and IS pre-treated sludge, in comparison with the raw sludge (Table 1).

The pre-treated sludge also had significant impact on protease activity. At the beginning of fermentation, B1 consumes easily assimilable substrates contained in sludge. The presence of these substrates can have an inhibiting (during exponential growth phase) effect on protease production. When easily assimilable substrates were consumed, the inhibition on enzyme production was alleviated (Yezza *et al.*, 2005). The proteases were eventually produced and secreted in the medium by the bacterial cells. The highest amount of easily assimilable substrate present in hydrolysed sludge could explain the early production of proteases (9 h) in raw sludge, as compared to pre-treated sludge where the protease production was delayed (12 h).

Additionally, as discussed earlier, sludge is a complex and heterogeneous material containing difficult to biodegrade organic matter. Thermo-alkaline pre-treatment of sludge can cause the hydrolysis of non-biodegradable matter into more biodegradable forms. Enhanced nutrient biodegradability in pre-treated sludge can stimulate the bacteria to produce higher amount of proteases. This could explain why the protease activity values obtained were higher in MIX and ISH pre-treated sludge, in comparison to raw sludge. However, further systematic study is needed to understand the exact role of hydrolysis on nutrient availability and their quality. Meanwhile, Brar *et al.* (2004) showed that after sludge thermal-alkaline hydrolysis, the viscosity substantially decreased which simplified mixing and enhanced oxygen transfer. As the viscosity decreases, air in the fermentor fluid becomes better distributed in the form of small bubbles throughout the process (Yezza *et al.*, 2005). The benefit of small bubbles is slow rising velocities which keep air bubbles in the liquid longer, allowing more time for the oxygen to dissolve. Calik *et al.* (2000, 2004) showed that oxygen transfer is a key parameter for the production of protease. In ISH

sludge, lower viscosity, combined with a better nutrient availability, could have contributed to a better protease production, in comparison with the raw sludge.

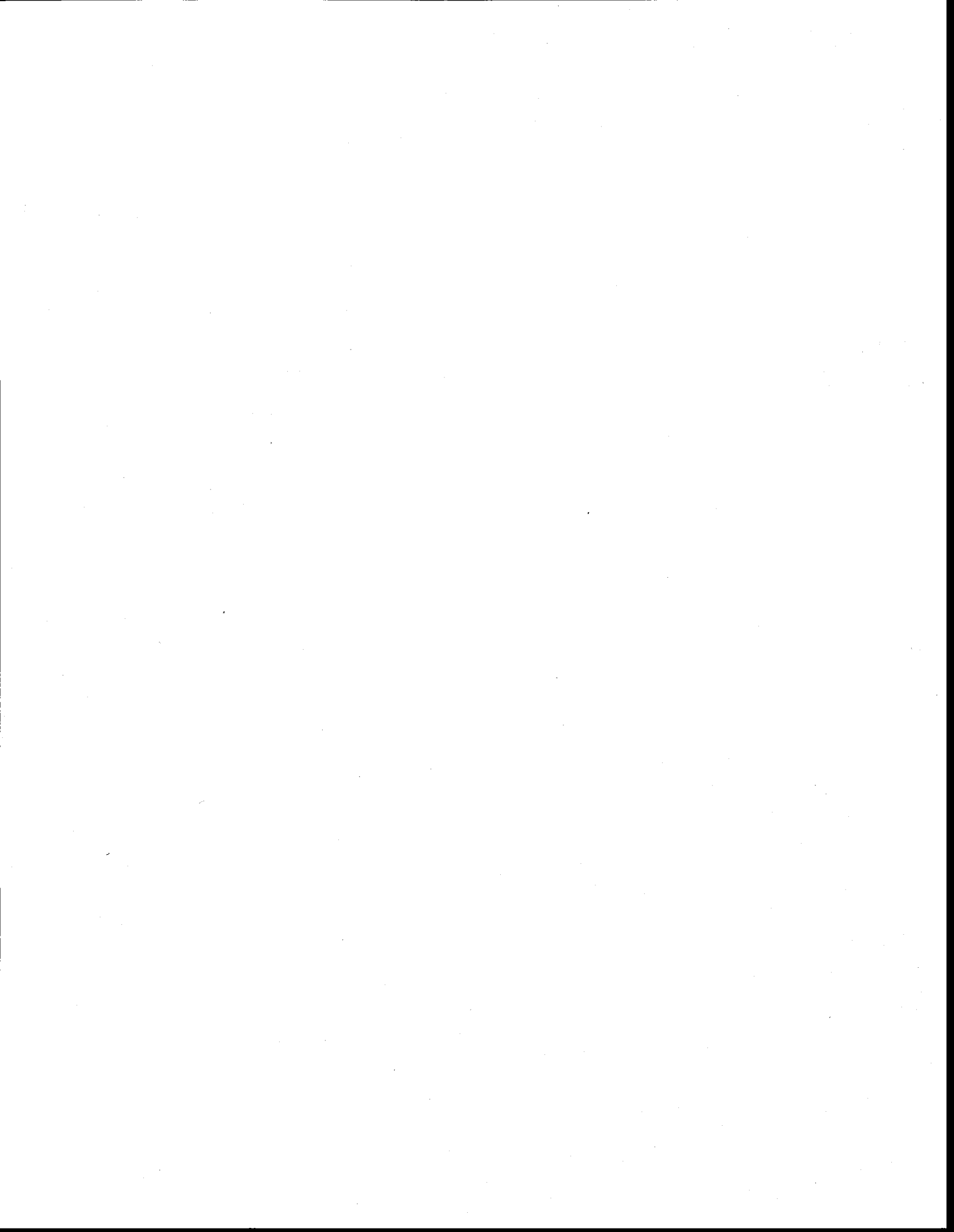
During the fermentation, the combined effect of agitation and aeration can contribute to foam formation. With MIX sludge, the formation of foam was particularly significant and difficult to control during fermentation. Formation of foam was further intensified with the use of TAH sludge. In case of TAH sludge, the addition of a large quantity of anti-foam agent (PPG) was necessary from the beginning and it has a great impact on the viscosity of the medium. This explains why viscosity increased during the first hours of fermentation (Fig. 1). The addition of anti-foam was also necessary throughout the fermentation, which explains why viscosity remained much higher than in raw sludge throughout the fermentation, whereas Brar *et al.* (2004) showed low viscosity in thermo-alkaline hydrolysed sludge. The higher viscosity of TAH sludge would have caused to decrease the capacity of transfer of oxygen of the medium, which would explain the low values of protease activities obtained in TAH sludge. Similarly with MIX sludge, the addition of anti-foam agent could explain why the viscosity values were slightly higher in comparison to those measured in raw-sludge.

A better aeration and agitation strategy should be followed in order to minimize foam formation and to reduce the need of adding chemical anti-foaming agent during the fermentation especially when pre-treated sludge is used as a raw material. A repetition of these experiments with a better oxygen control strategy is therefore required in order to evaluate the real potential of pre-treated sludge. Furthermore, operation parameters (pH, time of treatment) of thermo-alkaline hydrolysis and other sludge pre-treatment methods (oxidative, ultrasonication, ozonation) need to be investigated.



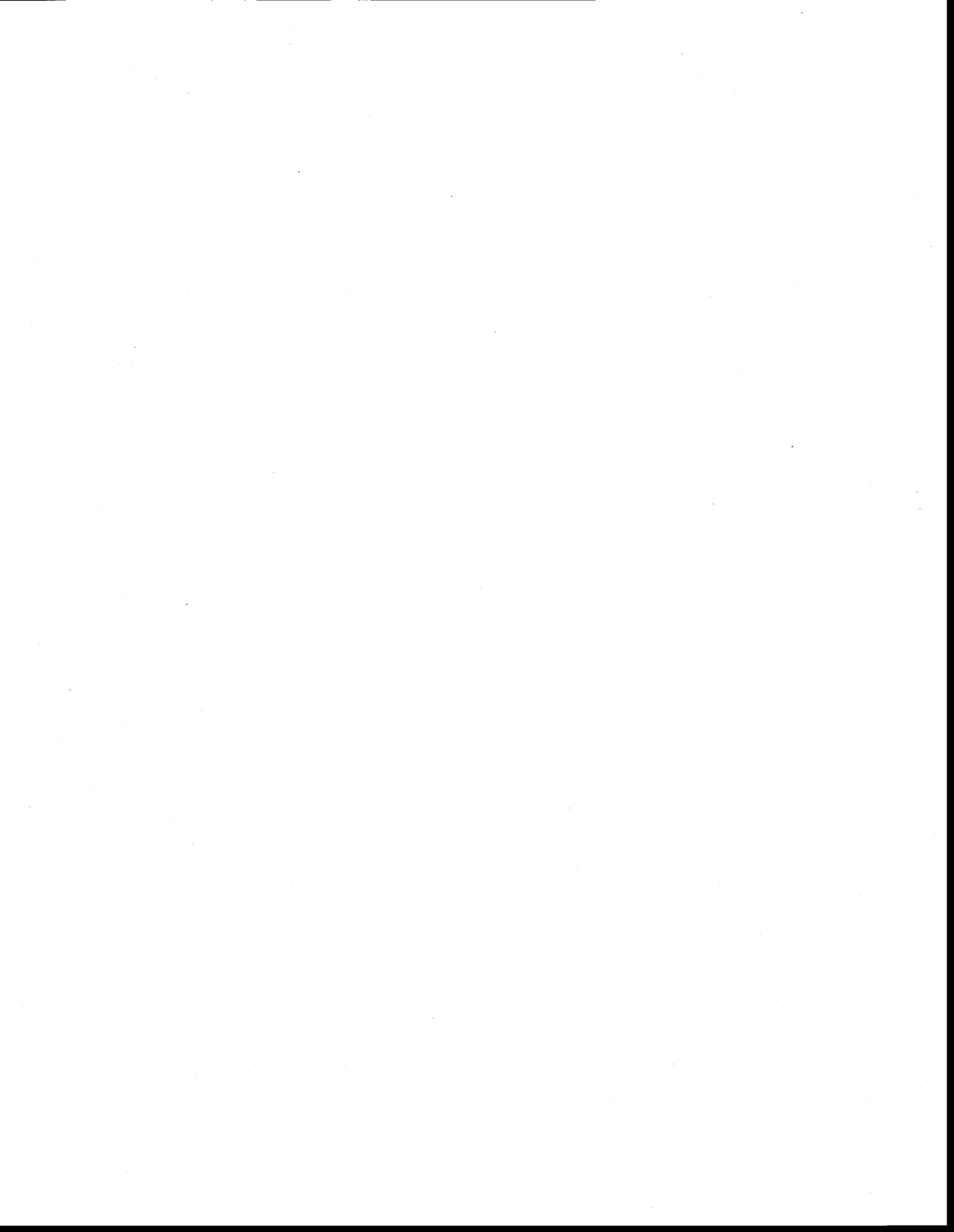
2.4 CONCLUSIONS

The thermo-alkaline pre-treatment of sludge was found to be promising to enhance the protease activity. A mixture of raw and hydrolysed sludge and in situ pre-treated sludge resulted in an appreciable increase of protease activity compared to the untreated or raw sludge. The increase of protease activity in mixed sludge was mainly due to an enhanced nutrient availability and biodegradability in the sludge. For the in situ pre-treated sludge, the decrease in viscosity and hence better oxygen transfer could also have played a role in an increase of protease activity. The addition of excessive anti-foam agent (PPG) during the fermentation had a great negative impact on protease activity during the fermentation.



ACKNOWLEDGEMENTS

Sincere thanks are due to the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (Grant A 4984, strategic grant and Canada Research Chair) for their financial support. The views and opinions expressed in this paper are those of the authors and should not be construed as the opinions of the U.S. Environmental Protection Agency.



REFERENCES

Barnabé S. (2003). Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières? (*wastewaters and residual matters, tertiary matters or raw materials?*). *Vecteur environ.* 36 (2). 50-62.

Barnabé S. (2004). *Hydrolyse et oxydation partielle des boues d'épuration comme substrat pour produire Bacillus thuringiensis HD-1 (Hydrolysis and partial oxydation of wastewater sludge as raw material to produce Bacillus thuringiensis HD-1)*. PhD Thesis, INRS-ETE, Université du Québec, Canada. 235 pages.

Ben Rebah F., Tyagi R.D. and Prévost D. (2001). Acid and alkaline treatments for enhancing the growth of rhizobia in sludge. *Can. J. Microbiol.* 47: 467–474.

Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y. and Banerji S.K. (2004). Comparative rheology and particle size analysis of various types of *Bacillus thuringiensis* fermented sludges. *J. Residuals Sci. Technol.* 1: 231–237.

Calik P., Calik G. and Ozdamar T.H. (2000). Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Bioeng.* 69 (3): 301-311.

Calik G., Pehlivan N., Ozcelik L.S., Calik P. and Ozdamar T.H. (2004). Fermentation and oxygen transfer characteristics in serine alkaline protease production by recombinant *Bacillus subtilis* in molasses-based complex medium. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79: 1243-1250.

Drouin M., Yan S., Tyagi R.D., Valéro J.R. and Surampalli R.Y. (2007). Production of alkaline proteases using wastewater sludge as a raw material. In preparation.

Godfrey T. and West S.I. (1996). Introduction to industrial enzymology. In: *Industrial enzymology*, 2nd Edition, Godfrey T. and S.I West, Stockton Press, New-York, États-Unis, pp. 1-8.

- Gupta R., Beg Q.K., Khan S. and Chauhan B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 60: 381-39.
- Gupta A., Roy I., Patel R.K., Singh S.P., Khare S.K. and Gupta M.N. (2005). One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *J. Chromatogr. A* 1075: 103–108.
- Kumar C.G. and Takagi H. (1999). Microbial alkaline proteases : From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* 17: 561-594.
- Kumar G. and Parrack P. (2003). Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 757-762.
- Kunitz M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310.
- 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.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. and Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (3): 597-625.
- Tirado-Montiel M.L., Tyagi R.D., Valéro J.R. and Surampalli R.Y. (2003). Production biopesticides using wastewater sludge as a raw material – effect of process parameters. *Water Sci. Technol.* 48: 239–246.
- Yezza A., Tyagi R. D., Valéro J.R. and Surampalli R.Y. (2005). Wastewater sludge pre-treatment for enhancing entomotoxicity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1165–1174.

Table 1. *Bacillus licheniformis* process performance in pre-treated and raw sludge

Sludge type	Total count max (x 10⁹ CFU/mL)	Spore count max (x10⁷ CFU/mL)	μ_m (h⁻¹)	Protease activity (I.U./mL)
RAW	3.34	9.57	0.33	10.40
TAH	1.27	8.20	0.36	9.84
MIX	3.21	10.20	0.44	13.03
ISH	2.23	9.39	0.47	11.52

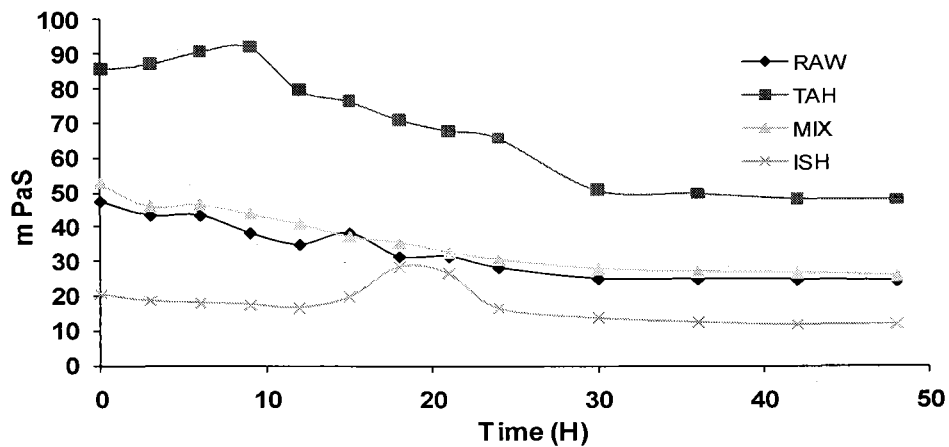
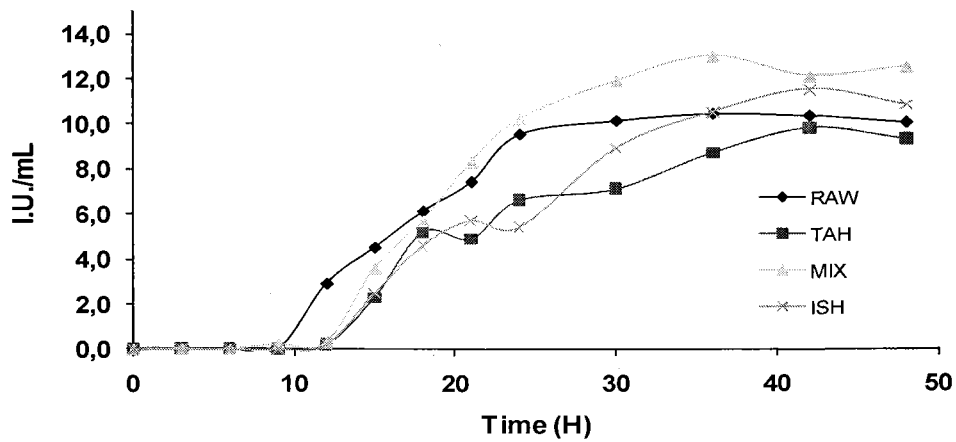
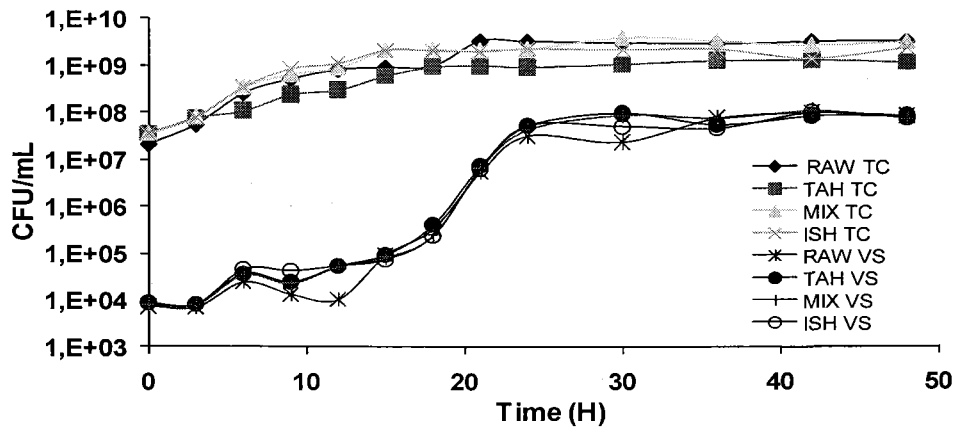


Figure 1 Evolution of total count (TC), viable spores (VS) (a), protease activity (b) and viscosity (c) during *Bacillus licheniformis* growth in different pre-treated sludges.

PARTIE 2

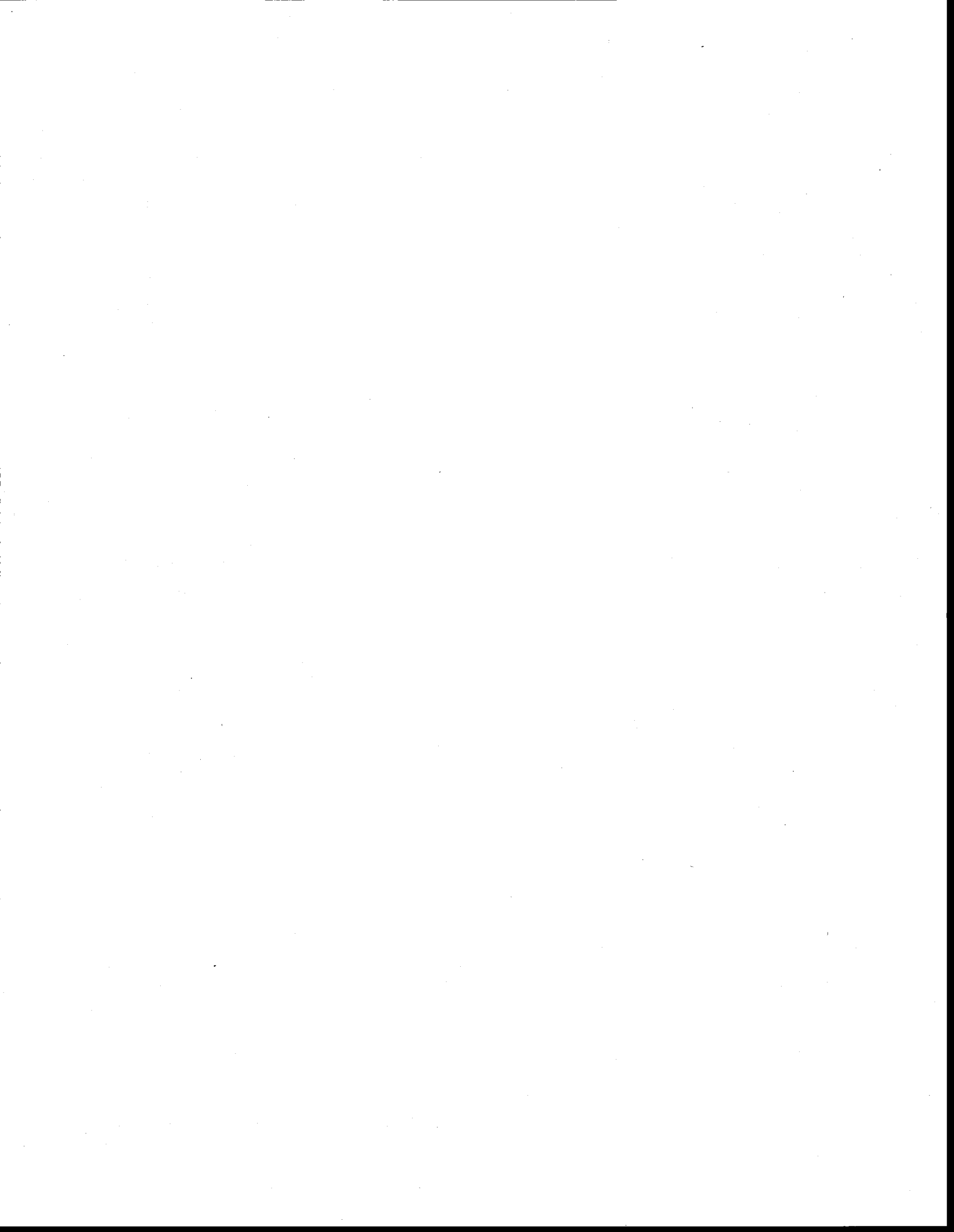
IMPROVEMENT OF MUNICIPAL WASTEWATER SLUDGE BIODEGRADABILITY TO ENHANCE THE PRODUCTION OF ALKALINE PROTEASE BY *BACILLUS* *LICHENIFORMIS*

M. Drouin*, S. Yan*, C.K. Lai*, R.D. Tyagi* and R.Y. Surampalli**

*Institut National de la Recherche Scientifique, centre Eau, Terre et Environnement, Université
du Québec, 490 de la Couronne, Québec, G1K 9A9, Canada

** US EPA, P.O. Box-17-2141, Kansas City, KS 66117, USA

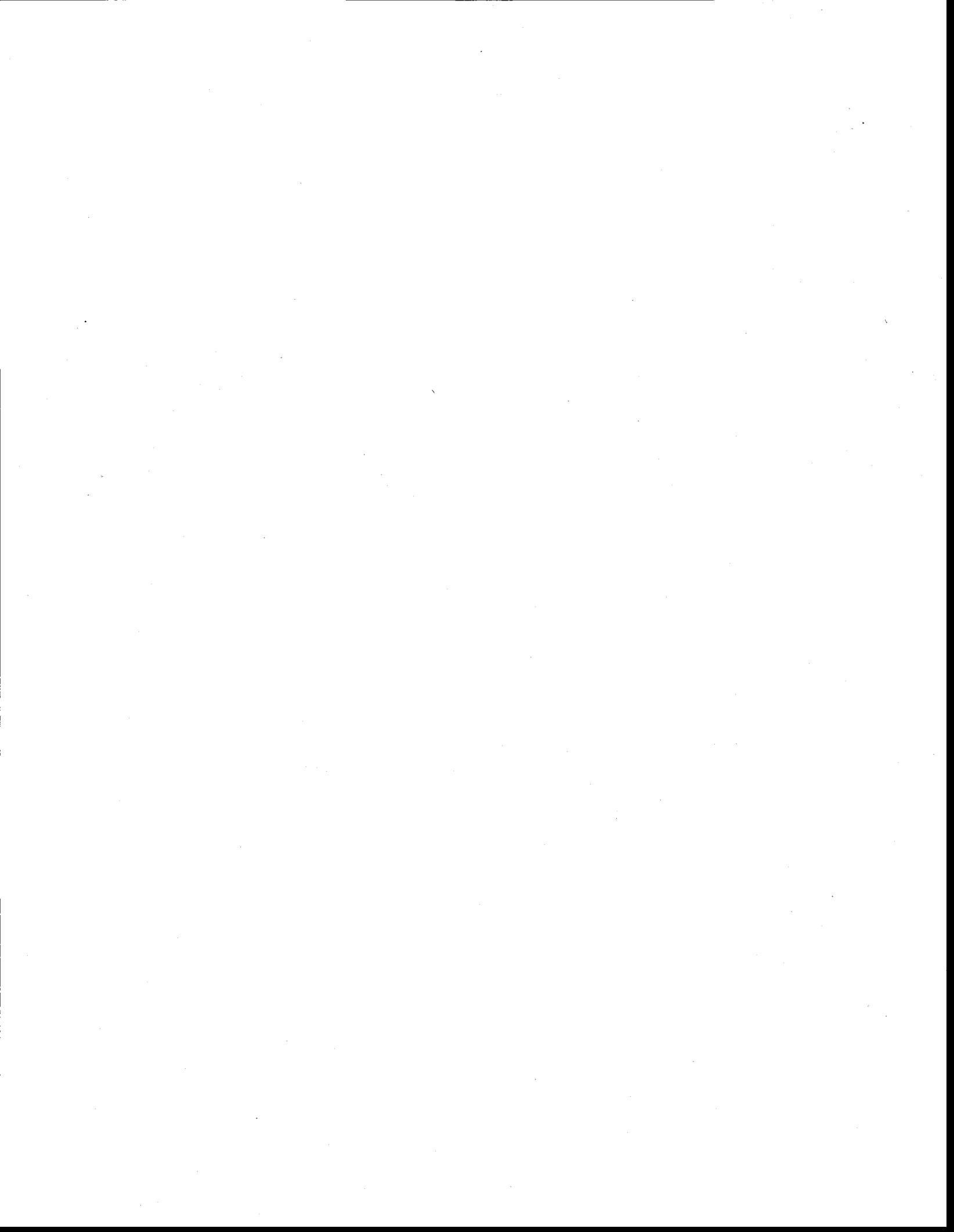
(SOUMIS À BIORESOURCE TECHNOLOGY)



RÉSUMÉ

Dans l'étude actuelle, les boues d'épuration ont été soumises à un prétraitement d'hydrolyse thermo-alkaline. Des fermentations ont été conduites avec *Bacillus licheniformis* en fermenteur de 15 L, en utilisant des boues non-prétraitées, prétraitées ainsi que différents mélanges de boues comme substrats de fermentation. De tous les milieux utilisés, un milieu constitué d'un mélange de boues non-prétraitées (75%) et de boues prétraitées (25%) a permis une augmentation de 78% de l'activité protéolytique en comparaison avec les boues non-prétraitées seulement. Ce résultat a été attribué à l'augmentation de la biodégradabilité et de la biodisponibilité des nutriments des boues ayant pu favoriser la croissance des cellules bactériennes pendant la phase de croissance, ainsi qu'à la présence de concentrations élevées de nutriments et/ou de protéines complexes ayant pu stimuler la production de protéases pendant la phase stationnaire. Malgré qu'une quantité importante d'enzymes puisse être récupérée directement dans le surnageant à la fin de la fermentation, les résultats ont démontré qu'une quantité appréciable d'enzyme demeure adsorbée sur les solides des boues, mettant ainsi en lumière la nécessité d'inclure une étape de désorption des enzymes dans les futures expériences. Les résultats ont aussi démontré que *B. licheniformis* produit des protéases possédant les mêmes caractéristiques dans les boues non prétraitées et les boues ayant subies un prétraitement thermo-alkalin, et que les boues d'épuration municipales constituent un substrat prometteur pour la production à faibles couts de protéases pouvant être incorporées comme additifs aux formulations de détergents. Le procédé de production de protéases permet aussi une diminution importante du volume des boues résiduelles devant être disposées à la fin de la fermentation.

Mots clés: boues d'épuration, prétraitement, protéase alcaline, *Bacillus licheniformis*, biodégradabilité.



ABSTRACT

In the current study, sludge was subjected to a thermal-alkaline pre-treatment. Fermentation with *Bacillus licheniformis* were conducted in bench-scale bioreactors (15L) using untreated, pre-treated sludge, and different untreated/pre-treated sludge mixtures as fermentative substrates. Among different sludges tested, a mixture of raw (75%) and pre-treated sludge (25%) resulted in an increase of 78% in the protease activity compared to the untreated sludge only. This result was due to the enhanced nutrient biodegradability and availability that could have favoured the growth of the bacteria during the growth phase, and to the presence of high concentration of complex nutrients or complex proteins that could have stimulated the production of protease during the stationary phase. Although a large amount of enzyme can be recovered directly in the supernatant at the end of fermentation, results demonstrated that an appreciable amount of enzyme stayed adsorbed to the solids, and highlighted the need of a desorption step in further experiments. The results also established that *B. licheniformis* produces proteases with same characteristics in untreated and thermo-alkaline pre-treated sludges, and that municipal wastewater sludge can be a promising new raw material to produce low-cost protease as additives to detergent formulations. The protease production process allowed a significant volume reduction of residual sludge that must be disposed at the end of the fermentation.

Key words: wastewater sludge, pretreatment, alkaline protease, *Bacillus licheniformis*, biodegradability.



2.5 INTRODUCTION

Proteases are important industrial enzymes, accounting for 40-60 % of the total sales of enzymes (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002a; Shrinivas *et al.*, 2012). Among these, alkaline proteases are a commercially dominant group of enzymes used in the manufacture of detergent, leather, food, and in peptide synthesis, waste-treatment processes and other industries. The alkaline proteases produced by microorganisms such as *Bacillus licheniformis* are extensively used as detergents additives and occupy a great part of the market (Gupta *et al.*, 2002a; Kumar and Takagi, 1999). Due to their commercial importance, cost-effective production of these enzymes is essential. The production costs of any cultivation are mainly affected by the medium composition and different fermentation process parameters. Generally, the proteases are produced in complex synthetic medium which is responsible for 30 to 40% of the production cost. (Kumar and Parrack, 2003; Joo *et al.*, 2002). The use of a less expensive medium for protease production would considerably lower the production cost. Drouin *et al.* (2011) showed that municipal wastewater sludge could be a suitable low cost medium to support cell growth and protease production by *Bacillus licheniformis*.

The nutrient concentration in the sludge plays an important role in the process performance. Drouin *et al.* (2011) found that the maximum protease activity was obtained in a sludge containing 35 g SS (suspended solids)/L. However, further increase in SS resulted in a decrease of protease activity, due to either inhibition by the substrate or low oxygen transfer capacity in the culture medium caused by high viscosity associated with high concentrated sludge (Brar *et al.*, 2004). These results showed that the sludge concentration could not be increased indefinitely in order to stimulate de production of proteases.

The nutrient content of the sludge can also have an influence on the process performance. Wastewater sludge is a complex and heterogeneous material containing different types of organic matter that has been classified as easily biodegradable, biodegradable, difficult to biodegrade and non-biodegradable (Tirado-Montiel *et al.*, 2003). Different methods have been tested to increase the biodegradability of difficult to biodegrade material that constitutes wastewater sludge (Barnabé, 2004; Ben Rebah *et al.*, 2001; Brar *et al.*, 2004; Yezza *et al.*, 2005). Among these methods, previous work showed that the thermo-alkaline pre-treatment of sludge is promising to enhance the protease activity produced by *Bacillus licheniformis*: The use of a mixture containing

equal amount of raw and thermal-alkaline pre-treated sludge resulted in an appreciable increase of protease activity compared to the untreated sludge (Drouin *et al.*, 2008). The increase of protease activity in mixed sludge was mainly attributed to an enhanced nutrient availability and biodegradability in the sludge. However, extended study was needed to understand the exact role of hydrolysis on nutrient availability and quality. Furthermore, different ratios of raw and hydrolyzed sludge and their effects on protease production also had to be investigated.

Moreover, the previous work (Drouin *et al.*, 2008) highlighted the problem of intense and uncontrollable foaming during fermentation of hydrolyzed sludge to produce protease enzyme. The addition of a large quantity of a chemical anti-foam agent was necessary throughout the fermentation which exhibited a great negative impact, leading to a dramatic increase of sludge viscosity and decrease in enzyme activity at the end of fermentation. The high viscosity could have also decreased the oxygen transfer creating dissolved oxygen (DO) limitation during the fermentation, a key parameter for protease production (Calik *et al.*, 2000, 2004). A repetition of the experiment, with a strategy to minimize foam formation, and thus to reduce the need of chemical anti-foaming agent during the fermentation is required in order to evaluate the real potential of pre-treated sludge.

2.6 MATERIALS AND METHODS

2.6.1 *Bacillus licheniformis* strain

Bacillus licheniformis ATCC 21424 (BL) was used in this study. An active culture was maintained by streak inoculating nutrient agar plates (3 g/L of beef extract, 5 g/L peptone and 15 g/L agar) and incubating at 35°C for 48 h. The plates were stored at 4°C.

2.6.2 Sludge sampling

The wastewater secondary sludge samples were collected from Québec municipal wastewater treatment plant. The experiments were conducted with settled sludge at SS concentration of 35 g/L. The sludge characteristics were measured according to Standard methods (APHA-AWWA-WPCF, 1989) and presented in Table 1.

2.6.3 Sludge pre-treatment

Four different types of sludge (with and without pre-treatment) were used in this study.

Raw sludge (RAW) (control): secondary sludge was settled by gravity settling to increase the suspended solids concentration in order to obtain the desired SS concentration (35 g/L).

Thermal alkaline hydrolysed sludge (TAH): the sludge was concentrated by centrifugation (> 60 g/L suspended solids concentration). The pH was adjusted to 10 by adding sodium hydroxide. Thermo-alkaline pre-treatment was conducted in 8 L working volume hydrolyser at 100 rev/min stirrer speed and 140°C for 30 min. Thermal energy was conveyed into the sludge by direct steam injection. Steam injection provided direct thermal contact with the sludge; however, it increased sludge volume, owing to condensation of a part of the injected steam and reducing the suspended solids (SS) concentrations. The concentration of sludge (SS) was further adjusted to the desired value (35 g/L) by dilution with sludge supernatant or by centrifugation.

Mixture of raw and hydrolysed sludge (MIX 1 and MIX 2). Two different mixed sludges were used. First, a mixture containing 75 % of raw sludge and 25 % of hydrolysed sludge, was used as fermentation medium (*MIX 1*). A second mixture, containing 25 % of raw sludge and 75 % of

hydrolysed sludge, was also used (*MIX 2*). The SS concentration of raw and hydrolysed sludge used to do the mixed sludge was previously adjusted to 35 g/L.

2.6.4 Inoculum preparation

An inoculum prepared in two steps was found to be optimal in our previous study (Drouin *et al.*, 2011) and was used in this study. A starting culture was prepared in 100 mL of nutrient broth with composition (g/L): beef extract - 3, peptone - 5. The preparation was carried out in an Erlenmeyer of 500 mL. The medium pH was adjusted to 7.5 by addition of 4N NaOH or 4N H₂SO₄ and then autoclaved (121°C, 15 min). The sterilised medium was inoculated with a loopful of *B. licheniformis* (*BL*) grown and stored on nutrient agar. The Erlenmeyers were incubated at 35°C under a constant agitation of 250 revolutions per minute (rpm) for 12 h in an incubator-shaker (Lab-Line, Dubuque, Iowa, USA). A 2% (v/v) of this broth (first stage inoculum) was used as seed culture to inoculate 500 mL Erlenmeyer flask containing 150 mL of the same medium as the fermentation substrate (raw or pre-treated sludge) (second stage inoculum). The suspended solids concentration used to grow the inoculum was 15 g/L. The flasks were then incubated in a rotary shaking incubator at 35°C and at 250 rpm for 12 h. Finally, a 4.5 % (v/v) of inoculum volume of the actively growing cells of the pre-culture was transferred to the fermentor.

2.6.5 Fermentation procedure

The experiments were carried out in two fermentors (15 L) (Biogénie Inc, Quebec, Quebec, Canada) equipped with agitation, aeration, temperature, pH, foam and dissolved oxygen (DO) control systems. The fermentors were filled with 8.5 L of culture medium, instead of 10 L (Drouin *et al.*, 2008), to allow more space for foam formation. Then, 20 mL solution of polypropylene glycol (Sigma-Aldrich, Canada) was added to fermentor as anti-foam agent during sterilization. Sterilization was carried out in situ at 121°C for 30 min. After cooling to 35°C, the fermentors were inoculated. Fermentations were carried out at 35 °C for 48 h. Agitation was controlled between 200 and 500 rpm whereas an aeration rate between 2 – 6 litre per minute (LPM) was used to keep the DO level above 20% of saturation. The pH was automatically controlled at 7.5 using either sterile solutions of sodium hydroxide (NaOH, 4 M) or sulphuric acid (H₂SO₄, 3 M) through computer controlled peristaltic pumps. Instead of a solution of polypropylene glycol (PPG) (Drouin *et al.*, 2008), a newly designed, more efficient mechanical

foam breaker was used to control the foam during the fermentation. Samples were drawn from the fermentor at regular intervals to perform the analysis.

2.6.6 Analytical

2.6.6.1 Soluble chemical oxygen demand (SCOD)

The method described in Standard methods (APHA-AWWA-WPCF, 1989) was used for SCOD determination.

2.6.6.2 Viscosity measurements

Viscosity analyses were carried out on fresh samples by using a rotational viscometer (DVII+, Brookfield) equipped with small sample adapter spindle (SC4 34, Brookfield). The calibration and the measurements were carried out according to the instrument's manual.

2.6.6.3 Measurement of volumetric oxygen transfer coefficient (K_{La}), OTR and OUR

The volumetric oxygen transfer coefficient (K_{La}), oxygen transfer rate (OTR) and oxygen uptake rate (OUR) measurements were based on the dynamic method (Aiba *et al.*, 1973). This technique consisted in interrupting the air input for a short period. After, the aeration is re-established. The decrease (aeration off) and the increase (aeration on) in DO concentration were recorded. K_{La} was determined from the mass balance on DO. The measurements were made just after each sampling of the fermentation broth.

The DO electrode was calibrated in the medium at 35°C. After, the electrode was transferred to air-saturated distilled water, at known temperature and ambient pressure. In these conditions, the saturation concentration of oxygen is known. The value then obtained was used to estimate the saturation concentration of oxygen in the cultivation media at 35 °C, and then to convert oxygen concentration in the fermentation broth from % air saturation to mmol O₂/L.

2.6.6.4 Cell and spore counts

The samples were serially diluted with sterile saline solution (0.85% w/v NaCl). The appropriately diluted samples (0.1 mL) were plated (3x) on nutrient agar plates and incubated at

35 °C for 16-24 h to form colonies. For spore count, the appropriately diluted samples were heated in a water bath at 80 °C for 10 min. After cooling, the samples were plated (3x). Afterwards, the fully developed colonies were counted. In order to establish the reliability and reproducibility of the plate count technique, 10 independent samples were drawn (at the same time) from a shake flask experiment and were serially diluted and plated. Each dilution was plated on three different plates. A standard deviation of 7% was calculated from the results.

2.6.6.5 Protease activity assay

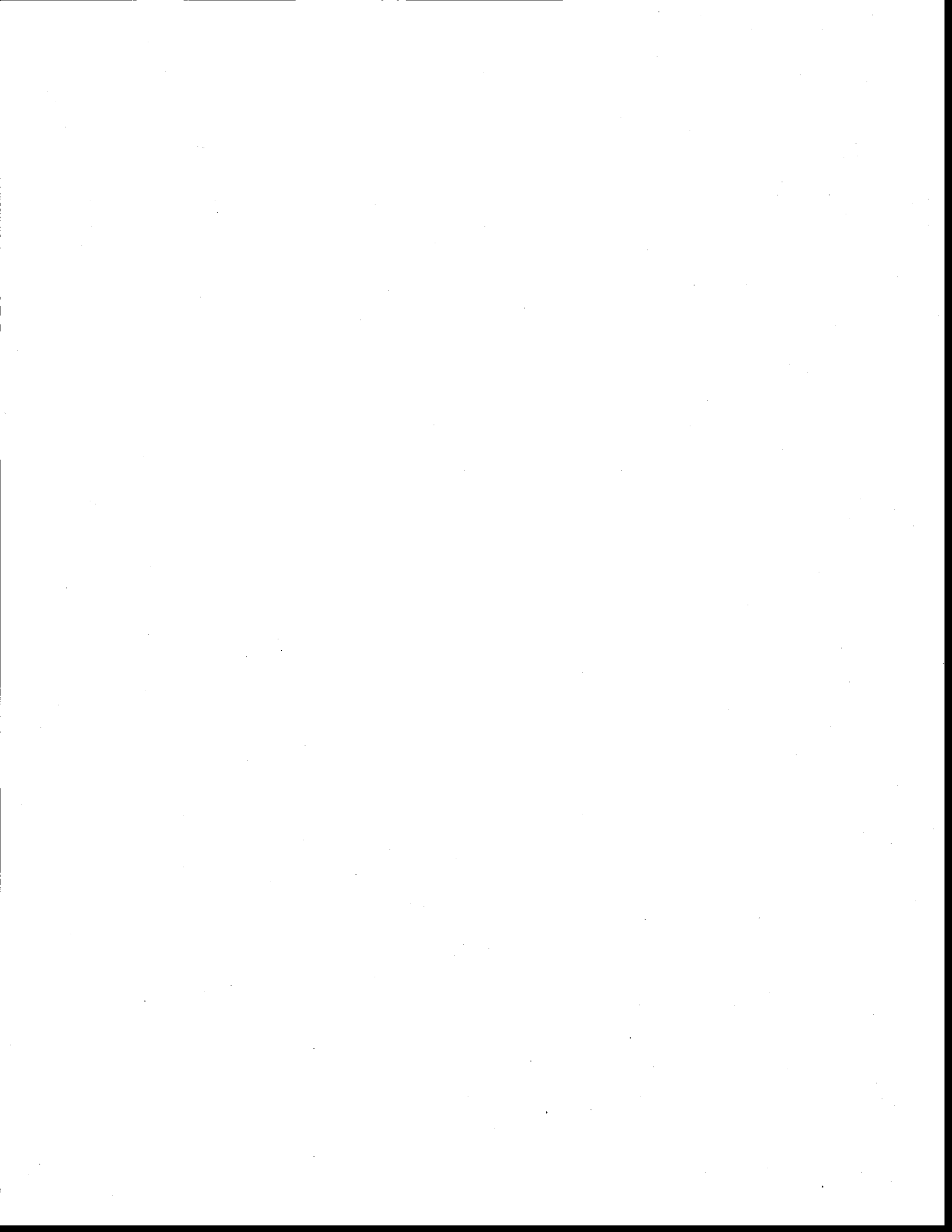
Protease activity was determined according to Kunitz (1947) with minor modifications. Samples collected from the fermentor were centrifuged at 3620 g (5000 rpm) for 10 min at 4 °C. The supernatant was appropriately diluted with borate buffer, pH 8.2. 1 mL of the properly diluted enzyme solution was incubated with 5 mL of casein solution (1.2% w/v) (Sigma-Aldrich, Canada) for 10 min, at 37 °C, in a constant temperature water bath. The reaction was then terminated by adding 5 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA). This mixture was incubated for 30 min in order to precipitate the total non-hydrolysed casein. Blanks were prepared with inactivated casein. At the end of this incubation period, the samples and the blanks were filtered using Whatman paper 934-AH (Whatman Inc, USA). The absorbance of the filtrate was measured at 275 nm using a Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian Techtron Pty. Ltd., Australia). Validation of the method was established by treating a standard enzyme solution of known enzymatic activity, in the same way and under the same conditions. One protease activity unit was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μ mole (181 μ g) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37 °C. In order to establish the reliability and reproducibility of the method, the procedure was repeated 10 times from a single sample. Statistical treatment of these results showed a maximal deviation of 5%.

For protease characterization, samples that gave the highest proteolysis activity in RAW and TAH sludges were used. The same test as described above were carried on the samples, but by using different buffers (from pH 6 to 12), at different temperatures (30, 45, 55, and 65°C).

2.6.6.6 Desorption of enzyme from solid phase

In order to evaluate the importance of enzyme adsorption on the solid phase, the following method was used: at the end of fermentation, 10 mL of broth was centrifuged (7650 g, 10 min,

4°C) for collecting the solid phase. The solid phase was re-suspended in 10 mL of buffer (pH 4), followed by a manual agitation for 5 min. The preparation was then re-centrifuged (7650 g, 10 min, 4°C). The supernatant (containing the desorbed enzymes) was kept for measurement of protease activity as describe in the above section. The desorption procedure was repeated with different pH buffers (6, 8.2 and 10).By knowing the SS concentration of the broth at the end of fermentation, the results can be expressed in I.U/g of suspended solids.



2.7 RESULTS

Evolution of viable cells, spore counts and protease activity during fermentation course of raw sludge (*RAW*), thermo-alkaline (*TAH*) and mixed sludge (*MIX 1* and *MIX 2*) are illustrated in Figures 1, 2, 3 and 4. The growth phases occurred during the first 18 h in *RAW* sludge, 21 h in *MIX 1* and *MIX 2* sludges. In case of *TAH* sludge, the growth phase was slightly longer, occurring during the first 24 h (Figures 1, 2, 3 and 4). For all types of sludge, the growth phase can be divided in two steps. In case of *TAH*, *MIX 1* and *MIX 2* sludges, a rapid growth occurred initially, followed by a slower growth (Figures 2, 3 and 4). In case of *RAW* sludge, a plateau observed between the rapid growth first step and the slower second growth step (Figure 1). The lowest cell count was observed in *RAW* sludge, whereas the maximum cell count was obtained in *TAH* sludge (Table 2). The lowest spore count was obtained in *RAW* sludge and the maximum in *MIX 1* sludge.

For all types of sludge, practically no protease activity was observed during the first hours of growth phase. Protease activity started to increase near the end of the growth phase and continued increasing during the stationary phase, until 30- 42 h, followed by a slight decrease (except for *TAH* sludge, where the maximum protease activity was recorded at 48 h). However, in *RAW* sludge, the production of proteases began earlier (12 h) whereas the production of protease was delayed in *TAH* (18 h), *MIX 1* and *MIX 2* (15 h). The maximum protease activity (18.41 I.U./mL) was observed in the *MIX 1* sludge. The minimum value (5.43 I.U./mL) was obtained in *TAH* sludge.

Profiles of K_{La} , OTR and OUR calculated during fermentation of *RAW*, *TAH*, *MIX 1* and *MIX 2* sludges are illustrated in Figures 1, 2, 3 and 4. In case of all the sludges tested, K_{La} , OTR and OUR increased in the beginning of the fermentation and attained a peak towards the end of the growth phase. For *TAH*, *MIX 1* and *MIX 2* sludges, the values of K_{La} , OTR and OUR then rapidly decreased followed by a tendency to become constant during the rest of the fermentation. In case or *RAW* sludge, after the peak, the values of K_{La} continued decreasing until the end of the fermentation. Maximum K_{La} values were higher in *TAH* and *MIX 2* sludge (188.3 and 134.1 h^{-1} , respectively) than in *RAW* and *MIX 1* sludge (95.7 and 106.2 h^{-1} , respectively).

The evolution of viscosity and soluble COD during fermentation can be followed in Figure 5. The initial viscosity was higher in *RAW* sludge than in *TAH* sludge. For both type of sludge, the viscosity decreased along the fermentation course. The highest initial soluble COD (SCOD) was recorded in *TAH* sludge, whereas the lowest was recorded in *RAW* sludge. For *RAW* sludge, the SCOD decreased from the beginning to 15 h. In case of *MIX 1* sludge, the SCOD was almost constant from the beginning to 15 h, followed by a decrease from 15 to 24 h. The SCOD after 24 h remained almost constant until the end of fermentation for both *RAW* and *MIX 1* sludges. In case of *TAH* sludge, the SCOD decreased from the beginning to the end of fermentation.

For both *RAW* and *TAH* sludge, the sample that gave the higher protease activity (T-30 h and T-48 h sample, respectively) was selected to evaluate the effect of pH and temperature on the protease activity. The results were illustrated in Figure 6. The proteases produced in *RAW* and *TAH* sludges were active on a wide range of pH and temperature. The profiles of protease activity in function of pH and temperature in both sludges were very similar: The protease became more active as the pH increased from 6 to 9. In that range of pH, the activity increased with temperature until 65°C. At higher pH (10), the activity continued to increase at temperature 30, 45 and 55 °C, whereas it decreased at 65 °C. Thus, for protease produced in *RAW* and *TAH* sludge, the peak of protease activity was recorded at pH 10 and temperature 55 °C (34.8 and 20.9 I.U./mL, respectively). For every temperature tested, an increase in pH over 10 caused a decrease in the protease activities.

The results presented in Table 3 showed that in both *RAW* and *MIX 1* sludges, some enzymes were desorbed from the solid phase. Irrespective of the pH buffer used, the values obtained in *MIX 1* were always higher than in *RAW* sludge. The protease activity increased with the increase in pH, with maximum protease activity recorded at pH 10, for both *RAW* (34.7 U.I./g SS) and *MIX 1* (42.4 U.I./g SS) sludge.

2.8 DISCUSSION

2.8.1 Relation between cell, spore count and protease activity

The results showed that there was no direct relation between cell count and protease activity, in accordance with the results reported by Drouin *et al.* (2008). Even if the maximum cell counts were obtained in *TAH* sludge, the protease activity measured was the lowest (Table 2). The highest protease activity value was obtained in *MIX 1* sludge, and the maximum cell counts were recorded in *RAW* sludge. The relation between spore count and protease activity is difficult to establish. Many workers suggested that some common mechanism could be implied in the initiation of sporulation and proteases production (Kumar *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2002b). In all types of sludge, the production of protease activity began when the cells entered in sporulation phase and the protease activities increased until the number of spores increased. Almost no increase or very little increase in protease activities were recorded after the spore count reached plateau (Figures 1, 2, 3 and 4). In previous work (Drouin *et al.*, 2008 and 2011), a substantial increase in protease activity was recorded after cessation of spore count increase. From these past and present results, it is difficult to clearly establish nature of the relation between spores and protease activity.

2.8.2 Effect of sludge pre-treatment on growth and protease activity

2.8.2.1 Effect on growth

Concentrations of soluble nutrients are thought to be very low in dewatered sludge. In fact, secondary sludges are mostly composed of microbial cells. Anyway, the sterilization of sludge, prior to fermentation, ruptured the cell walls to liberate some intracellular (easily assimilable) soluble components in the sludge supernatant. This can be illustrated but the fact is that, even if the SS concentration was initially adjusted to 35 g/L, it was slightly lower (30.4 g/L) after sterilisation (Table 3) in case of *RAW* sludge. In case of *TAH* sludge, the value remained at 35g/L after sterilization because the phenomenon of cell wall disruption already occurred during the hydrolysis pre-step. During the growth phase, the cells grow and assimilate preferably the easily available substrate or soluble sources of carbon and nitrogen. This could explain a decrease in SCOD observed during the growth phase (0-20 h) in *RAW*, *TAH* and *MIX 1* sludges (Figure 5).

Wastewater sludge has also a tendency to form flocs. Thermo-alkaline pre-treatment of sludge breaks the flocs, and the disruption of the sludge cells is even more severe than during the sterilisation process. This phenomenon makes the carbohydrates, proteins and other nutrients even more accessible for the growing cells. The pre-treatment also causes hydrolysis of the proteins, polysaccharides, lipids and other complex macromolecules into more simple forms and significantly enhance the amount of dissolved organic matter (Barjenbruch and Kopplow, 2003; Mantzavinos and Psillakis 2004; Muller *et al.*, 2004). This can be demonstrated by the initial values of total solids (TS_i) given in Table 3, significantly higher in *TAH* than in *RAW* sludge, even if the SS concentration was initially adjusted to 35g/L in both media: This also explains the highest initial SCOD measured in *TAH* sludge, in comparison with *RAW* sludge (Figure 5). Thus, difficult to degrade, complex compounds present in sludge were transformed into easily degradable ones. Moreover, the volatile total solids/total solids ratio is higher in *RAW* sludge (31.8/38.2) than in *TAH* sludge (29.4/50.5), suggesting that mineralization of organic matters occurred during the thermal-alkaline hydrolysis of sludge. Thus, the enhanced nutrient biodegradability and availability in pre-treated sludge favoured the growth of the bacteria (Yezza *et al.*, 2005).

Moreover, in wastewater sludge the cells get embedded in the flocs, as a major portion of nutrients is present in the sludge solid phase. This could result in a limited oxygen transfer capacity between gas and liquid phase during growth (Vidyarthi *et al.*, 2002). During the thermal-alkaline hydrolysis, the chemical and physical changes in sludge structure (solubilisation of sludge constituents, disruption of sludge flocs and cellular structure) decreased the initial viscosity of the sludge (Yezza *et al.*, 2005). This explained why the initial viscosity was lower in *TAH* sludge and remained lower in *TAH* sludge throughout the fermentation, in comparison with *RAW* sludge (Figure 5). As the viscosity decreased, air in the fermentor fluid becomes better distributed in the form of small bubbles throughout the fermentation medium (Ozergin-Ulgen and Mavituna, 1998; Ozbek and Gayik, 2001). The benefit of small bubbles is slow rising velocities which keep air bubbles in the liquid longer, allowing more time for the oxygen to dissolve (Yezza *et al.*, 2005). Consequently, a decrease in viscosity allowed a better oxygen transfer capacity during the fermentation, which could explain the higher K_La values recorded in *TAH* sludge compared to *RAW* sludge. The Enhanced oxygen transfer capacity in pre-treated sludge could have favoured the growth of the bacteria.

The enhancement in nutrient availability and biodegradability, combined with a better oxygen transfer capacity, could explain the higher amount of cells obtained in *TAH*, *MIX 1* and *MIX 2* sludges, in comparison with the *RAW* sludge (Table 2).

2.8.2.2 Effect on protease activity

Drouin *et al.* (2008) found that the protease activities measured in thermal-alkaline hydrolyzed sludge were lower than those measured in raw sludge. In these previous experiments, the viscosity measured in hydrolyzed sludge was almost two times of that in raw sludge, because of the large amount of anti-foam agent (PPG) added throughout the fermentation to control the foam. As discussed above, the viscosity has a great negative impact on the oxygen transfer. It was suggested that the higher viscosity of hydrolysed sludge could have caused a decrease of the oxygen transfer capacity of the medium, a key parameter for protease production (Calik *et al.*, 2000, 2004) which could explain low values of protease activities obtained in hydrolysed sludge.

The results obtained in present work weakened this hypothesis. In present experiments, the use of lower working volume (8.5 L instead of 10 L), combined with a more efficient mechanical foam breaker (less amount of PPG was used during the fermentation) was a suitable way to control foam. Thus, the viscosity measured in *TAH* sludge was lower than the viscosity measured in *RAW* sludge (Figure 5). However, the protease activities measured in *TAH* sludge were again lower than those measured in *RAW* sludge (Table 2). According to these results, another explanation can be suggested.

As mentioned above, during the growth phase, the cells are assimilating preferentially the easily available, soluble sources of carbon and nitrogen. Easily assimilable substrates have been known to have an inhibiting effect on protease production (Kumar and Takagi, 1999). This could explain why no or very low protease activities were recorded during the growth phase. As a comparison, in a synthetic media containing glucose, the glucose was quickly metabolized during growth and it was found that protease production started when glucose was exhausted in the medium (Beg *et al.*, 2002; Ferrero *et al.*, 1996). The same phenomenon probably occurred in *RAW* sludge: at the end of the growth phase, the easily available substrates were almost entirely consumed and the presence of high concentration of complex nutrients or complex proteins stimulated the production of proteases (Yezza *et al.*, 2005). In case of *TAH* sludge, these complex nutrients or proteins were already hydrolyzed into simpler materials during pre-treatment. In that way, the

SCOD decreased all along the fermentation in *TAH* sludge, whereas it decreased during the growth phase (0-20 h), but remained almost constant during the stationary phase (20-48 h) in case of *RAW* and *MIX 1* sludge (Figure 5). These results strongly suggested that the cells were still metabolizing soluble, easily assimilable nutrients during the stationary phase in *TAH* sludge, which had an inhibiting effect on protease production. This could explain the lower specific cellular protease activity (I.U./10⁹ bacterial cell; $Y_{p/x}$) obtained in *TAH* sludge (0,83) than in *RAW* sludge (4.15) (Table 2).

2.8.2.3 Mixture of raw and hydrolyzed sludge to improve the protease activity

Drouin *et al.* (2008) found that the use of an equal mixture of raw and thermal-alkaline pre-treated sludges resulted in an appreciable increase (15%) of protease activity compared to the untreated sludge. In the present study, different ratios of raw and hydrolyzed sludge have been investigated. The use of a mixture of 75% raw sludge and 25% hydrolyzed sludge (*MIX 1*) lead to a dramatic increase (78%) in protease activity (Table 2). This could be due to the fact that the easily assimilable substrate supplied by the hydrolyzed sludge fraction stimulated growth of the bacteria during the growth phase (0-20 h). In fact, the number of cells obtained in *MIX 1* sludge was almost the same as the number of cells obtained in *TAH* sludge (Table 2). Moreover, the presence of high concentration of complex nutrients or complex proteins supplied by the raw sludge fraction stimulated the production of protease during the stationary phase (20-48 h). This could explain the high value of $Y_{p/x}$ obtained in *MIX 1* sludge, in comparison with *TAH* sludge (Table 2). The presence of remaining easily assimilable substrate (supplied by the hydrolyzed sludge part) during stationary phase in *MIX 1* could explain why the $Y_{p/x}$ was slightly lower in *MIX 1* sludge than in *RAW* sludge.

2.8.3 Desorption of protease from sludge solids

At the end of fermentation, the proteases were recovered from the supernatant of the fermentation broth. As discussed earlier, sludge is a complex and heterogeneous material containing different types of organic matter. There are lot of possible interactions between enzymes and solid organic matter. A portion of enzymes can stay adsorbed on the solid organic matter. Variations in pH can change the nature of theses interactions and liberate the enzyme in the supernatant. The maximum values of protease activity from desorbed enzyme were recorded when a pH 10 buffer was use for the desorption in both *RAW* and *MIX 1* sludges (Table 3). The higher values of protease activity

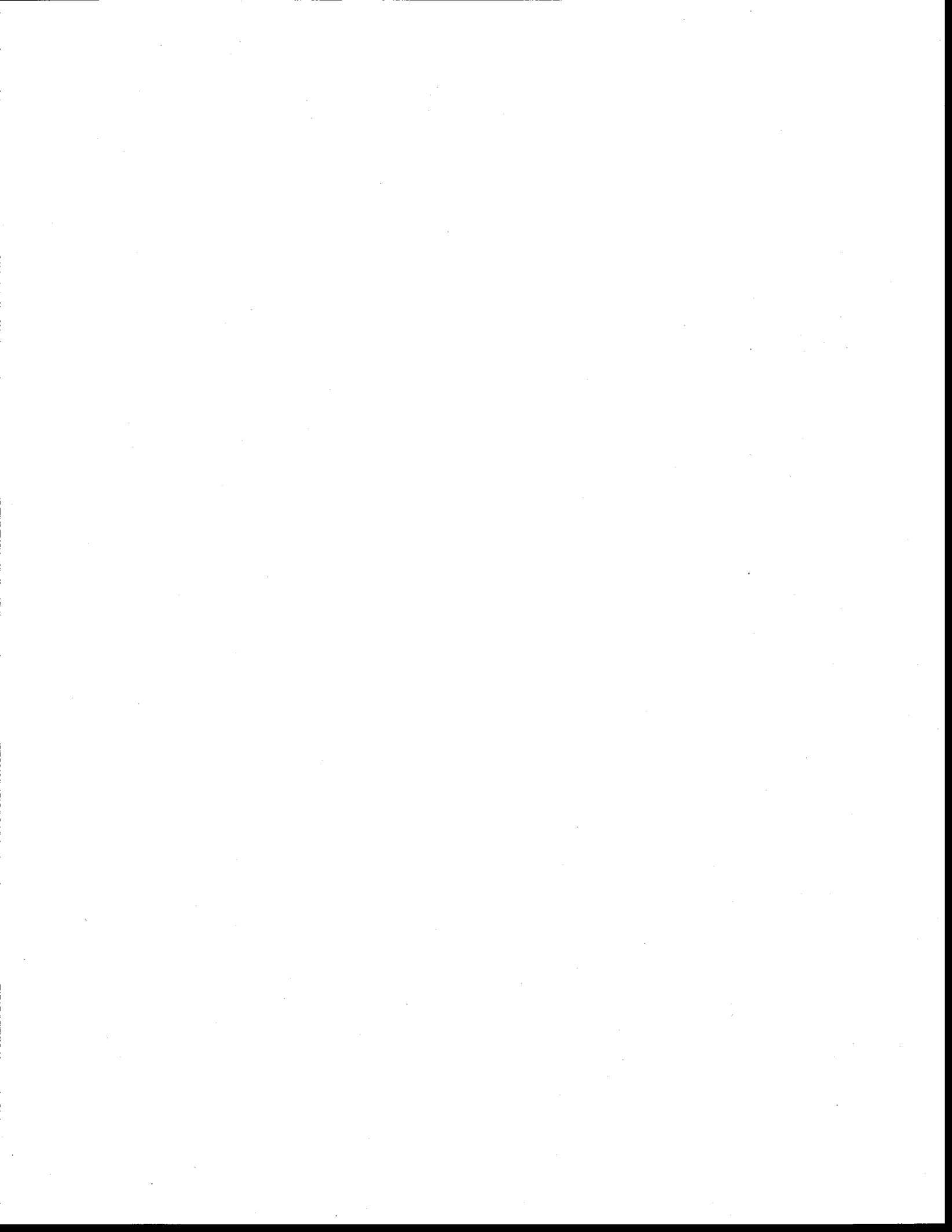
obtained from *MIX 1* sludge strongly suggested that more enzymes tended to stay adsorbed to solids in a mixture of raw and hydrolysed sludge, than in raw sludge only. These results demonstrated that a desorption step is required before the recovery of enzyme from supernatant in future experiment, in order to increase the amount of enzyme to be recovered.

2.8.4 Influence of sludge composition on protease characteristics

The profiles of protease activity as a function of pH and temperature for proteases produced in *RAW* and *TAH* sludge were very similar (Figure 6). In fact, the characteristics of the sludge did not influence the characteristics of the protease produced. This observation strongly suggested that *B. licheniformis* produced proteases with same characteristics in *RAW* and *TAH* sludges. In both media, the peak of protease activity was recorded at pH 10, Temperature 55 °C. These results were in accordance with Sinha and Satyanarayana (1991), who reported maximum protease activities at pH 10 and 55 °C for *B. licheniformis* proteases produced in synthetic media. Moreover, even at higher temperature (65 °C), the proteases were still very active. These results established that the proteases produced by *B. licheniformis* in sludge could be industrially important from the perspectives of their ability to function at alkaline pH, at high temperature and to be stable in broad pH ranges and temperature. These characteristics suggest that the municipal wastewater sludge can be promising new raw material to produce low-cost protease as additives to detergent formulations.

2.8.5 Residual sludge from the process

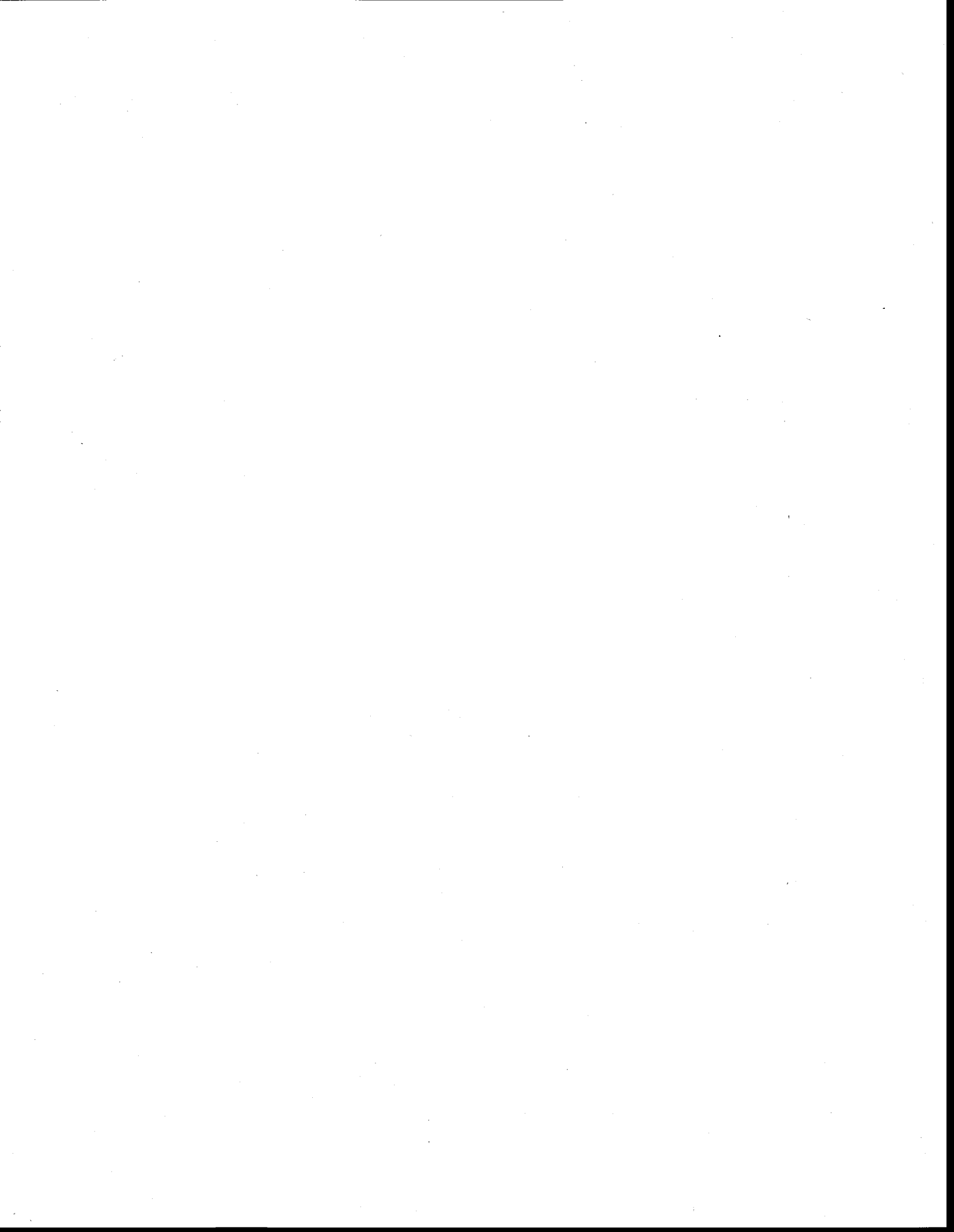
At the end of fermentation, the supernatant is processed to recover the enzymes. The solid fraction of the broth consisted of residual sludge that must be disposed. However, the final values of suspended solids concentration (SS_f) in *RAW* and *MIX 1* sludge are 21.6 and 22.3 g/L respectively (Table 2), while the solid concentration of *RAW* sludges was adjusted to 35 g/L, prior to sterilization. These results showed that the mass of solids is strongly reduced during fermentation. Furthermore, in case of *MIX 1* sludge, the reduction of solid is even more important, as the sludge fraction submitted to hydrolysis was initially concentrated to more than 60 g/L.



2.9 CONCLUSIONS

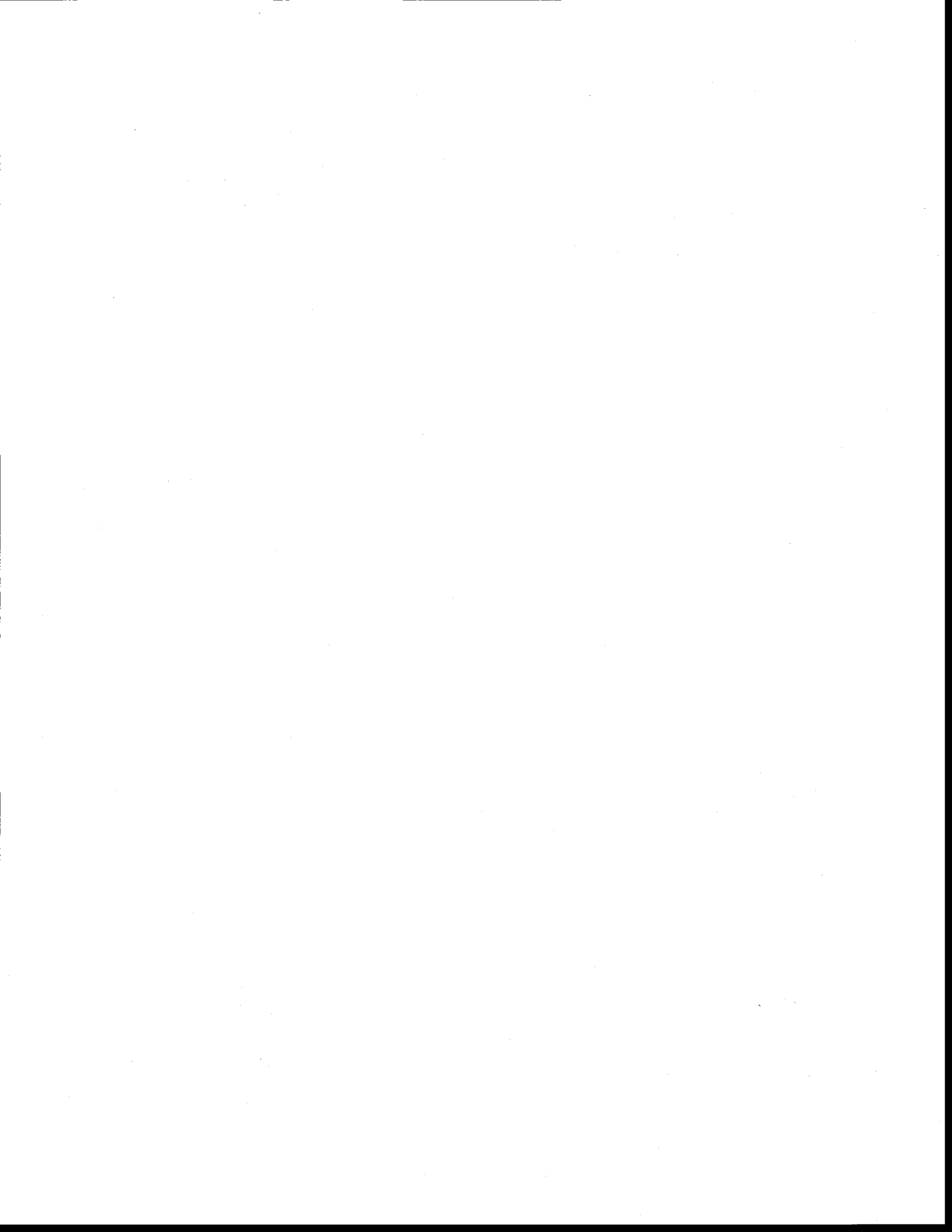
The following conclusions were drawn from the foregoing study:

1. The thermal-alkaline hydrolysis of sludge caused an enhancement in nutrient biodegradability and availability, and allowed a better oxygen transfer capacity during the fermentation, which favoured the growth of the bacteria.
2. The high concentration of easily assimilable substrate in hydrolysed sludge had a strong inhibiting effect on the protease production.
3. A mixture of 75% raw sludge and 25% hydrolyzed sludge as fermentation media led to an increase in protease activity, in comparison with raw sludge only.
4. Proteases produced in sludge had the same characteristics as the ones produced in synthetic medium. Thus, wastewater sludge proved to be a good raw material to produce low-cost protease as additives to detergent formulations.
5. The results showed that some proteases remained adsorbed to the solid fraction of the broth. So, adding desorption step in further experiment could be an interesting avenue to increase the amount of protease activity recovered.
6. The protease production process allowed a reduction of residual sludge volume to be disposed.



ACKNOWLEDGEMENTS

Sincere thanks are due to the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (Grant A 4984, strategic grant and Canada Research Chair) for their financial support. The views and opinions expressed in this paper are those of the authors



REFERENCES

Aiba S., Humphrey A.E. and Millis N.F. (1973). *Biochemical Engineering*, 2^e Édition, Academic Press, New-York, États-Unis, 434 pages.

APHA, AWWA and WPCF, 1989. *Standard methods for examination of water and wastewaters*, 17th Edition. Washington: American Public Health Association.

Barnabé S. (2004). *Hydrolyse et oxydation partielle des boues d'épuration comme substrat pour produire Bacillus thuringiensis HD-1 (Hydrolysis and partial oxydation of wastewater sludge as raw material to produce Bacillus thuringiensis HD-1)*. PhD Thesis, INRS-ETE, Université du Québec, Canada. 235 pages.

Barjenbruch M. and Kopplow O. (2003). Enzymatic, mechanical and thermal pre-treatment of surplus sludge. *Adv. Environ. Res.* 7: 715–720

Beg Q.K., Saxena R.K. and Gupta R. (2002). De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. *Process Biochem.* 37: 1103-1109.

Ben Rebah F. Tyagi R.D. and Prévost D. (2001). Acid and alkaline treatments for enhancing the growth of rhizobia in sludge. *Can. J. Microbiol.* 47: 467–474.

Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y. and Banerji S.K. (2004). Comparative rheology and particle size analysis of various types of *Bacillus thuringiensis* fermented sludges. *J. Residuals. Sci. Technol.* 1: 231–237.

Calik P., Calik G. and Ozdamar T.H. (2000). Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Bioeng.* 69 (3): 301-311.

Calik G., Pehlivan N., Ozcelik L.S., Calik P. and Ozdamar T.H. (2004). Fermentation and oxygen transfert characteristics in serine alkaline protease production by recombinant *Bacillus subtilis* in molasses-based complex medium. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79: 1243-1250.

- Drouin M., Yan S., Tyagi R.D., Valéro J.R. and Surampalli R.Y. (2011). Production of alkaline proteases using wastewater sludge as a raw material. Submitted to *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*
- 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 (3): 423-429.
- Ferrero M.A., Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D. and Sineriz F. (1996). Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29 : isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 327-332.
- Godfrey T. and West S.I. (1996). Introduction to industrial enzymology. In: *Industrial enzymology*, 2^e Édition, Godfrey T. and S.I West, Stockton Press, New-York, États-Unis, pp. 1-8.
- Gupta R., Beg Q.K. and Lorenz P. (2002a). Bacterial alkaline proteases : molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 15-32.
- Gupta R., Beg Q.K., Khan S. and Chauhan B. (2002b). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 381-395.
- Kumar G. and Parrack P. (2003). Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 757-762.
- Kumar C.G. and Takagi H. (1999). Microbial alkaline proteases : From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* 17: 561-594.
- Kunitz M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310.
- Joo H-S., Kumar C.G., Park G-C., Kim K.T., Paik S.R. and Chang C-S. (2002). Optimisation of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochem.* 38: 155-159.
- Muller J.A., Winter A. and Strunkmann G. (2004). Investigation and assessment of sludge pre-treatment processes. *Water Sci. Technol.* 49: 97-104.

Mantzavinos D. and Psillakis E. (2004). Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pretreatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79: 431–454.

Ozbek B. and Gayik S. (2001). The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochem.* 36: 729-741.

Ozergin-Ulgen K. and Mavituna F. (1998). Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces Coelicolor* A3(2) culture in a batch bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73: 243-250.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. and Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 62 (3): 597-625.

Shrinivas D., Kumar R. and Naik G.R. (2012). Enhanced production of alkaline thermostable keratinolytic protease from calcium alginate immobilized cells of thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39: 93–98.

Sinha N. and Satyanarayana T. (1991). Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*. *Indian J. Microbiol.* 31 (4): 425-430.

Tirado-Montiel M.L., Tyagi R.D., Valéro J.R. and Surampalli R.Y. (2003). Production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material – effect of process parameters. *Water Sci. Technol.* 48: 239–246.

Vidarthi A.S., Tyagi R.D., Valéro J.R. and Surampalli R.Y. (2002). Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Res.* 36: 4850–4860.

Yezza A., Tyagi R. D., Valéro J.R. and Surampalli R.Y. (2005). Wastewater sludge pre-treatment for enhancing entomotoxicity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1165–1174.

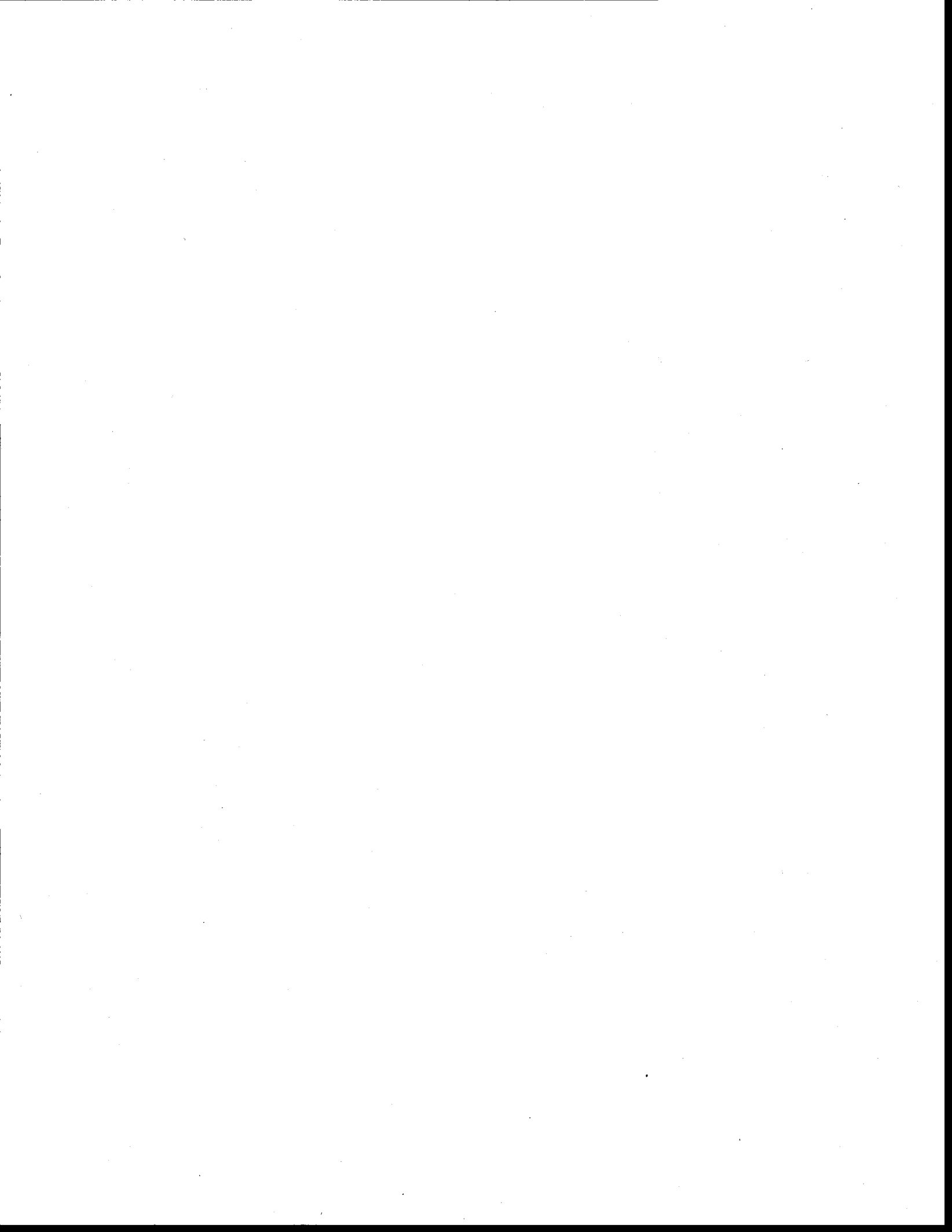


Table 1. Characteristics of secondary sludge obtained from CUQ.

Parameters	Concentration
<i>Physical characteristics</i>	
TS (g/L)	32.0
TVS (g/L)	22.0
SS (g/L)	27.0
VSS (g/L)	20.8
<i>Chemical characteristics</i>	
C _t (mg/kg)	3,83 x 10 ⁵
N _t (mg/kg)	5,59 x 10 ⁴
P _t (mg/kg)	1,13 x 10 ⁴
N-NH ₃ (mg/kg)	1,01 x 10 ³
P-PO ₄ (mg/kg)	6,79 x 10 ³
<i>Metals</i>	
Al (mg/kg)	6,67 x 10 ³
Ca (mg/kg)	1,61 x 10 ⁴
Cd (mg/kg)	0.73
Cr (mg/kg)	37.0
Cu (mg/kg)	190
Fe (mg/kg)	1,22 x 10 ⁴
K (mg/kg)	207 x 10 ³
Pb (mg/kg)	38.0
S (mg/kg)	5,79 x 10 ³
Zn (mg/kg)	314
Na (mg/kg)	1,54 x 10 ³

All results are presented on dry weight basis.

Table 2. Process Performance of *Bacillus licheniformis* in different sludge tested

	<i>RAW</i>	<i>TAH</i>	<i>MIX 1</i>	<i>MIX 2</i>
Suspended solids _i (SS _i)(g/L)*	30.4	34.9	29.9	32.4
Total solids _i (TS _i) (g/L)*	38.2	50.5	43.8	47.1
Volatile suspended solids _i (VSS _i) (g/L)*	23.5	17.6	17.3	18
Volatile total solids _i (VTS _i)(g/L)*	31.8	29.4	31.0	25.3
Suspended solids _f (SS _f) (g/L)**	21.6	-	22.3	-
Total solids _f (TS _f) (g/L)**	37.8	-	42.9	-
Volatile suspended solids _f (VSS _f) (g/L)**	13.9	-	13.0	-
Total count _{max} (10 ⁹ CFU/mL)	2.48	6.53	6.13	3.43
Spore count _{max} (10 ⁸ CFU/mL)	1.10	2.93	4.63	2.61
K _{La} peak (h ⁻¹)	95.7	188.3	106.2	134.1
OTR peak (mmol/L.h)	2.90	4.03	2.82	3.34
OUR peak (mmol/L.h)	1.33	1.98	1.54	1.51
Protease activity _{max} (I.U./mL)	10.31	5.43	18.41	8.87
Y _{p/x} (I.U./10 ⁹ bacterial cell)	4.15	0.83	3.00	2.50

*i: initial value (taken after sterilization, before inoculation)

**f: final value (taken at the end of fermentation)

Table 3. Residual protease activity (I.U./g SS) of enzymes desorbed from solids with different pH buffers in RAW and MIX 1 sludge

Buffer	Resulting protease activity (I.U./g SS)	
	<i>RAW</i>	<i>MIX 1</i>
pH 4	7.79	19.16
pH 6	12.75	33.71
pH 8.2	29.51	40.45
pH 10	34.70	42.38

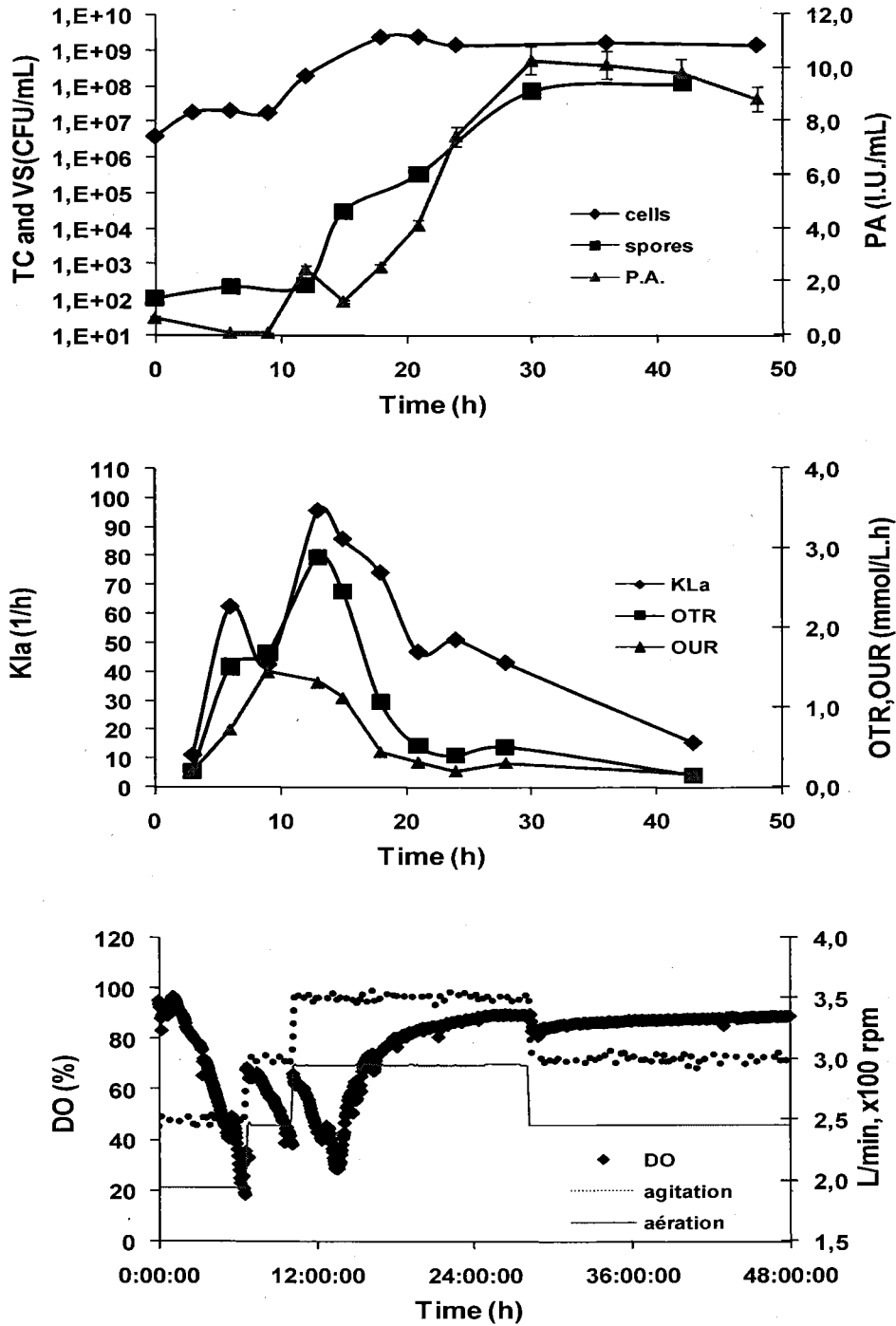


Figure 1: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), K_{La} , OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates during *Bacillus licheniformis* growth in RAW sludge.

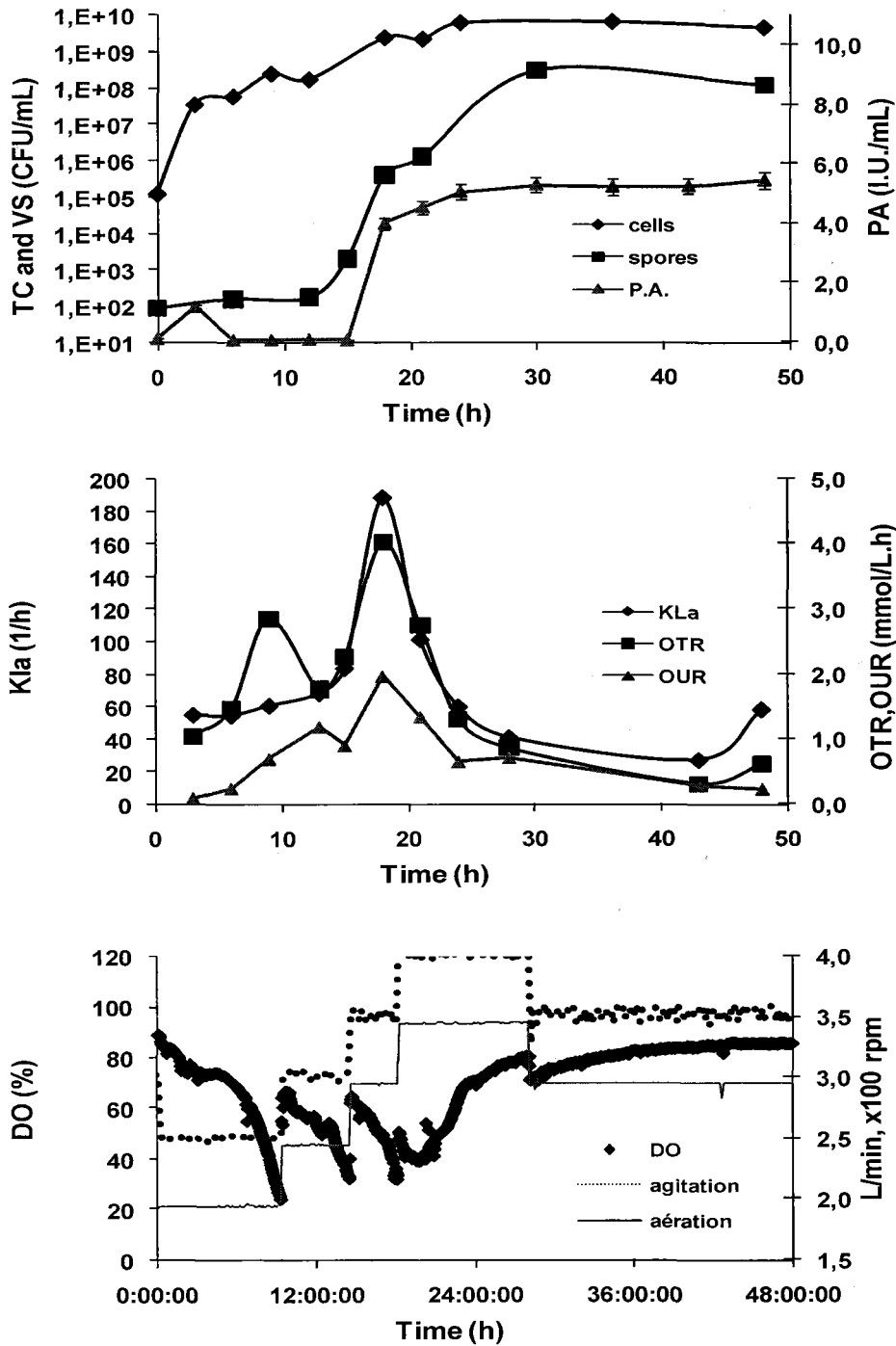


Figure 2: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa, OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates during *Bacillus licheniformis* growth in TAH sludge.

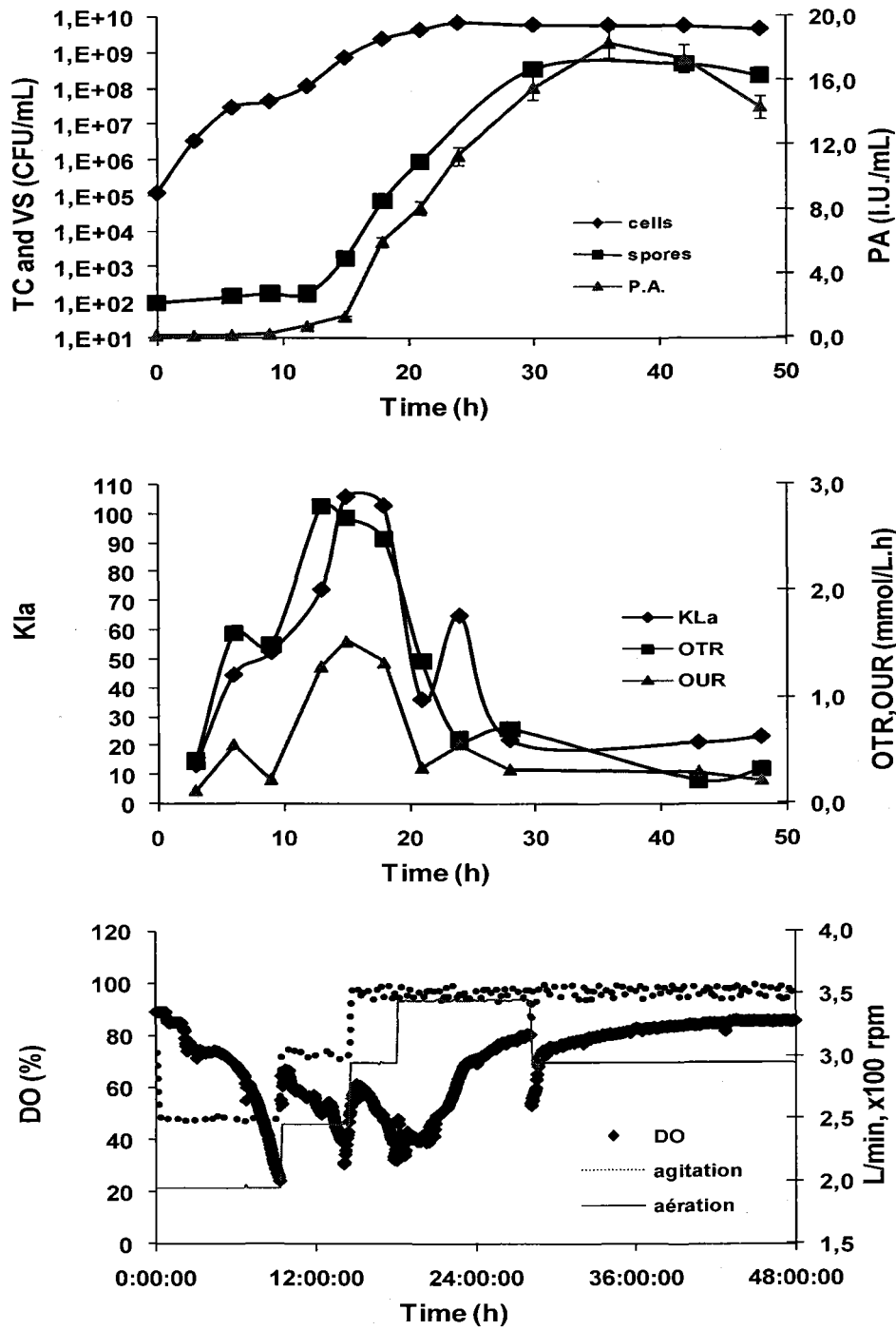


Figure 3: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), $K_L a$, OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates during *Bacillus licheniformis* growth in MIX 1 sludge.

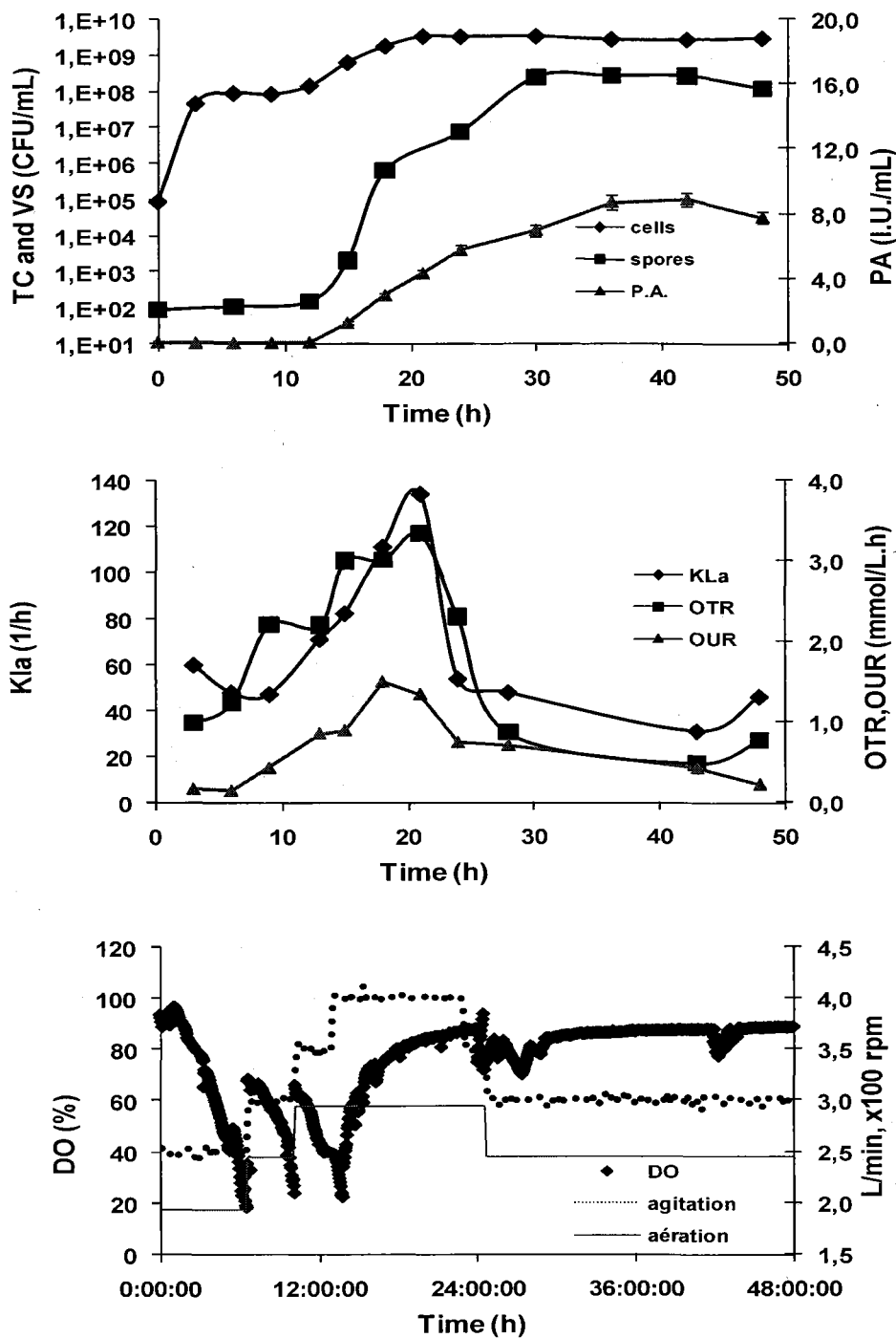


Figure 4: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), $K_L a$, OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates during *Bacillus licheniformis* growth in MIX 2 sludge.

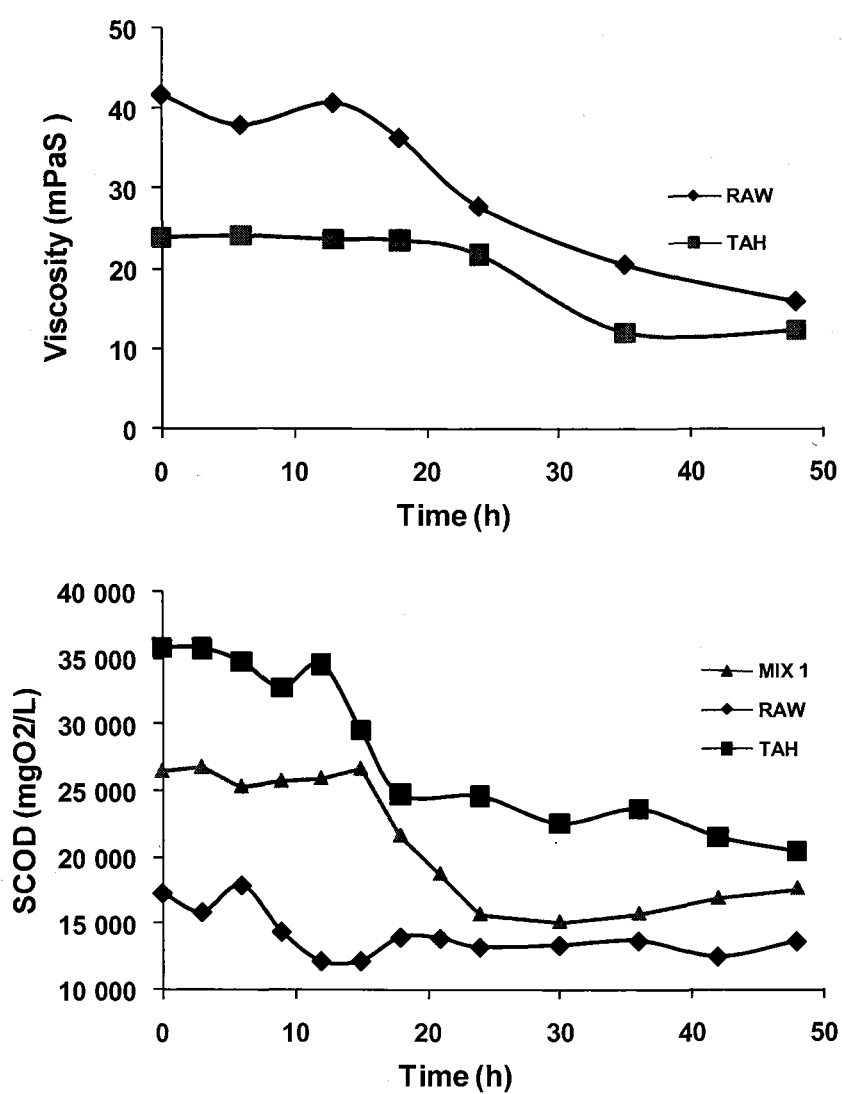


Figure 5: Evolution of the viscosity (a) and soluble COD (b) during *Bacillus licheniformis* growth in different sludges.

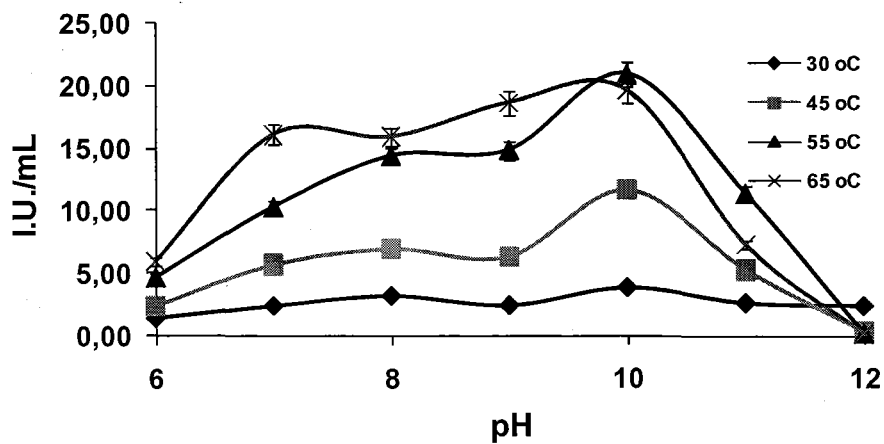
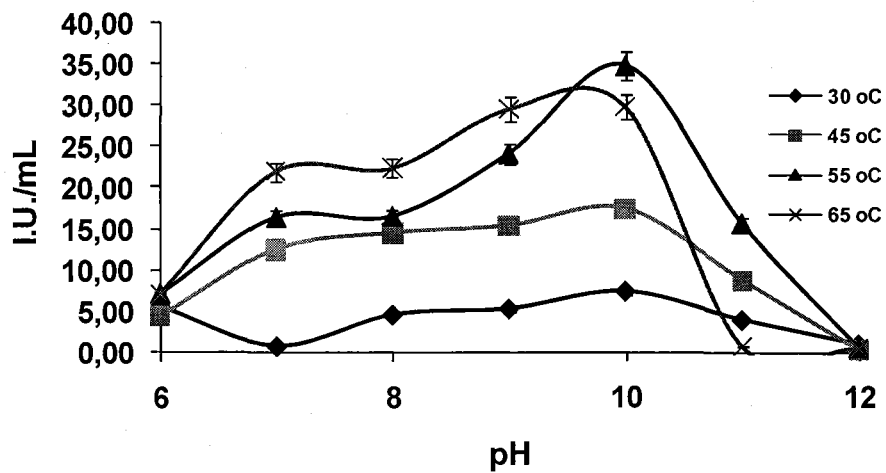


Figure 6: Effect of pH and temperature on the protease produced in *RAW* (a) and *TAH* (b) sludges.



CHAPITRE 3:
ÉTUDE DES PARAMÈTRES
OPÉRATIONNELS



PARTIE 1

(Résultats des objectifs 4 et 5)

**STUDY ON DIFFERENT PH-CONTROL STRATEGIES TO STIMULATE THE
PROTEASE PRODUCTION BY *BACILLUS LICHENIFORMIS* USING MUNICIPAL
WASTEWATER SLUDGE AS RAW MATERIAL**

M. Drouin*, S. Yan*, R.D. Tyagi* and R.Y. Surampalli**

*Institut National de la Recherche Scientifique, centre Eau, Terre et Environnement, Université
du Québec, 490 de la Couronne, Québec, G1K 9A9, Canada

** US EPA, P.O. Box-17-2141, Kansas City, KS 66117, USA

(SOUMIS À BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING)



RÉSUMÉ

Les boues d'épuration constituent un substrat complexe et abondant pouvant supporter la croissance et la production de protéase par *Bacillus licheniformis*. Dans la présente étude, différentes stratégies pour le contrôle du pH pendant la fermentation ont été étudiées dans les boues brutes, ainsi que dans un mélange de boues brutes et de boues ayant subi un prétraitement thermo alcalin stimulant la production de protéases. Entre des conditions de pH non contrôlé et contrôlé, les conditions contrôlées ont été déterminées plus souhaitables, les conditions non contrôlées ayant mené à de faibles croissance et production de protéases. Dans le cas de condition de pH contrôlé, différents agents de contrôle du pH ont été testés. L'utilisation de NH_4OH en remplacement de NaOH dans les boues brutes a permis d'augmenter l'activité protéolytique de l'ordre de 65%. L'effet bénéfique du NH_4OH a été attribué à la stimulation de la croissance cellulaire durant les premières heures de la fermentation. À l'opposé, CH_3COOH a considérablement inhibé la production de protéases, et l'utilisation de H_2SO_4 a permis d'obtenir des activités protéolytiques plus élevées. Ainsi, la combinaison $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ a été identifiée comme étant la meilleure option pour stimuler la production de protéases dans les boues brutes. Par contre, dans un mélange de boues brutes et de boues ayant subi un prétraitement thermo alcalin, NH_4OH a inhibé la croissance et la production de protéases, et donc l'emploi de $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ a permis des activités protéolytiques plus élevées.



ABSTRACT

Wastewater sludge is an abundant, complex material that can support growth and protease production by *Bacillus licheniformis*. In this study, different strategies to control the pH during the fermentation were tested in raw sludge, and in a mixture of raw and thermal-alkaline pre-treated sludge found promising to enhance the protease production. Among controlled and uncontrolled pH conditions, controlled conditions were found to be more suitable as uncontrolled conditions led to poor growth and protease production. In case of controlled pH conditions, different pH control agents were tested. Using NH_4OH , in replacement of NaOH in raw sludge increased the protease production by 65%. The beneficial effect of NH_4OH was attributed to the stimulation of the cell growth during the first hours of fermentation. On the other hand, CH_3COOH strongly repressed the protease production, and the use of H_2SO_4 was more favorable. Thus, the $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ combination was designed as the best option to use with raw sludge for enhanced protease production. In a mixture of raw and thermal-alkaline pre-treated sludge, NH_4OH inhibited the growth and protease production, so the use of $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ was more suitable.



3.1 INTRODUCTION

Proteases are industrial important enzymes which have got numerous biotechnological applications and share 40-60 % of the world enzyme market (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002a; Shrinivas *et al.*, 2012). More particularly, alkaline proteases comprise an important group that is used in the manufacture of detergent, leather, food, and in peptide synthesis, waste-treatment processes and other industries (Kumar and Takagi, 1999). Due to their commercial importance, cost-effective production of these enzymes is essential (Kumar and Parrack, 2003). The culture medium is responsible for 30 to 40% of the production cost (Kumar and Parrack, 2003; Joo *et al.*, 2002). Consequently, a lot of efforts are made to find cheaper raw materials. In this vein, Drouin *et al.* (2011a) showed that municipal wastewater sludge could be a suitable low cost medium to support growth and protease production by *Bacillus licheniformis*. In a recent work, the improvement of the sludge characteristics by different pre-treatments led to a marked increase in production yields (Drouin *et al.*, 2011b).

However, the productivity of a bioprocess is not only affected by medium composition and characteristics, but also by process parameters. Among them, the pH plays an important role. Complex mechanisms are implicated in regulation of the internal pH of bacterial cells. Hornbaek *et al.* (2004) and Calik *et al.* (2002) demonstrated that the extracellular pH conditions have a great impact on the metabolism pathways of *B. licheniformis*. Some publications presented the applications of controlled pH conditions for alkaline protease production (Frankena *et al.*, 1985 and 1986; Kumar and Takagi, 1999; Moon and Parulekar, 1991). On the other hand, there were reports who studied protease production under uncontrolled pH conditions (Calik *et al.*, 2002; Hamed *et al.*, 1999; Kumar and Parrack, 2003; van Putten *et al.*, 1996).

Moreover, in case of controlled pH conditions, pH control agents employed can also serve as sources of inorganic/organic compound. These compounds can have an important effect on the metabolism of the cells (Calik *et al.*, 2004). Yezza *et al.* (2005) showed that for a *B. thuriengensis*-based biopesticide produced from municipal wastewater sludge, the agents employed to control pH had great impacts on the process performances. Nevertheless, to our knowledge, the use of different pH control agents on a protease production process in complex media has never been studied. Thus, the aim of the current work was to study the effect of

different pH strategies (controlled and uncontrolled) on the production of protease by *Bacillus licheniformis* from municipal wastewater sludge.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 *Bacillus licheniformis* strain

Bacillus licheniformis ATCC 21424 (BL) was used in this study. An active culture was maintained by streak inoculating nutrient agar plates (3 g/L of beef extract, 5 g/L peptone and 15 g/L agar) and incubating at 35°C for 48 h. The plates were stored at 4°C.

3.2.2 Sludge sampling

The wastewater secondary sludge were collected from Québec city municipal wastewater treatment plant and stored at 4°C. The experiments were conducted with settled sludge at SS concentration of 35 g/L.

3.2.3 Sludge pre-treatment

Two different types of sludge (with and without pre-treatment) were used in this study.

Raw sludge (RAW): secondary sludge was settled by gravity settling to increase the suspended solids concentration in order to obtain the desired SS concentration (35 g/L).

Mixed sludge (MIX). A mixture, containing 75 % of raw sludge and 25 % of thermal-alkaline pre-treated sludge, was used as fermentation medium. The complete procedure for the thermo-alkaline pre-treatment of sludge was described in Drouin *et al.* (2011b). The SS concentration of raw and pre-treated sludge used to do the mixture was previously adjusted to 35 g/L, respectively.

3.2.4 Inoculum preparation

An inoculum prepared in two steps was found to be optimal in our previous study (Drouin *et al.*, 2011a) and was used in this study. A starting culture was prepared in 100 mL of nutrient broth (with composition (g/L): beef extract - 3, peptone - 5. The preparation was carried out in an Erlenmeyer of 500 mL). The medium pH was adjusted to 7.5 by addition of 4N NaOH or 4N H₂SO₄ and then autoclaved (121° C, 15 min). The sterilised medium was inoculated with a loopful of *B. licheniformis* (BL) grown and stored on nutrient agar. The Erlenmeyers were

incubated at 35°C under a constant agitation of 250 revolutions per minute (rpm) for 12 h in an incubator-shaker (Lab-Line, Dubuque, Iowa, USA). A 2% (v/v) of this broth (first stage inoculum) was used as seed culture to inoculate 500 mL Erlenmeyer flask containing 150 mL of the same medium as the fermentation substrate (raw or pre-treated sludge) (second stage inoculum). The suspended solids concentration used to grow the inoculum was 15 g/L. The flasks were then incubated in a rotary shaking incubator at 35°C and at 250 rpm for 12 h. Finally, a 4.5 % (v/v) of inoculum of the actively growing cells of the pre-culture was transferred to the fermentor.

3.2.5 Fermentation procedure

3.2.5.1 Uncontrolled pH conditions

The experiment was carried out in a 7,5 L bioreactor (Labfors 3, Infors AG, Switzerland), with a working volume of 4 L. The bioreactor is equipped with agitation, aeration, temperature, pH, foam and dissolved oxygen (DO) control systems. 20 mL solution of polypropylene glycol (Sigma-Aldrich, Canada) was added to fermentor as anti-foam agent prior to sterilization. Sterilization was carried out by placing the apparatus in an autoclave and autoclaved at 121°C for 30 min. After the sterilization, the temperature was set to 35°C, and the fermentor was inoculated. Fermentations were carried out at 35°C for 48 h. Agitation was controlled between 300 and 600 rpm whereas an aeration rate between 2.5 - 4 litre per minute (LPM) was used to keep the DO level above 20% of saturation. The pH was initially adjusted to 7.5, but remains uncontrolled during the fermentation. Samples were drawn from the fermentor at regular intervals to determine cell and spore counts and protease activity.

3.2.5.2 Controlled pH conditions

The experiments were carried out in two fermentors (15 L) (Biogénie Inc, Québec, Québec, Canada) equipped with agitation, aeration, temperature, pH, foam and dissolved oxygen (DO) control systems. The fermentors were filled with 9 L of culture medium. Then, 20 mL solution of polypropylene glycol (Sigma-Aldrich, Canada) was added to fermentor as anti-foam agent during sterilization. Sterilization was carried out in situ at 121°C for 30 min. After the sterilization, the temperature was set to 35 °C. Inoculation, agitation, aeration and temperature control during fermentation were done as the same way as in uncontrolled conditions, while the pH was

automatically maintained at 7.5 using either sodium hydroxide solution (NaOH 4N)/ammonium hydroxide (NH₄OH 25%) or sulphuric acid (H₂SO₄ 4N) / acetic acid (CH₃COOH 10 N) through computer controlled peristaltic pumps. Samples were drawn from the fermentor at regular intervals to determine cell and spore counts and protease activity.

3.2.6 Analytical

3.2.6.1 Cell and spore counts

The samples were serially diluted with sterile saline solution (0.85% w/v NaCl). The appropriately diluted samples (0.1 mL) were plated (triplicate) on nutrient agar plates and incubated at 35 °C for 16-24 h to form colonies. For spore count, the appropriately diluted samples were heated in a water bath at 80°C for 10 min. After cooling, the samples were plated (triplicate). Afterwards, the fully developed colonies were counted. In order to establish the reliability and reproducibility of the plate count technique, 10 independent samples were drawn (at the same time) from a shake flask experiment and were serially diluted and plated. Each dilution was plated on three different plates. A standard deviation of 7% was calculated from the results.

3.2.6.2 Protease activity assay

Protease activity was determined according to Kunitz (1947) with minor modifications. Samples collected from the fermentor were centrifuged at 3620 g (5000 rpm) for 10 min at 4°C. The supernatant was appropriately diluted with borate buffer, pH 8.2. 1 mL of the properly diluted enzyme solution was incubated with 5 mL of casein solution (1.2% w/v) (Sigma-Aldrich, Canada) for 10 min, at 37°C, in a constant temperature water bath. The reaction was then terminated by adding 5 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA). This mixture was incubated for 30 min in order to precipitate the total non-hydrolysed casein. Blanks were prepared with inactivated casein. At the end of this incubation period, the samples and the blanks were filtered using Whatman paper 934-AH (Whatman Inc, USA). The absorbance of the filtrate was measured at 275 nm using a Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian Techtron Pty. Ltd., Australia). Validation of the method was established by treating a standard enzyme solution of known enzymatic activity, in the same way and under the same conditions. One protease activity unit was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μmole (181 μg) of tyrosine from

casein per minute at pH 8.2 and 37°C. In order to establish the reliability and reproducibility of the method, the procedure was repeated 10 times from a single sample. Statistical treatment of these results showed a maximal deviation of 5%.

3.3 RESULTS

Evolution of viable cells, spore counts and protease activity during fermentation in uncontrolled and controlled ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{NaOH}$) pH conditions are illustrated in Figure 1. In both conditions, the growth phases occurred during the first 18 h, and practically no protease activity was observed during the first hours of growth phase. The increase in the protease activity started after 10-12 h and continued to increase during the stationary phase, until 35- 40 h, followed by a slight decrease. In case of uncontrolled pH conditions, the pH decreased to 7.2 during the first hours of fermentation and then fluctuated during few hours. Around 10 h, concomitantly with the increase in spore counts and protease activity, the pH started to increase and reached 8.5 after 28 h. Then the values fluctuated between 8.2 and 8.5 until the end of fermentation. The number of cells (1.97×10^9 CFU/mL) and spores (1.01×10^8 CFU/mL), and the protease activity (10.13 U.I./mL) recorded in controlled pH conditions were considerably higher than the values recorded in uncontrolled conditions (6.43×10^8 CFU/mL, 3.97×10^7 CFU/mL and 3.16 U.I./mL, respectively) (Table 1). In fact, among all the condition tested, the uncontrolled pH conditions gave the lowest values in term of cell count, spore count and protease activity (Table 1).

Figures 2 and 3 illustrate the profiles of viable cells, spore counts and protease activity during fermentation in RAW and MIX sludge, with different pH control agent. The growth phases occurred during the first 18 h in RAW sludge, and 21 h in MIX sludge, and practically no protease activity was observed during the first hours of growth phase, irrespective of the pH control agent used. The lowest cell (1.97×10^9 CFU/mL) and spore count (1.01×10^9 CFU/mL) were observed in RAW sludge with $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ used as pH control agent, whereas the maximum cell count (3.93×10^9 CFU/mL) was obtained in RAW sludge, with $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ used as pH control agent. The highest spore count (2.36×10^8 CFU/mL) was obtained in RAW sludge with $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ (Table 1).

In both RAW and MIX sludges, the protease activity started to increase after 10-12 h. When NaOH was used, the protease activity increased rapidly and attained the maximum at 30-48 h. However, when NH_4OH was used, the increase in protease activity was slower and maximum was reached at 36-48 h. The maximum protease activity (16.74 I.U./mL) was observed in the MIX sludge with $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$. The minimum value (5.72 I.U./mL) was obtained in RAW sludge with $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$.



3.4 DISCUSSION

3.4.1 Uncontrolled vs. controlled pH conditions

The experiment on uncontrolled pH conditions was carried in 7.5 L bioreactor, whereas all the experiments on controlled pH conditions were done in 15 L bioreactors: sludges used for all the experiments in raw sludge were collected at same time and stored at 4°C. But even at low temperature, the sludge biomass remained active. Equipment of different scale has been used simultaneously, in order to do the experiments in the shortest period of time, to avoid the effect of sludge digestion on the results. However, previous work (data not shown) demonstrated that results are comparable when the same cultural conditions are applied at different (7.5 and 15 L) fermentation scales.

Under uncontrolled pH conditions, the pH showed decreasing trend during the first hours of fermentation. This could be attributed to production of acidic products by the cell metabolism during the cell growth phase. Also, Kumar and Takagi (1999) mentioned that pH turned acidic when inorganic nitrogen, like ammonium ions is used by the cells, while the pH turned alkaline when more complex, organic nitrogen is used. According to the authors, there is a close relationship between protease synthesis and the utilization of nitrogenous compounds. So, pH variations during fermentation may indicate kinetic information on protease production, such as the start of the protease production period. This could be verified in Figure 1a: the pH started to increase around 10 h, concomitantly with the increase in protease activity. The increase in protease activity also began concomitantly with the sporulation phase. Many researchers suggested a relation between sporulation and proteases production (Kumar and Takagi, 1999; Gupta *et al.*, 2002b).

The uncontrolled pH conditions had a huge negative impact on process performance: the number of cells and spores count was considerably lower than the numbers obtained in controlled conditions (NaOH/H₂SO₄) (Table1). The same observation could be applied for the protease activity and the specific cellular protease activity (I.U./10⁹ bacterial cell; Y_{p/x}) (Table 1). Theses results are in complete contradiction with Calik *et al.* (2002) who reported uncontrolled pH conditions are more favorable for protease production by *Bacillus licheniformis*. The pH profile reported by Calik *et al.* (2002) in uncontrolled pH fermentation was similar i.e. from 7.2, the pH

decreased during the first few hours of fermentation, followed by a constant increase until 28-32 h. However, the pH never increased over 7.5, whereas in our case, the pH increased up to 8.5, despite the fact that sludge had a great pH buffering capacity in comparison with other media tested in previous work. A hypothesis can be proposed to explain the important increase in pH observed. As mentioned above, the pH has a tendency to turn alkaline when complex, organic nitrogen is metabolized by the cells (Kumar and Takagi, 1999). Sludge is a complex and heterogeneous material and most of the nutrients are in the form of complex organic matter. Uptake of these complex nutrients by the cells could have caused the important increase in pH observed.

Significant pH fluctuations observed during the fermentation could have affected the bacterial cells. The culture pH strongly affects many enzymatic processes and the transport of various components across the cell membrane (Moon and Parulekar, 1991). Calik *et al.* (2002) mentioned that microbial cells could maintain their intracellular pH at suitable values, even with large variations of extracellular pH, but only at the expense of a significant increase in the maintenance energy demand. Hornbaek *et al.* (2004) suggested that intracellular pH regulation in *B. licheniformis* upon external pH change include modifications in the composition of the cell membrane and production of metabolites to neutralize the pH. Thus, in uncontrolled pH conditions, a lot of energy may have been used for the maintenance of the cells, instead of being used for biomass formation and protease production. Also, as sludge is a complex and heterogeneous material, major changes in pH could have led to significant modifications in chemical equilibration of many sludge constituents, so the cell metabolism could have been affected.

3.4.2 Influence of pH control agents during fermentation in RAW sludge

Based on the profiles of cells counts and protease activity obtained in previous and present work, the whole process can be divided in two distinct periods. The growth phase (0-18 h) and the production phase (18-48 h). During the early part of the growth phase (0-12 h), the pH tended to decrease and so alkalophilic agent was needed to maintain the pH and practically no protease activity was observed. During the late part of growth phase (12-18 h), the pH started to increase, concomitantly with protease activity, so acidic agent was needed to maintain the pH. Drouin *et al.* (2011b) suggested that easily assimilable substrate stimulated growth of the bacteria during the growth phase.

During the production phase (18-48 h), the cells entered in stationary phase and most of the protease production occurred during this phase. The pH tended to increase, so acidic agent was required throughout the production phase to maintain the pH. Drouin *et al.* (2011b) suggested that the presence of complex nutrients or complex proteins in sludge could stimulate the production of protease during the production phase. On the other hand, the presence of easily assimilable soluble components could have inhibitory effect on protease production.

3.4.2.1 NaOH vs. NH₄OH

NaOH (4N) as source of Na⁺, and NH₄OH (25%), as source of NH₄⁺ were tested as alkalophilic agents. During fermentation, NaOH and NH₄OH were injected in to the media only during the early part of the growth phase (0-12 h). The results demonstrated that the presence of easy assimilable inorganic nitrogen stimulated the growth of *B. licheniformis*. Even if the growth profiles are similar (Figures 2a and b), the number of cells and spores obtained when NH₄OH was used were higher than those obtained with NaOH (Table 1). The use of NH₄OH instead of NaOH also had an impact on protease production. In both case, the production of protease started after 12 h. Protease activity increased rapidly and attained the maximum at 30-42 h when NaOH was used, whereas the increase in protease activity was slower and maximum was reached latter at 36-48 h when NH₄OH was used. This could be attributed to an inhibiting effect by the presence of residual NH₄⁺ ions and/or other easily assimilable substrate when the production of protease started. On the other hand, the NH₄OH/H₂SO₄ combination permitted to increase the protease activity up to 15.43 U.I./mL, which is considerably higher than the protease activity recorded (10.13 U.I./mL) with the NaOH/H₂SO₄ combination (Table 1). Theses results are in contradiction with the findings of several authors who stated that NH₄⁺ ions have strong inhibiting effect on protease production (Giesecke *et al.*, 1991; Kumar and Takagi, 1999; O'Reilly and Day, 1983). However, it is arguable that the NH₄⁺ ions added only in the first hours of fermentation were consumed almost instantly by the cells, and did not had an impact during the production phase. It can be illustrated by the specific cellular protease activity ($Y_{p/x}$) obtained with the NH₄OH/H₂SO₄ combination (4.77), similar to that obtained with NaOH/H₂SO₄ combination (5.13) (Table 1). Thus, the adding of NH₄⁺ during the first hours of fermentation permitted to enhance the bacterial growth without affecting the protease synthesis. These results are in accordance with Beg *et al.* (2002) who also reported beneficial effect of NH₄⁺ during the growth phase but a strong inhibiting effect when the same ion is present or added during the production phase. The results

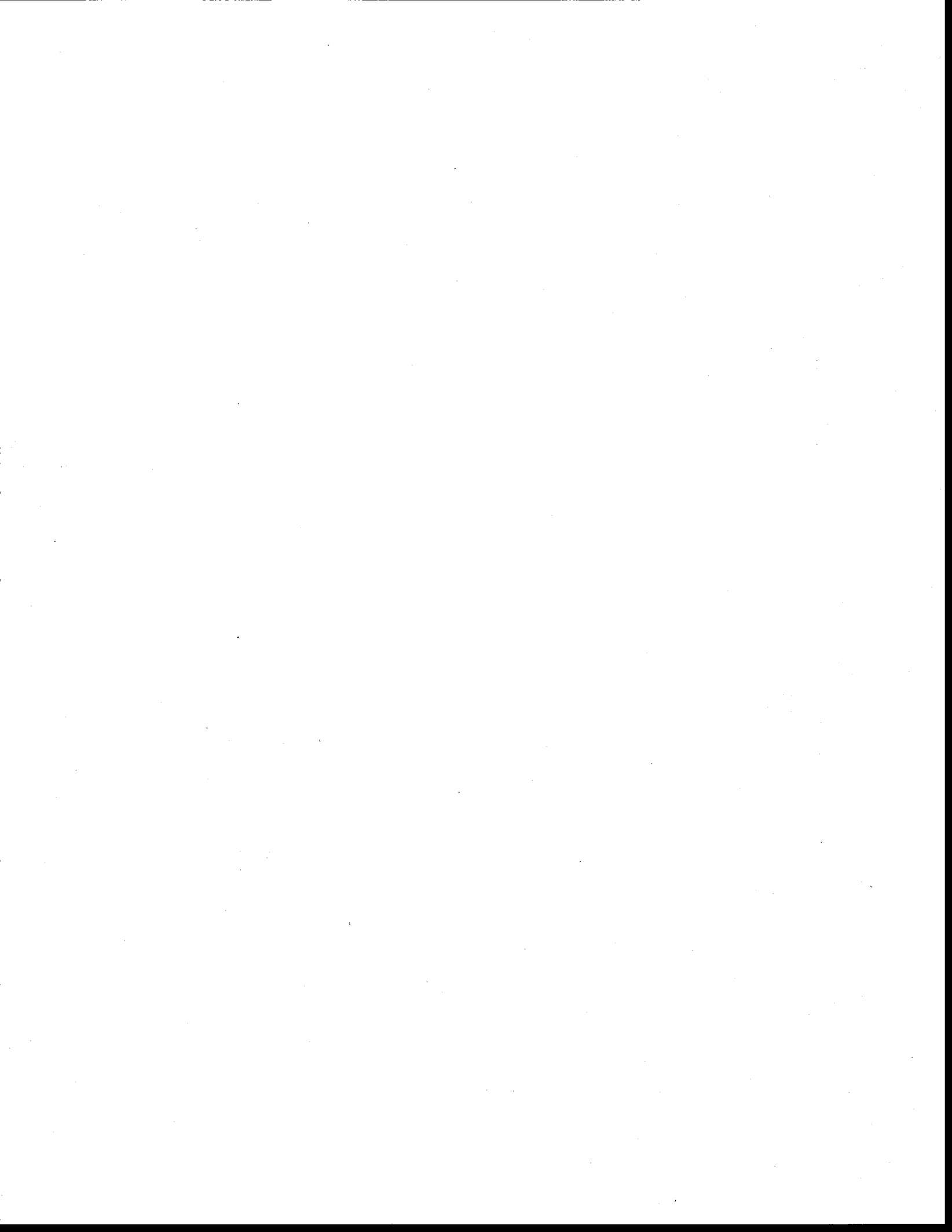
proved that NH_4OH is more suitable than NaOH to control pH during the first hours of fermentation.

3.4.2.2 H_2SO_4 vs. CH_3COOH

CH_3COOH (10N), a source of acetate, and H_2SO_4 (4N) were tested as acidic agents during fermentation. H_2SO_4 or CH_3COOH is added in the media during the late part of the growth phase and during the whole production phase. The results obtained with $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ vs $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ showed that CH_3COOH as pH control agent severely repressed the protease production. The cell count (3.93×10^9 CFU/mL) recorded with $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ is slightly higher than that obtained with $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ (3.27×10^9 CFU/mL). This could be attributed to the combined effect of NH_4^+ and CH_3COO^- as both are easily assimilable substrates and enhances the growth. However, the spore count, protease activity and $Y_{p/x}$ recorded with $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ were considerably lower than that obtained with $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ (Table 1). CH_3COO^- also inhibited the spore formation i.e. for all conditions tested, the percent of sporulation ($\%_{\text{sporulation}}$) obtained was always between 5-7 %, but it fell down to 2 % when CH_3COOH was employed (Table 1). In contradiction, Calik *et al.* (2004) affirmed that acetate ion was suitable for protease production. However, in their case, acetate ion was added to the fermentation media as medium component prior to fermentation. The authors demonstrated that when both glucose and acetate were present in the growth medium, acetate was preferentially metabolized by the cells over glucose. Thus, acetate, an easy metabolizable source of energy, can have a beneficial effect on protease production by promoting growth when added during the growth phase, whereas it has a strong inhibiting effect on protease production when added during the production phase, invalidating the use of CH_3COOH as pH control agent. In case of H_2SO_4 , Calik *et al.* (2004) reported an inhibiting effect of SO_4^{2-} on protease production. On the other hand, Hanlon *et al.* (1982) reported that protease production increased until a maximum concentration. At higher concentration, they reported no influence on protease activity. Calik *et al.* (2004) mentioned that Cl^- ion could also have an inhibiting effect on protease production. So it could be interesting to also test other inorganic acid, e.g. HCl , in order to evaluate the real potential of H_2SO_4 .

3.4.3 Influence of pH control agents during fermentation in MIX sludge

Drouin *et al.* (2011b) found that a mixture of 75% raw sludge and 25% thermal-alkaline pre-treated sludge as fermentation substrate led to a significant increase in protease activity compared to raw sludge only. This was attributed to the fact that easily assimilable substrate supplied by the pre-treated sludge fraction stimulated growth of the bacteria during the growth phase while the presence of high concentration of complex nutrients or complex proteins supplied by the raw sludge fraction stimulated the production of protease during the stationary phase. In order to verify if the use of NH_4OH instead of NaOH is suitable to increase protease activity in MIX sludge, two experiments were carried with $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ and $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ combination to control the pH. The Figures 3a and b showed that the number of cells obtained is higher when NaOH was used. The protease activity obtained (16.74 U.I./mL) was also considerably higher with the use of NaOH , in comparison with the value (9.47 U.I./mL) when NH_4OH was used (Table 1). From these results, a hypothesis can be formulated: supplying MIX sludge with NH_4^+ led to an excess amount of easily assimilable components during the growth phase, which could have limited the growth by substrate inhibition. And as explained above, the use of NH_4OH in replacement of NaOH did not have any impact on production phase, as shown by the very similar $Y_{p/x}$ values obtained in both conditions (Table 1).



3.5 CONCLUSIONS

For protease production in wastewater sludge, controlled pH conditions were found more suitable than uncontrolled pH conditions. The overall results obtained in this study with different pH control agents highlighted the fact that mechanisms implied in protease production from *B.licheniformis* are inducible by complex nutrients and nitrogen sources and repressed by rapidly metabolizable substrate. Among all agent tested, a combination of ammonium hydroxide and sulfuric acid was found to be the most efficient for protease production in raw sludge. In case of a mixture of raw and hydrolysed sludge, the better results were obtained by a combination of sodium hydroxide and sulfuric acid. However, as the effect of SO_4^{2-} on protease production remained unclear in literature, it could be interesting to test the potential of some other inorganic acids as replacement of sulfuric acid for protease production in wastewater sludge.



ACKNOWLEDGEMENT

Sincere thanks are due to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant A 4984, Canada Research Chair) for their financial support.



REFERENCES

- 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.
- Calik P., Bilir 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.
- Calik P., Bilir E., Ozcelik I.S., Calik G. and Ozdamar T.H. (2004). Inorganic compounds have dual effect on recombinant protein production: influence of anions and cations on serine alkaline protease production. *J. Appl. Microbiol.* 96: 194-200.
- Drouin M., Yan S., Tyagi R.D., Valéro J.R. and Surampalli R.Y. (2011a). Production of alkaline proteases using wastewater sludge as a raw material. Submitted to *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*
- Drouin M., Yan S., Lai C.K., Tyagi R.D. and Surampalli R.Y. (2011b). Improvement of municipal wastewater sludge biodegradability to enhance the production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis*. Submitted to *Bioresour. Technol.*
- Frankena J., Van Verseveld H.W. and Stouthamer A.H. (1985). A continuous culture study of the bioenergetic aspects of growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 169-176.
- Frankena J., Koningstein G.M., Van Verseveld H.M. 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.
- Giesecke U.E., Bierbaum G., Rudde H., Spohn U. and Wandrey C. (1991). Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 720-724.
- Gupta R., Beg Q.K. and Lorenz P. (2002a). Bacterial alkaline proteases : molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 15-32.

- Gupta R., Beg Q.K., Khan S. and Chauhan B. (2002b). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 381-395.
- Hameed A., Keshavarz T. and Evans C. (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.
- Hanlon G.W., Hodges N.A. and Russell A.D. (1982). The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*. *J. Gen. Microbiol.* 128: 845-851.
- Hornbaek T., Jakobsen M., Dynesen J. and Nielsen A.K. (2004). Global transcription profiles and intracellular pH regulation measured in *Bacillus licheniformis* upon external pH upshifts. *Arch. Microbiol.* 182: 467-474.
- Joo H-S., Kumar C.G., Park G-C., Kim K.T., Paik S.R. and Chang C-S. (2002). Optimisation of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochem.* 38: 155-159.
- Kumar G. and Parrack P. (2003). Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 757-762.
- Kumar C.G. and Takagi H. (1999). Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* 17: 561-594.
- Kunitz M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310.
- 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.
- O'Reilly T. and Day D.F. (1983). Effects of cultural conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(3): 1132-1135.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. and Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (3): 597-625.

Shrinivas D., Kumar R. and Naik G.R. (2012). Enhanced production of alkaline thermostable keratinolytic protease from calcium alginate immobilized cells of thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39: 93–98.

Van Putten A.P.B., Spitzenberger F., Kretzmer G., Hitzmann B., Dors M., Simutis R. and Schugerl K. (1996). Improvement of the production of subtilisin Carlsberg alkaline protease by *Bacillus licheniformis* by on-line process monitoring and control in a stirred tank reactor. *J. Biotechnol.* 49: 83–93.

Yezza A., Tyagi R.D., Valéro J.R. and Surampalli R.Y. (2005). Influence of pH control agents on entomotoxicity potency of *Bacillus thuringiensis* using different raw materials. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1549-1558.



Table 1 Process Performance of *Bacillus licheniformis* with different pH control strategies tested.

Parameter	RAW				MIX	
	<i>Uncontrolled</i> <i>pH</i>	<i>NaOH/</i> <i>H₂SO₄</i>	<i>NH₄OH/</i> <i>H₂SO₄</i>	<i>NH₄OH/</i> <i>CH₃COOH</i>	<i>NaOH/</i> <i>H₂SO₄</i>	<i>NH₄OH/</i> <i>H₂SO₄</i>
Total count _{max} (10 ⁹ CFU/mL)	0.64	1.97	3.27	3.93	3.53	2.03
Spore count _{max} (10 ⁸ CFU/mL)	0.40	1.01	2.36	0.63	1.69	1.27
Protease activity _{max} (I.U./mL)	3.16	10.13	15.43	5.72	16.74	9.47
Y _{p/x} (I.U./10 ⁹ bacterial cell)	4.91	5.13	4.77	1.46	4.72	4.66
% sporulation	6.21	5.13	7.31	1.61	4.77	6.26

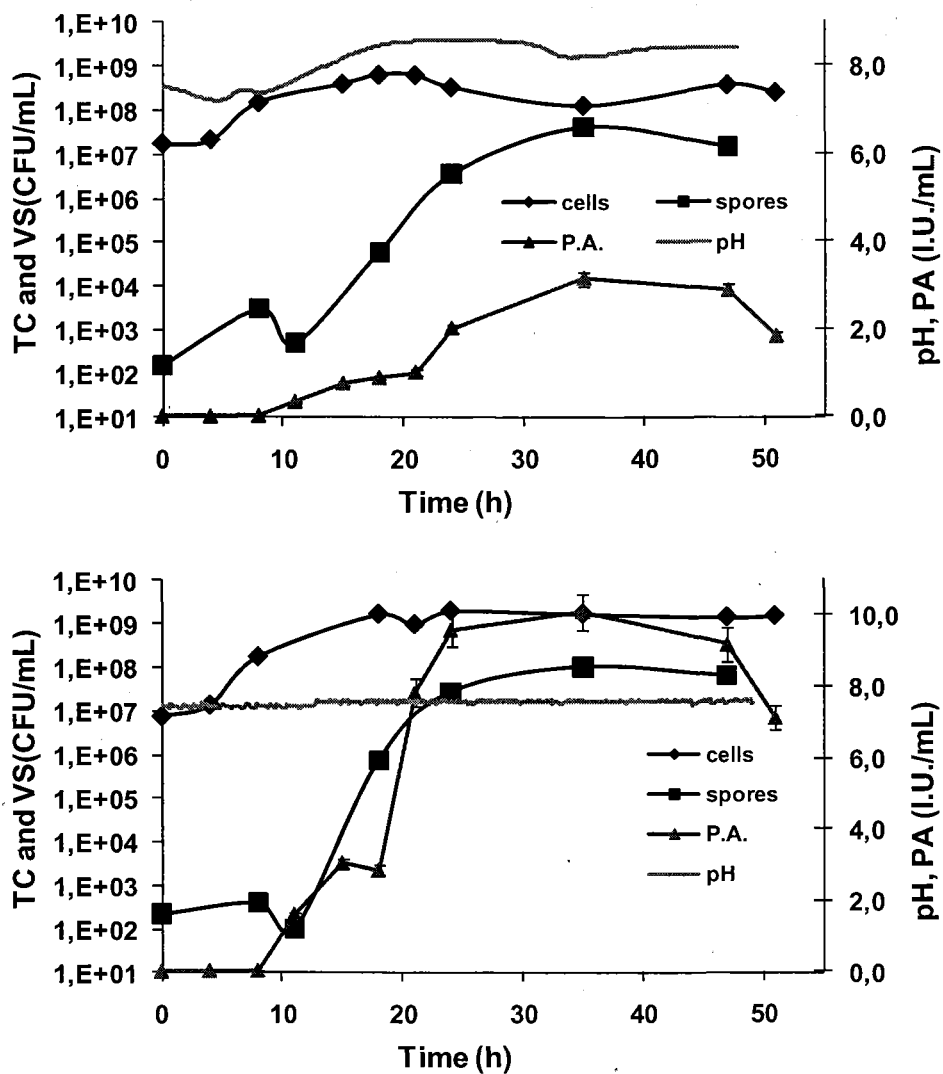


Figure 1: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), pH and protease activity (PA) during *Bacillus licheniformis* growth in RAW sludge under uncontrolled (a) and controlled (b) pH conditions.

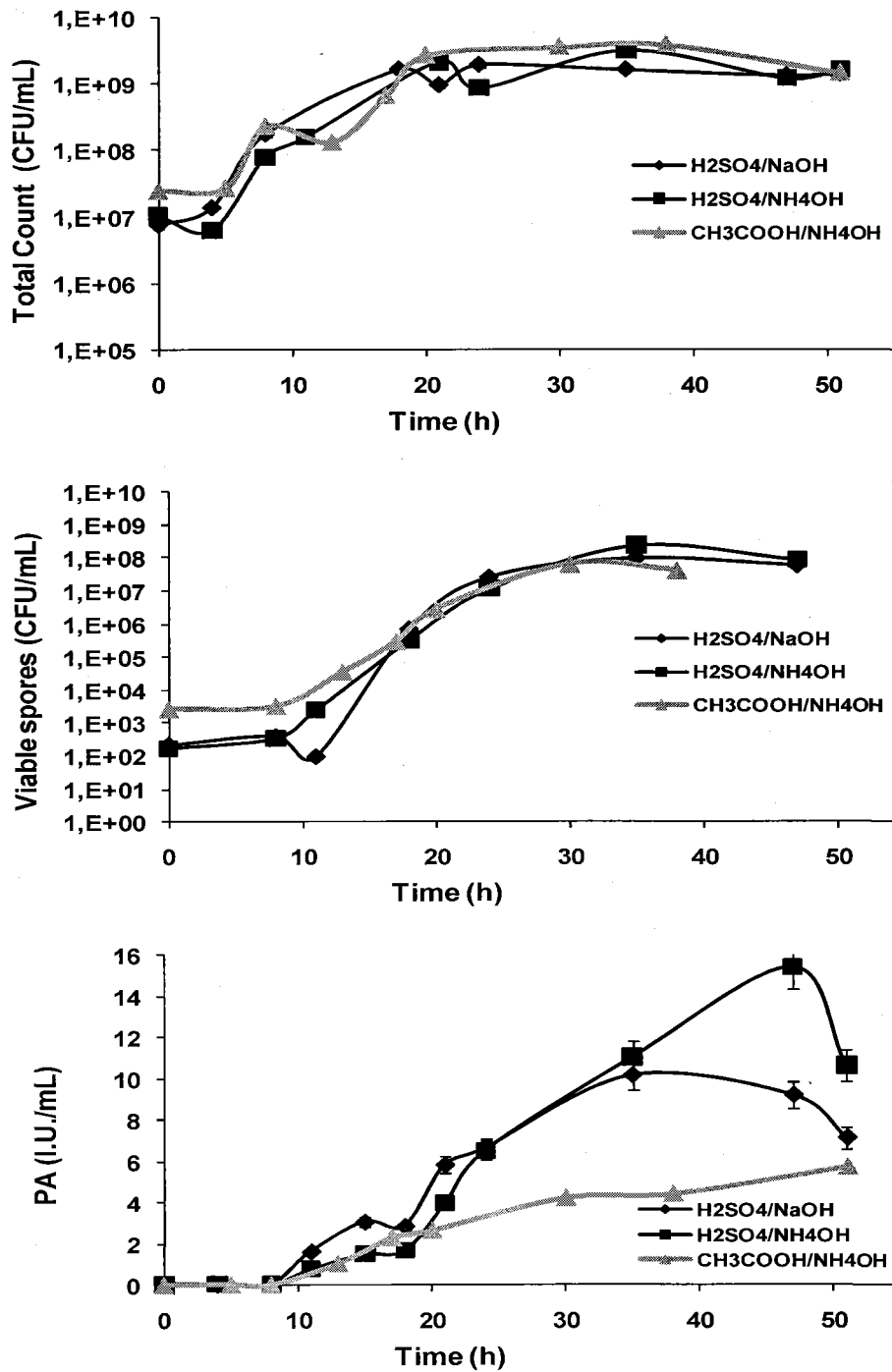


Figure 2: Evolution of total viable cell count (a), viable spore count (b) and protease activity (c) during *Bacillus licheniformis* growth in RAW sludge with different pH control agents tested.

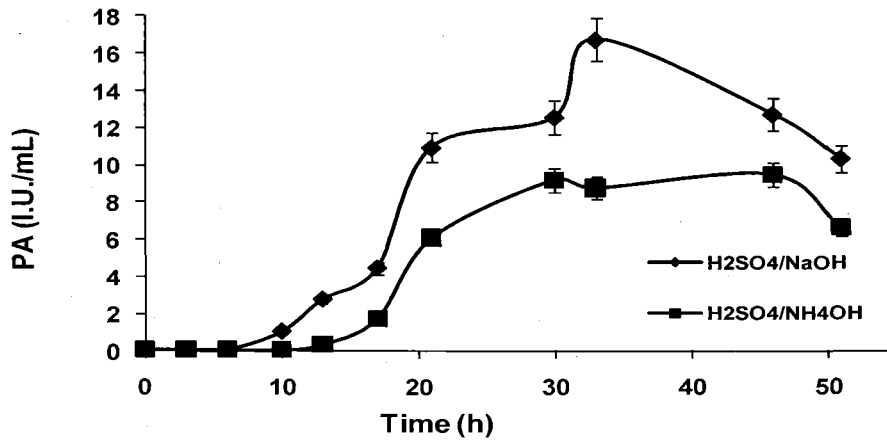
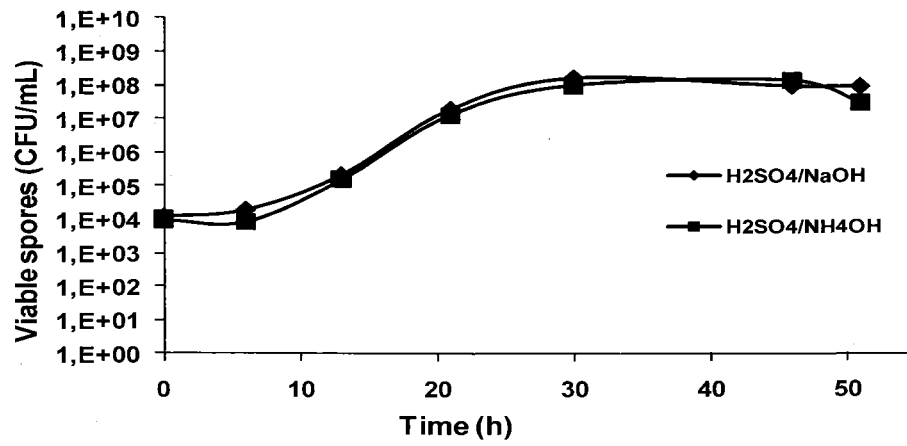
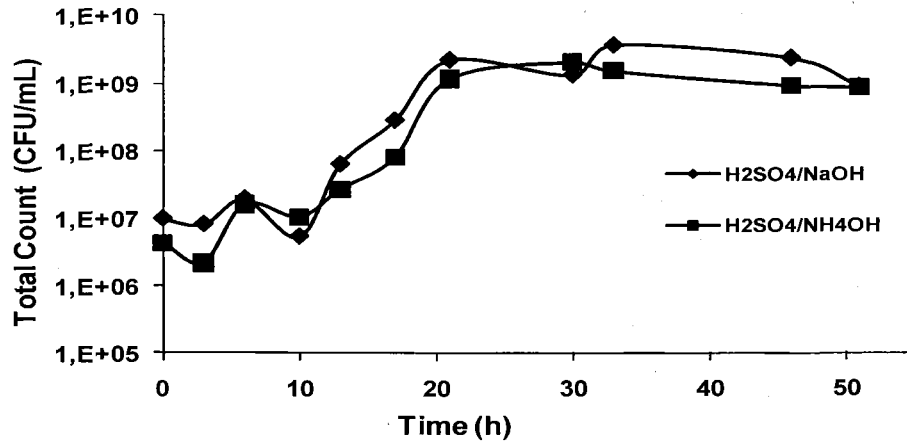


Figure 3: Evolution of total viable cell count (a), viable spore count (b) and protease activity (c) during *Bacillus licheniformis* growth in MIX sludge with different pH control agents tested.

PARTIE 2

(Résultats de l'objectif 6)

**IMPACT OF OXYGEN TRANSFER CONDITIONS ON PROTEASE PRODUCTION BY
BACILLUS LICHENIFORMIS IN A SUBMERGED FERMENTATION PROCESS USING
MUNICIPAL WASTEWATER SLUDGE AS RAW MATERIAL.**

M. Drouin*, J. Bezawada*, R.D. Tyagi* and R.Y. Surampalli**

*Institut National de la Recherche Scientifique, centre Eau, Terre et Environnement, Université
du Québec, 490 de la Couronne, Québec, G1K 9A9, Canada

** US EPA, P.O. Box-17-2141, Kansas City, KS 66117, USA

(SOUMIS À PROCESS BIOCHEMISTRY)



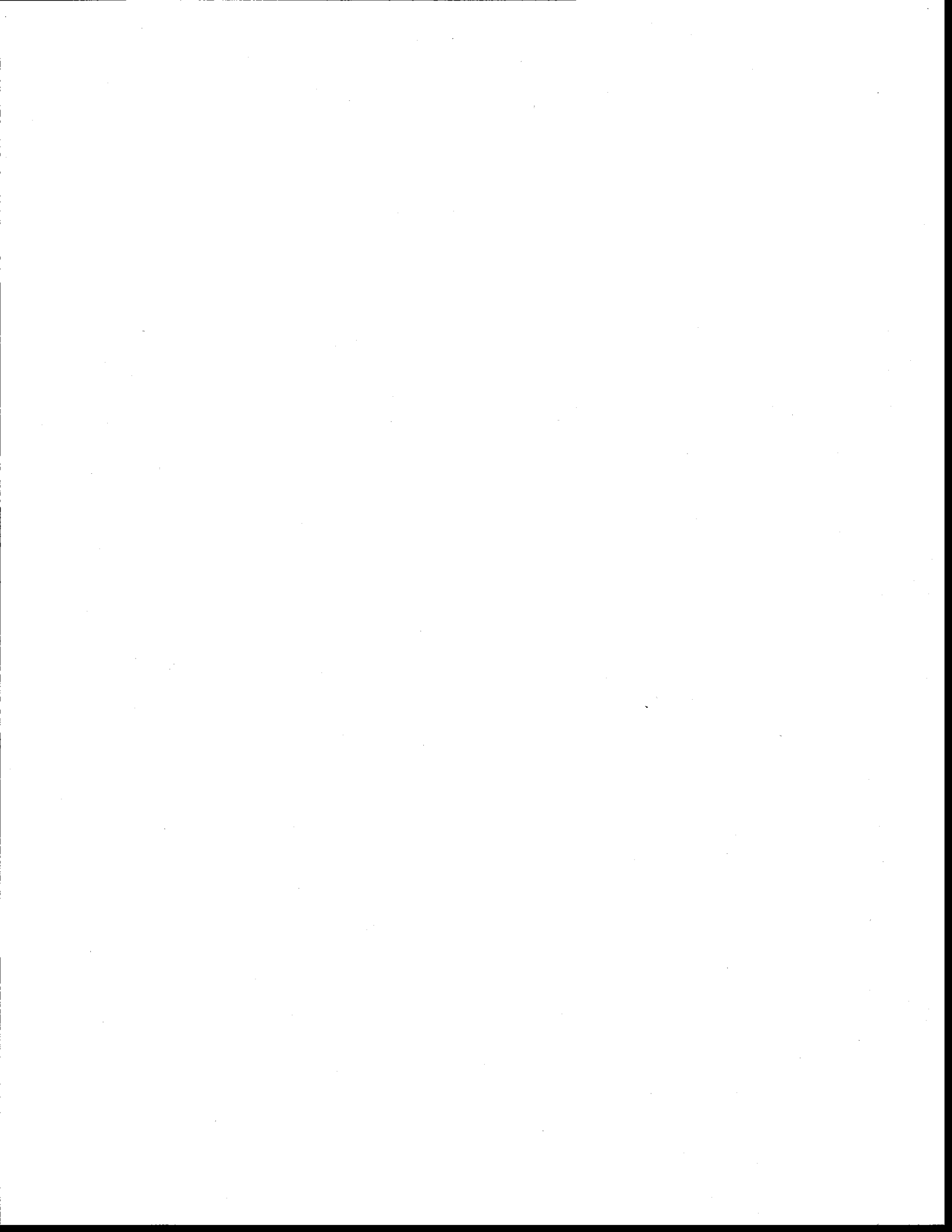
RÉSUMÉ

L'effet des conditions de transfert d'oxygène sur la production de protéases par *Bacillus licheniformis* dans les boues d'épuration a été investigué. Des expériences ont d'abord été menées sous des conditions de transfert d'oxygène faibles, moyennes et élevées en utilisant différents taux d'aération (2,5, 3,0 et 4,0 L/min.) et d'agitation (300, 500, 650 rpm) en bioréacteur de 7,5 L. Les plus faibles nombres de cellules et activités protéolytiques ont été obtenus sous des conditions de transfert d'oxygène faibles (2,5 L/min., 300 rpm). La production de protéases a été hautement stimulée sous des conditions de transfert d'oxygène élevées (4,0 L/min., 650 rpm), mais le faible nombre de cellules obtenu a négativement affecté l'activité protéolytique (7,75 I.U./mL) et la formation abondante de mousse s'est avérée problématique pendant la phase de croissance. Le nombre de cellule le plus élevé ($2,36 \times 10^9$ UFC/mL) a été obtenu sous des conditions de transfert d'oxygène moyennes (3,0 L/min., 500 rpm), alors que l'activité protéolytique mesurée sous de telles conditions a été plus faible (4,17 I.U./mL). La production de protéase a été sévèrement inhibée par de faibles concentrations en oxygène dissous (moins de 10%) pendant la phase de croissance exponentielle, et stimulée lorsque des conditions de transfert d'oxygène élevées ont été maintenues pendant la phase stationnaire. Suivant ces résultats, une stratégie impliquant des conditions de transfert d'oxygène variables a par la suite été utilisée: des conditions de transfert d'oxygène moyennes ont été initialement employées pendant la phase de croissance, les taux d'agitation/aération étant par la suite graduellement augmentés de façon à maintenir la DO au dessus de 15%, et des conditions de transfert d'oxygène élevées ont été maintenues pendant la phase stationnaire. Cette stratégie a permis d'atteindre une activité protéolytique considérablement plus élevée (12,71 I.U./mL).



ABSTRACT

The effects of oxygen transfer on protease production by *Bacillus licheniformis* in wastewater sludge were investigated. Experiments were first carried under low, medium and high oxygen transfer conditions by using different aeration (2.5, 3.0 and 4.0 L/min.) and agitation (300, 500, 650 rpm) rates in a bench-scale bioreactor (7.5 L). The lowest cell counts and protease activities were obtained under low oxygen transfer conditions (2.5 L/min, 300 rpm). Protease production was highly stimulated under higher oxygen transfer conditions (4.0 L/min., 650 rpm), but the lower cell growth negatively affected the protease activity obtained (7.75 I.U/mL) and intense foam formation was observed during growth phase. The highest amount of cells (2.36×10^9 UFC/mL) was obtained under medium oxygen transfer conditions (3.0 L/min, 500 rpm), whereas protease production recorded under those conditions was lower (4.17 I.U/mL). Protease production was severely inhibited by low dissolved oxygen concentrations (below 10%) during the late growth phase, and stimulated when high oxygen transfer conditions were maintained during the stationary phase. Hence, a variable oxygen transfer strategy was used: medium oxygen transfer conditions were initially employed during growth phase, agitation/aeration rates were gradually increased in order to maintain the DO above 15 % and high oxygen transfer conditions were maintained throughout the stationary phase. Considerably higher protease activity (12.71 I.U/mL) was obtained under variable oxygen transfer strategy.



3.6 INTRODUCTION

Municipal wastewater sludge has been found as a new promising low cost medium to support growth and protease production by *Bacillus licheniformis*. In previous work, the improvement of the sludge characteristics had lead to marked increase in production yields (Drouin *et al.*, 2011a and b). As the culture medium is responsible for 30 to 40% of the enzyme production cost (Kumar and Parrack, 2003; Joo *et al.*, 2002), the use of municipal wastewater sludge as production medium could be more cost-effective method for production of proteases. However, the productivity of bioprocess is not only affected by medium composition and characteristics, but also by process parameters. The impact of oxygen transfer conditions on protease production in submerged fermentation have been extensively studied in literature (Calik *et al.*, 1998, 2000; Frankena *et al.*, 1986; Hammed *et al.*, 1999; Kole *et al.*, 1988; Moon and Parulekar, 1991; Potumarthi *et al.*, 2007) and the results demonstrated that oxygen transfer conditions have a huge impact on process productivity. However, these studies were all done in different conditions and some results appear to be in contradiction. Thus, the summarization of the existing information is difficult. Also, all these studies were conducted in defined synthetic medium. Additional restraints must be considered for the development of an oxygen transfer strategy in a complex medium like municipal wastewater sludge. First, wastewater sludge has tendency to form flocs within cells get embedded as major portion of nutrients is present in the sludge solid phase. This could strongly limit oxygen transfer capacity between gas and liquid phase during the fermentation. Drouin *et al.* (2011a) also found that the maximum protease activity was obtained in concentrated (35 g/L) suspended solids sludge. High viscosity associated with high concentrated sludge also strongly limits the oxygen transfer capacity in the culture medium. Moreover, foam formation during fermentation of high concentrated municipal wastewater sludge with *Bacillus licheniformis* is a concerned problem. The phenomenon is particularly intense when moderate to high aeration and agitation rates are employed, where it is difficult to control the foam. The problem of foam formation restrained the agitation and aeration rates that can be employed in municipal wastewater sludge. In this context, the aim of this work was to investigate the effect of different oxygen transfer conditions on the production of protease by *Bacillus licheniformis* in municipal wastewater sludge.



3.7 MATERIALS AND METHODS

3.7.1 *Bacillus licheniformis* strain

Bacillus licheniformis ATCC 21424 (BL) was used in this study. An active culture was maintained by streak inoculating nutrient agar plates (3 g/L of beef extract, 5 g/L peptone and 15 g/L agar) and incubated at 35 °C for 48 h. The plates were stored at 4°C.

3.7.2 Sludge sampling

The wastewater secondary sludge was collected from Québec city municipal wastewater treatment plant and stored at 4°C. The experiments were conducted with settled sludge at SS concentration of 35 g/L.

3.7.3 Inoculum preparation

An inoculum prepared in two steps was found to be optimal in our previous study (Drouin *et al.*, 2011a) and was used in this study. A starting culture was prepared in 100 mL of nutrient broth (with composition (g/L): beef extract - 3, peptone - 5. The preparation was carried out in an Erlenmeyer of 500 mL). The medium pH was adjusted to 7.5 by addition of 4N NaOH or 4N H₂SO₄ and then autoclaved (121° C, 15 min). The sterilised medium was inoculated with a loopful of *B. licheniformis* (BL) grown on nutrient agar. The Erlenmeyers were incubated at 35°C under constant agitation of 250 revolutions per minute (rpm) for 12 h in an incubator-shaker (Lab-Line, Dubuque, Iowa, USA). A 2% (v/v) of this broth (first stage inoculum) was used as seed culture to inoculate 500 mL Erlenmeyer flask containing 150 mL of the same medium as the fermentation substrate (second stage inoculum). The suspended solids concentration used to grow the inoculum was 15 g/L. The flasks were then incubated in a rotary shaking incubator at 35 °C and at 250 rpm for 12 h. Finally, a 4.5 % (v/v) of inoculum of the actively growing cells of the pre-culture was transferred to the fermentor.

3.7.4 Fermentation procedure

3.7.4.1 Constant oxygen transfer conditions

The experiments were carried out in a 7.5 L bioreactor (Labfors 3, Infors AG, Switzerland), with a working volume of 4 L, equipped with agitation, aeration, temperature, pH, foam and dissolved oxygen (DO) control. The stirring of the system is assured by two Rushton turbine-type impellers and three baffles. The DO probe was calibrated to zero (with 1N sodium sulfite solution) and 100 % (with saturated air), and then installed on the bioreactors. 20 mL solution of polypropylene glycol (Sigma-Aldrich, Canada) was added to fermentor as anti-foam agent prior to sterilization. Sterilization was carried out by placing the apparatus in an autoclave and autoclaved at 121° C for 30 min. After the sterilization, the bioreactor was cooled down to 35°C, and the DO probe was recalibrated to zero by sparging N₂ gas, and to 100 % saturation by sparging air at the maximum agitation (650 rpm) and air flow (4 L/min.), prior to the inoculation. Fermentations were carried out at 35 °C for 48 h. Agitation and aeration were maintained at constant rates throughout the fermentation. Foam control was assured by the addition of few droplets of sterile solution (20%) of PPG. The pH was automatically controlled at 7.5 using sodium hydroxide solution (NaOH 4N) or sulphuric acid (H₂SO₄ 4N) through computer controlled peristaltic pumps. Samples were drawn from the fermentor at regular intervals to determine cell and spore counts and protease activity.

3.7.4.2 Variable oxygen transfer conditions

The experiments were carried out in a 15 L fermentor (Biogénie Inc, Québec, Québec, Canada) with a working volume of 9 L, equipped with agitation, aeration, temperature, pH, foam and dissolved oxygen (DO) control. The stirring of the system is assured by three Rushton turbine-type impellers and four baffles. The fermentor was filled with 9 L of culture medium. 20 mL solution of polypropylene glycol (Sigma-Aldrich, Canada) was added and the sterilization was carried out in situ at 121° C for 30 min. DO probe calibration, inoculation, pH, foam and temperature control during fermentation were done as the same way as in constant oxygen transfer conditions, while agitation was controlled between 300 and 400 rpm and aeration rate between 2.5 – 3.5 litres per minute (LPM) was used in order to keep the DO level above 15%. Samples were drawn from the fermentor at regular intervals to determine cell and spore counts and protease activity.

3.7.5 Analytical

3.7.5.1 Measurement of volumetric oxygen transfer coefficient (K_La), OTR and OUR

The volumetric oxygen transfer coefficient (K_La), oxygen transfer rate (OTR) and oxygen uptake rate (OUR) measurements were based on the dynamic method (Aiba *et al.*, 1973). This technique consisted in interrupting the air input for a short period. After, the aeration is re-established. The decrease (aeration off) and the increase (aeration on) in DO concentration were recorded. K_La was determined from the mass balance of the DO concentrations in the cultivation medium:

$$dC_L/dt = \text{OTR} - \text{OUR}$$

The $\text{OTR} = K_La (C^* - C_L)$, and $\text{OUR} = Q_{O_2}X$, where C^* is the saturated oxygen concentration, and C_L the DO concentration in the medium. OUR was measured by interrupting the air input:

$$dC_L/dt = - Q_{O_2}X$$

The measurements were made just after each sampling of the fermentation broth. The DO electrode was calibrated in the medium at 35 °C. Afterwards, the electrode was transferred to air-saturated distilled water at known temperature and ambient pressure. In these conditions, the saturation concentration of oxygen is known. The value then obtained was used to estimate the saturation concentration of oxygen in the cultivation media at 35 °C, and then to convert oxygen concentration in the fermentation broth from % air saturation to mmol O_2/L .

3.7.5.2 Cell and spore counts

The samples were serially diluted with sterile saline solution (0.85% w/v NaCl). The appropriately diluted samples (0.1 mL) were plated in triplicate on nutrient agar plates and incubated at 35 °C for 16-24 h to form colonies. For spore count, the appropriately diluted samples were heated in a water bath at 80 °C for 10 min. After cooling, the samples were plated in triplicate. Afterwards, the fully developed colonies were counted. In order to establish the reliability and reproducibility of the plate count technique, 10 independent samples were drawn (at the same time) from a shake flask experiment and were serially diluted and plated. Each

dilution was plated on three different plates. A standard deviation of 7% was calculated from the results.

3.7.5.3 Protease activity assay

Protease activity was determined according to Kunitz (1947) with minor modifications. Samples collected from the fermentor were centrifuged at 3620 g (5000 rpm) for 10 min at 4°C. The supernatant was appropriately diluted with borate buffer, pH 8.2. 1 mL of the properly diluted enzyme solution was incubated with 5 mL of casein solution (1.2% w/v) (Sigma-Aldrich, Canada) for 10 min, at 37 °C, in a constant temperature water bath. The reaction was then terminated by adding 5 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA). This mixture was incubated for 30 min in order to precipitate the total non-hydrolysed casein. Blanks were prepared with inactivated casein. At the end of this incubation period, the samples and the blanks were filtered using Whatman paper 934-AH (Whatman Inc, USA). The absorbance of the filtrate was measured at 275 nm using a Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian Techtron Pty. Ltd., Australia). Validation of the method was established by treating a standard enzyme solution of known enzymatic activity, in the same way and under the same conditions. One protease activity unit was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μ mole (181 μ g) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37°C. In order to establish the reliability and reproducibility of the method, the procedure was repeated 10 times from a single sample. Statistical treatment of these results showed a maximal deviation of 5%.

3.8 RESULTS AND DISCUSSION

Different experiments were done with different oxygen transfer conditions. In case of constant oxygen transfer conditions, three experiments were done by maintaining constant aeration and agitation rates throughout the fermentation. These three experiments were identified as LOT (“*low oxygen transfer conditions*”), MOT (“*medium oxygen transfer conditions*”) and HOT (“*high oxygen transfer conditions*”) in accordance with the aeration/agitations rates employed, and with the initial K_La values recorded. Experiments were also made in variable oxygen transfer conditions, with aeration and agitation rates modified throughout the fermentation course in order to maintain the DO values above 15% of saturation. These experiments were named VOT (“*variable oxygen transfer conditions*”). The conditions employed are summarized in Table 1. As mentioned by Calik *et al.* (2000), in large scale fermentation areas of varying dissolved oxygen concentrations could be present in the column, resulting in oxygen gradients for the microorganism passing through these areas at regular intervals. To avoid the phenomenon, all the experiments were done in bench-scale bioreactors. The experiments on constant oxygen transfer conditions (LOT, MOT and HOT) were carried out in a 7.5 L bioreactor with a working volume of 4 L. However, the experiments on variable oxygen transfer condition (VOT) were done in 15 L bioreactor with a working volume of 9 L: to eliminate the potential effect of sludge variability on the results, sludge used for all the experiments were collected at same time and the sludge was stored at 4°C. But even at low temperature, the sludge biomass remained active. So, equipments of different scales have been used simultaneously in order to do the experiments in the shortest period of time to avoid the effect of sludge digestion on the results.

3.8.1 Effect of constant agitation and aeration rates

3.8.1.1 Sludge limitations for oxygen transfer

Globally, the range of aeration and agitation that can be employed in wastewater sludge are restrained due to the wastewater sludge physical (viscosity, presence of flocs) and chemical (high protein contain) characteristics. Thus, the aeration and agitation rates employed in LOT experiment could be considered as the lower limit conditions i.e. where DO became the limiting factor, as DO concentration was very close to zero during almost the entire fermentation course (Figure 3c). On the other side, maximum aeration and agitation rates that can be employed are

limited by foam formation. In HOT experiment, they were initially fixed to 4.0 L/min and 650 rpm, respectively. However, in order to control foam formation, the agitation rate had to be lowered to 600 rpm after 3.5 h and the aeration rate to 3.5 L/min after 7 h (Figure 1c). Many factors favored foam formation during *B. licheniformis* fermentation in sewage sludge. First, the sludge contained high concentrations of proteins, which are known to promote foam formation by being adsorbed on lamellas between air bubbles in foam layer. The more viscoelastic lamellas obtained with adsorbed proteins are far more robust and thus inhibits air bubble coalescence and breakage leading to more intense foam formation (Pelton, 2002). Also, *B. licheniformis* is well-known producer of Poly glutamic acid (PGA) (Cromwick *et al.*, 1996; Richard and Margaritis, 2002) and accumulation of PGA in the fermentation media could cause uncontrollable foaming (Potumarthi *et al.*, 2007). Moreover, Ramnani *et al.* (2005) demonstrated the concomitant production of alkaline proteases and biosurfactant by *Bacillus licheniformis*. The biosurfactant recovered was found to reduce the surface tension of various compounds and to have good emulsifying properties. In the same vein, the addition of Tween 80, a surface active agent with strong emulsifying properties to municipal wastewater sludge for *Bacillus thuringiensis* based biopesticide production strongly increase foam formation during fermentation (Brar *et al.*, 2005). Thus, surfactant production by *B. licheniformis* in wastewater sludge could also have contributed to foam formation. Uncontrollable foam formation could lead to numerous problems, such as reduction in productivity by working volume reduction and losses in biomass and bioproduct, and increased chance of contamination (Calik *et al.*, 2005).

Many chemical anti-foam compounds can be used for foam control. Vidyarthi *et al.* (2000) demonstrated that addition of PPG during fermentation can have an inhibiting effect on cell count, spore count and product yield in *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide production from sewage sludge. However, the same authors found PPG to be the more efficient to suppress foam among all the anti-foam agents they have tested. Considering the huge amount of foam produced during fermentation of sewage sludge by *B. licheniformis*, the use of an effective anti-foam agent is imperative, but because of adverse effects of PPG, use of smallest possible quantity during fermentation is crucial. A mechanical foam breaker can also be used in combination with chemical anti-foam agent. However, the thick and consistent nature of the foam produced during fermentation strongly reduced the foam breaker efficiency i.e. the foam accumulated on the head space walls of the vessel instead of being completely disrupted and pushed back down into the media by the foam breaker. Besides the potential risk of clogging and contamination of the air

outlet filter cartridge, foam accumulation on the vessel walls could also lead to important loss in nutrients and active components during the fermentation. Thus, it is crucial to employ agitation and aeration which allow foam formation to stay under control.

3.8.1.2 Evolution of DO, K_{La} , OTR and OUR profiles

The evolution of DO, K_{La} , OTR and OUR profiles during fermentation in HOT, MOT and LOT conditions are depicted in Figures 1, 2 and 3, respectively. In HOT experiment, the DO concentration remained constant for the first 2 hours. Then, a constant decrease was observed (2-7 h), followed by a constant increase from 9 to 20 h. From 20 h until the end of fermentation, the DO concentration remained almost constant, slightly under the saturation value (Figure 1c). An initial K_{La} of 118.2 h^{-1} was measured at 3 h. From 3 to 5 h, the K_{La} considerably decreased. Between 5 and 13 h, the K_{La} could not be estimated as the DO concentrations were too low during this period. From 13 h, the K_{La} increased again up to 108.3 h^{-1} . Then, the K_{La} decreased constantly until the end of fermentation (Figure 1b). The OUR and OTR profiles are very similar (Figure 1b), it increased from 3 to 5 h. Between 5 and 13 h, no values were measured, for the reason mentioned above. Maximum OTR and OUR values were measured at 13 h (2.18 and 2.09 $\text{mmol O}_2/\text{L.h}$ respectively). Then, the OTR and OUR values decreased constantly until the end of fermentation. In case of MOT experiment, the DO concentration remained constant for the first 2 hours. After, a constant decrease was observed from 2 to 7 h. From 7 to 18 h, it remained very low under 5% of saturation. From 18 to 20 h, a rapid augmentation was recorded, followed by a constant but slower augmentation until the end of fermentation (Figure 2c). The K_{La} , OUR and OTR profiles followed almost the same pattern as in HOT conditions with an initial K_{La} of 91.2 h^{-1} measured at 3 h, and maximum OTR and OUR values measured at 6h (0.93 and 1.52 $\text{mmol O}_2/\text{L.h}$ respectively) (Figure 2b). However, in case of MOT condition, the DO concentration remained very low for a considerable period of time. Consequently, the K_{La} , OTR and OUR values could not have been evaluated between 6 and 20 h (Figure 2b). From 20 h until the end of fermentation, OUR and OTR values decreased, whereas the K_{La} values fluctuated. In case of LOT experiment, the DO concentration remained constant for the first 2 hours. After, a constant decrease was observed from 2 to 5 h and the DO concentration remained below 5% of saturation until the end of fermentation (Figure 3b), so evolution of K_{La} , OTR and OUR values could not have been evaluated during the experiment.

Even if the aeration and agitation rates were maintained constant throughout the fermentation, the oxygen transfer conditions fluctuated greatly as it can be seen by the K_La profiles measured during the HOT and MOT experiments (Figure 1b and 2b). In the first hours of fermentation, few droplets of anti-foam (PPG) solution were added at regular interval in case of MOT experiment to keep foam formation under control, and even more frequently in case of HOT experiment due to the higher agitation/aeration rates employed. The role of PPG, as any an anti-foam agent is to favour the small air bubble coalescence, rupture and release to the headspace of the vessel (Pelton, 2002). It has been demonstrated in previous work (Drouin *et al.*, 2008) that PPG also strongly increased sludge viscosity. It is well established that the K_La decreased with the increase in viscosity (Badino Jr. *et al.*, 2001; Kilonzo and Margaritis, 2004; Li *et al.*, 1995), as the increase in viscosity causes formation of larger air bubble. The benefit of small bubbles is increased diffusivity and slow rising velocities which keep air bubbles in the liquid longer, allowing more time for the oxygen to dissolve. With small bubble the air-liquid interfacial area also increase, allowing more surface for mass transfer of oxygen from gaseous to liquid phase (Kilonzo and Margaritis, 2004; Yezza *et al.*, 2004). The anti-foam could also interfere with oxygen transport by being present as a spread film on the air bubbles surface inhibiting oxygen diffusion (Garcia-Ochoa and Gomez, 2005; Pelton, 2002). Thus, the adding of PPG could explain the diminution of K_La recorded during the first 5 h of fermentation in both HOT and MOT experiments (Figures 1b and 2b). In case of HOT experiment, the K_La increased from 13 to 17 h (Figure 1b): only little amount of PPG were added as the foam formation became less important during that period. Also, it has been demonstrated in previous work (Drouin *et al.*, 2011a and b) that the sludge viscosity started to decrease considerably after 8-10 h of fermentation and continued to decrease until the end of fermentation due to sludge solids degradation by the microbial cells. This could explain the increase of K_La values from 13 to 17 h. Afterwards, the K_La fluctuated from 20 h until the end of fermentation in MOT experiment (Figure 2b). These fluctuations could be attributed to change in broth composition (nutrient consumption, cell metabolite excretion, etc), cell morphology and concentration (Calik *et al.*, 1998 and 2003). In case of HOT experiment, a continuous diminution of K_La was recorded during the same period as MOT (Figure 1b): few droplets of PPG were still added as the foam was there throughout the fermentation, which negatively affected K_La as discussed above. Also, as mentioned earlier, *B. licheniformis* is a well-known producer of PGA. The production of even small amount of PGA (a water-soluble, viscous slime material) can cause important increase of fermentation broth viscosity (Potumarthi *et al.*, 2007). *B. licheniformis* is more prone to PGA synthesis under higher oxygen transfer conditions.

Cromwick *et al.* (1996) showed that increasing the aeration rate from 0.5 vvm to 1.0 vvm doubled the PGA concentration produced by *B. licheniformis* after 72h in a synthetic medium. Thus, important PGA production in HOT experiment could explain the continuous diminution of $K_L a$ recorded. A repetition of the experiment with measures of viscosity and/or PGA concentrations could permit to validate this hypothesis.

3.8.1.3 Impact on cell growth and protease production

The evolution of cell counts, spore counts and protease activity profiles during fermentation in LOT, MOT and HOT conditions are depicted in Figures 1a, 2a and 3a, respectively. The growth phases occurred during the first 8 h in HOT conditions, 16 h in MOT conditions, and 19 h in LOT conditions. Practically no protease activity was observed during the growth phase, irrespective of the oxygen transfer conditions tested. The lowest cell (4.90×10^8 CFU/ml) and spore counts (9.77×10^5) were observed in LOT conditions, whereas the maximum cell (2.36×10^9) and spore counts (1.51×10^8) were obtained in MOT conditions (Table 2).

The protease activity started to increase at the end of the growth phase, concomitantly with the beginning of the sporulation phase, irrespective of the conditions tested. The maximum protease activity was measured in HOT condition, where the protease activity increased rapidly and attained a peak (7.75 I.U./mL) after 20 h of fermentation (Figure 1a), The protease activity increased slowly in MOT conditions and the maximum (4.17 I.U./mL) was reached after 32 h (Figure 2a). The lower protease activities were obtained in LOT conditions (Figure 3a), with a maximum of only 0.95 I.U./mL after 45 h of fermentation (Table 2).

In view of the cell counts and protease activity profiles obtained in previous and present work, the whole process can be divided in two distinct periods: the growth phase and the production phase. During the early part of the growth phase, practically no protease activity was observed. The protease activity started to increase during the later part of growth phase, concomitantly with the increase in spore count. During the production phase, the cells entered in stationary phase where most of the protease production occurred. These phases can also be distinguished from the DO, OTR and OUR profiles. In case of HOT experiment, after a short lag phase the growth phase occurred during the first 8 h of fermentation as mentioned above (Figure 1a). During growth phase, the cells metabolism is very active with the high OUR associated. As agitation and aeration rates were kept constant, lower OTR than OUR resulted in constant decrease of DO

concentrations down to 10% of saturation after 8 h (Figures 1b and c). Then, the cells entered in stationary phase (Figure 1a) and the OUR decreased as the cells became less metabolically active. Higher OTR resulted in rapid increase in DO from 8 to 20 h. From 20 h until the end of fermentation, the DO concentration stayed constant as the DO has almost reached the saturation value (Figure 1b and c). In case of MOT experiment, the growth phase (16 h) can itself be divided (Figure 2a): During the early growth phase (1-9 h), the DO abruptly decreased in consequence of higher OUR than OTR. During the late growth phase (9-16 h), there was almost no residual dissolved oxygen remaining in the media (Figure 1c) and so the OTR became the limiting factor i.e the maximum OUR was equal to and limited by the OTR during that period. After 16 h of fermentation, the cells entered in stationary phase with the reduced OUR associated (Figure 2a and b), so the DO started to increase regularly until the end of fermentation. In comparison, the OTR was a limiting factor during most of growth phase (1-19 h) and during all the production phase (19-45 h) in LOT experiment, as it can be seen by the almost total absence of residual dissolved oxygen from 5 h until the end of fermentation (Figure 3).

Calik *et al.* (2000) demonstrated that oxygen transfer conditions strongly affects product formation by influencing metabolic pathways and changing metabolic fluxes of the cells. In present case, it is clear that oxygen transfer conditions had a strong impact on the growth phase. It affected not only the growth phase length and the cells obtained, but also the cell metabolism: from the OUR and the total cell count values obtained, specific oxygen uptake rate (OUR_x ; $\mu\text{mol O}_2/10^9 \text{ cells.h}$) has been calculated during growth phase (at t-6 h) and the highest OUR_x (t-6h) was obtained in HOT experiment (Table 2) among all conditions tested. This could indicate that the cell metabolism was more active i.e. higher oxygen consumption during growth phase under high oxygen transfer conditions. However, the lower total cell counts obtained in HOT experiment compared to MOT experiment (Table 2) suggested that many non-growth associated metabolic pathways could have been active during growth phase under higher oxygen transfer conditions. In the same vein, Calik *et al.* (1998) showed that the substrate consumption by *B. licheniformis* is not proportional to biomass production under different oxygen transfer rates, indicating changes in cell metabolism with changes in oxygen transfer conditions. Also, higher agitation rates may have caused shear effects on microbial cells resulting in reduced biomass concentration (Potumarthi *et al.*, 2007). The highest and lowest cell counts obtained under MOT and LOT conditions respectively, are in accordance with Calik *et al.* (2000) who have mentioned

that growth is maximum when oxygen transfer resistance is effective, but the cells could not grow when oxygen transfer resistance is very high i.e. under very low OTR.

Oxygen transfer conditions also had a strong impact on the cell metabolism during the production phase, affecting the protease activity obtained. OUR_x has also been calculated during the production phase (at t-20 h) during MOT and HOT experiments. The highest OUR_x (t-20h) was again measured in HOT experiment (Table 2). Calik *et al.* (1998, 2000) demonstrated that oxygen transfer conditions play a role in alkaline protease production by influencing many metabolic pathways, among which the ones related to the synthesis of amino acids composing the molecular structure of the enzyme. In present work, the highest protease activity was measured in HOT experiment. Moreover, the highest specific cellular protease activity ($Y_{p/x}$; I.U./ 10^9 bacterial cell) was also obtained in HOT experiment (Table 2), which is in complete contradiction with Calik *et al.* (2000) and Frankena *et al.* (1986) who reported that protease activity per unit biomass is higher under limited oxygen transfer conditions. The very low protease activity values obtained in LOT experiment can be due to the considerable lower amount of cells, as the $Y_{p/x}$ obtained in LOT and MOT experiment are similar (Table 2). The oxygen transfer conditions also had an impact on sporulation, as demonstrated by the % of sporulation ($\%_{sporulation}$; spore count_{max}/total count_{max} x100) which was the highest (15%) in HOT experiment and lowest (0.2%) in LOT experiment. In our previous work in wastewater sludge, no clear relation between sporulation and protease production in wastewater sludge has been established (Drouin *et al.*, 2011a, b). In literature, protease production is often related to sporulation in many *bacilli*, but some reports also suggest that although sporulation and protease production are co-occurring, they are not related with each other (Gupta *et al.*, 2002). From the growth curve obtained in HOT (Figure 1a), MOT (Figure 2a) and LOT (Figure 3a) experiments, it is clear that the increase in protease activity began concomitantly with the sporulation phase in every condition. But here again, no direct relation can be established between both. For example, the spores count and the $\%_{sporulation}$ are considerably lower in LOT than MOT experiment (Table 2) although the $Y_{p/x}$ values obtained in both conditions are similar.

3.8.1.4 Combination of oxygen transfer conditions

As discussed above, the process can be divided into two periods: the growth phase and the production phase. The maximum cell count at the end of growth phase was obtained in MOT conditions. On the other hand, the maximum protease activity and specific cellular protease

activity ($Y_{p/x}$) were obtained in HOT conditions. Based on these results, a strategy to increase protease production was employed in an additional experiment: during the growth phase, the constant agitation/aeration rates corresponding to MOT conditions (Table 1) were applied, followed by a step change at the end of growth phase (at t-17 h) by increasing and maintaining the agitation/aeration to the rates corresponding to HOT conditions (Table 1) during the production phase. This experiment was identified as MOT/HOT (Figure 4). As expected, the maximum total counts obtained in MOT/HOT and MOT experiments are similar (Table 2), as the same oxygen transfer conditions were applied during growth phase in both experiments. But changes in oxygen transfer conditions at the end of the growth phase affected cell metabolism during production phase. The OUR_x (t-20 h) in MOT/HOT experiment is higher than in MOT experiment, strongly suggesting again that higher oxygen transfer conditions stimulated the cell metabolism. Some author suggested that higher shear effect associated with higher agitation and aeration rates could damage microbial cells (Hameed *et al.*, 1999) or cause enzyme inactivation (Potumarthi *et al.*, 2007). On the other hand, Kumar and Parrack (2003) reported that low protease activity under insufficient agitation rate can be attributed to the inadequate contents mixing and the inability of the culture to completely utilize the substrate. In present case, the $Y_{p/x}$ (3.11), and the maximum protease activity (5.63 I.U./mL) obtained in MOT/HOT experiment were higher than in MOT experiment (Table 2). Thus, MOT/HOT and HOT experiments demonstrated that HOT conditions seems to be more suitable than MOT conditions during production phase. MOT/HOT and HOT experiments also demonstrated that % $_{sporulation}$ is higher under high oxygen transfer conditions. However, the application of the combined oxygen transfer conditions strategy did not have the expected results. Although the Y_{px} , and the protease activity obtained in MOT/HOT experiment were higher than in MOT experiment, the same values remained considerably lower than in HOT experiment (Table 2). These results tend to prove that the protease production was severely inhibited when the DO concentration fell under 10% and/or when the OTR became the limiting factor during the late growth phase, as in MOT and MOT/HOT experiments.

3.8.2 Effect of variable agitation and aeration rates

In parallel with experiments in constant oxygen transfer conditions, an experiment (VOT 1) was made under variable oxygen transfer conditions (Figure 5): the agitation and aeration rates were adjusted throughout the fermentation in order to maintain the DO concentration above 15% of

saturation. The evolution of DO, K_{La} , OTR and OUR profiles are depicted in Figures 5b and c. As discussed above, reduction in DO due to high values of OUR (Figure 5b and c) was recorded during exponential growth phase and consequently the DO concentration fell below 20% of saturation so the OTR was increased by the use of higher agitation and aeration rates. Thus, K_{La} and OTR attained maximum near the end of the growth phase. Then, agitation and aeration rates were decreased in response to the reduction of OUR associated with the onset of production phase which could explain the lower K_{La} and OTR recorded during production phase. The cell counts, spore counts and protease activity profiles are illustrated in Figure 5a. The growth phase occurred during the first 18 h of fermentation. The maximum cell and spore counts attained were 1.48×10^9 and 6.57×10^7 CFU/mL, respectively. Like all previous conditions tested, the protease activity started to increase concomitantly with the beginning of the sporulation phase and attained a peak (9.84 I.U./mL) after 35 h of fermentation.

As discussed above, foam formation during growth phase was particularly intense under moderate to high agitation and aeration rates. However, in case of VOT conditions, lower oxygen transfer conditions were employed at the beginning of fermentation as demonstrated by the lower initial K_{La} value measured (Table 1). Under lower agitation and aeration rates, the foam formation was less important and only very little amount of PPG was needed. So, during the first hours of fermentation, the K_{La} slightly increased under unchanged agitation/aeration rates (Figure 5), whereas it severely decreased in MOT, HOT and MOT/HOT experiments due to more important volumes of PPG added (Figures 1 and 2). The increase of K_{La} observed could be attributed to a decrease in viscosity (sludge solids degradation by the microbial cells) as discussed above. The positive effect of increasing K_{La} , combined with relatively low OUR during growth phase (Figure 5) caused the DO concentration to decrease slowly and the agitation and aeration rates had to be increased only after 12 h of fermentation. If cell counts obtained in VOT 1 experiment are almost as high as in MOT and MOT/HOT experiments, the $Y_{p/x}$ and the protease activity values obtained are considerably higher (Table 2).

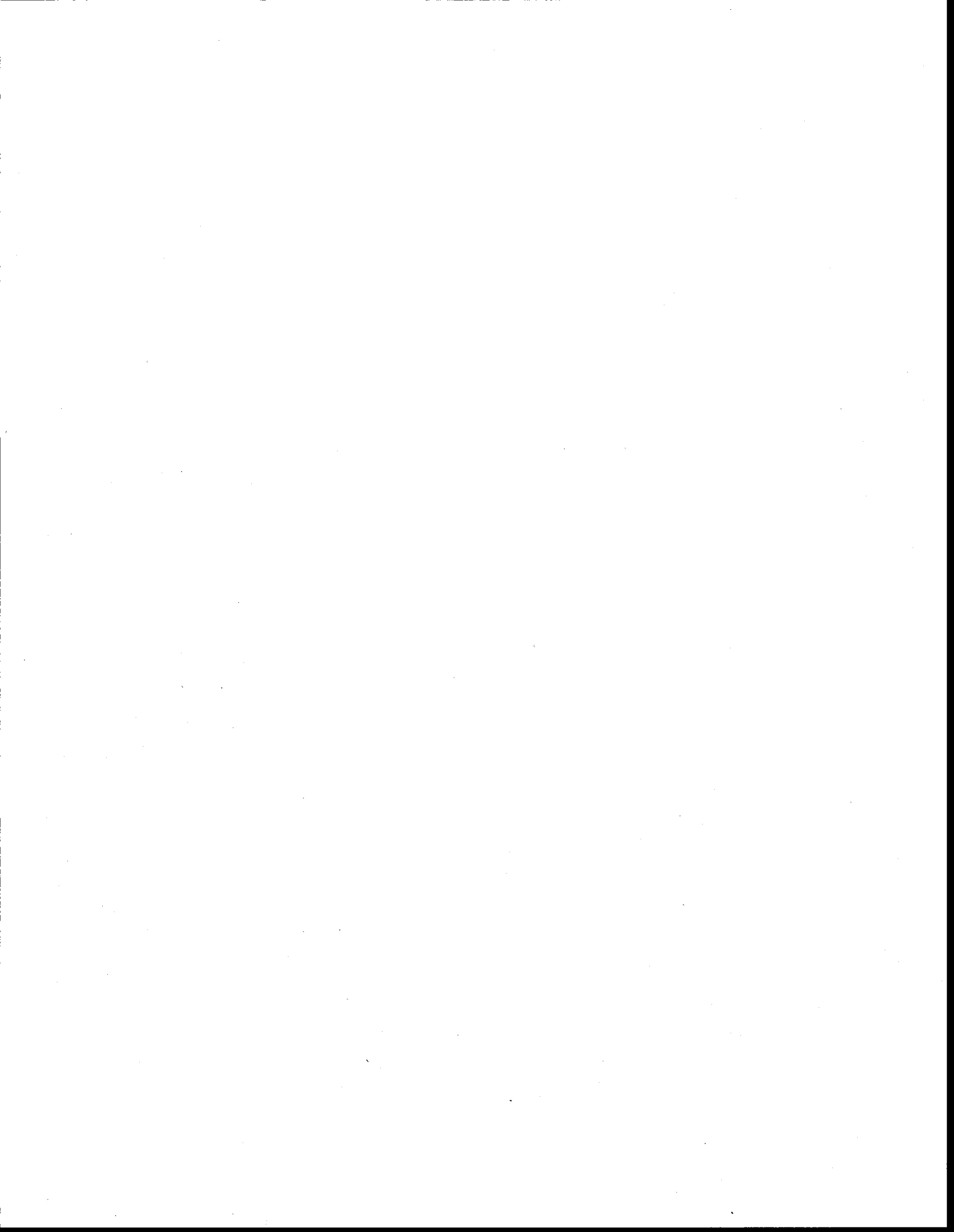
As previous experiments demonstrated that higher oxygen transfer conditions during production phase are more suitable for protease production, VOT 1 experiment was repeated, but instead of decreasing agitation and aeration rates in response to OUR reduction at the onset of production phase, the higher oxygen transfer conditions of the late growth phase were maintained throughout the whole production phase. The experiment was named VOT 2 (Figure 6). The cell counts

obtained (1.64×10^9) were similar to VOT 1 experiment, as the same conditions were maintained during growth phase, whereas higher $Y_{p/x}$ (7.75) and $\%_{\text{sporulation}}$ (7.2) expected with higher oxygen transfer conditions were obtained. Thus the protease activity was increased and a maximum of 12.71 I.U./mL was obtained, which is the highest value obtained among all conditions tested (Table 2).

3.9 CONCLUSIONS

The effects of oxygen transfer were first investigated under low, medium and high oxygen transfer conditions. From the results, it was found that protease production was highly stimulated under high oxygen transfer conditions, but maintaining such conditions throughout the fermentation was not suitable because under high aeration and agitation rates, foam formation was very problematic during the growth phase. Also, under high oxygen transfer conditions, energy and substrate could have been consumed by non-growth associated metabolic pathways instead of being used for biomass production during growth phase. Higher shear stress caused by high agitation rates could also have contributed to lower cell counts. So even with high protease production per cells unit, considerably lower amount of cells obtained caused low protease activity values. On the other hand, growth was maximum under the medium oxygen transfer conditions. However, under those conditions, the DO concentration fell below 10% of saturation and the oxygen transfer became the limiting factor for the oxygen uptake by the cells during the late growth phase, which strongly inhibited protease production. Thus, employing variable oxygen transfer conditions i.e. adjusting aeration and agitation rates throughout the fermentation was found to be more appropriate. By this way, lower aeration and agitation rates were initially employed, but were gradually increased during growth phase in order to maintain the DO concentration above 15 % of saturation, which favored growth and kept foam formation controllable, whereas high agitation and aeration rates were maintained throughout the production phase in order to stimulate protease production.

Thus, the most suitable oxygen transfer conditions to maintain throughout the fermentation were identified. However, many aeration/agitation combinations are possible for a given oxygen transfer condition. In wastewater sludge, excessive foam formation is mainly caused by high aeration rates, whereas agitation regime seems to have a greater impact than aeration rate on oxygen transfer conditions. Therefore, the effects of different agitation/aeration rate combinations should be studied in future work. Moreover, the present results demonstrated that the lower critical DO concentration for protease production is situated below 10% of saturation. Additional experiments should be done to determine the optimal lower DO concentration limit for protease production.



ACKNOWLEDGEMENT

Sincere thanks are due to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant A 4984, Canada Research Chair) for their financial support.



REFERENCES

- Aiba S., Humphrey A.E. and Millis N.F. (1973). *Biochemical Engineering*, 2^e Édition, Academic Press, New-York, États-Unis, 434 pages.
- Badino Jr A.C., Facciotti M.C.R. and Schmidell W. (2001). Volumetric oxygen transfer coefficient (K_La) in batch cultivations involving non-newtonian broths. *Biochem. Eng. J.* 8: 111-119.
- Brar S.K., Verma M., Barnabé S., Tyagi R.D., Valéro J.R. and Surampalli R. (2005). Impact of Tween 80 during *Bacillus thuringiensis* fermentation of wastewater sludges. *Process Biochem.* 40: 2695-2705.
- Calik P., Calik G. and Ozdamar T.H. (1998). Oxygen transfer effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*: Use of citric acid as the carbon source. *Enzyme Microb. Technol.* 23: 451-461.
- Calik P., Calik G. and Ozdamar T.H. (2000). Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Bioeng.* 69 (3): 301-311.
- Calik P., Celik E., Telli I.E. Oktar C. and Ozdemir E. (2003). Protein-based complex medium design for recombinant serine alkaline protease production. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 975-986.
- Calik P., Ileri N., Erdinc B.I., Aydogan N. and Argun M. (2005). Novel antifoam for fermentation processes: fluorocarbon-hydrocarbon hybrid unsymmetrical bolaform surfactant. *Langmuir* 21:8613-8619.
- Cromwick A-M., Birrer G. and Gross R. (1996). Effects of pH and aeration on poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 50: 222-227.

- 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 (3): 423-429.
- Drouin M., Yan S., Tyagi R.D., Valéro J.R. and Surampalli R.Y. (2011a). Production of alkaline proteases using wastewater sludge as a raw material. Submitted to *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*
- Drouin M., Yan S., Lai C.K., Tyagi R.D. and Surampalli R.Y. (2011b). Improvement of municipal wastewater sludge biodegradability to enhance the production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis*. Submitted to *Bioresour. Technol.*
- Frankena J., Koningstein G.M., Van Verseveld H.M. 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.
- Garcia-Ochoa F. and Gomez E. (2005). Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 92 (6): 761-772.
- Gupta R., Beg Q.K., Khan S. and Chauhan B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 381-395.
- Hameed A., Keshavarz T. and Evans C. (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.
- Joo H-S., Kumar C.G., Park G-C., Kim K.T., Paik S.R. and Chang C-S. (2002). Optimisation of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochem.* 38: 155-159.
- Kilonzo P.M. and Margaritis A. (2004). The effects of non-newtonian broth viscosity and small bubble segregation on oxygen mass transfer in gas-lift bioreactors: a critical review. *Biochem. Eng. J.* 17: 27-40.
- Kole M.M., Draper I. and Gerson D.F.(1988). Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen controlled, glucose fed-batch cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 404-408.

- Kumar G. and Parrack P. (2003). Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 757-762.
- Kunitz M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310.
- Li G.Q., Qiu H.W., Zheng Z.M., Cai Z.L. and Yang S.Z. (1995). Effects of fluid rheological properties on mass transfer in a bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 62: 385-391
- 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.
- Pelton R. (2002). A review of antifoam mechanisms in fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29: 149-154.
- Potumarthi R., Subhakar C. and Jetty A. (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.
- Ramnani P., Suresh Kumar S. and Gupta R. (2005). Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: Bioformulation as detergent additive. *Process Biochem.* 40: 3352-3359.
- Richard A. and Margaritis A. (2002). Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of Poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 82 (3): 299-305.
- Vidyarthi A.S., Desrosiers M., Tyagi R.D. and Valéro J.R. (2000). Foam control in biopesticide production from sewage sludge. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25: 86-92.
- Yezza A., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y. and Smith J. (2004). Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 545-552.



Table 1. Description of oxygen transfer conditions employed.

Oxygen transfer conditions	Agitation rate (rpm)	Aeration rate (L/min.)	Initial K_{La} (h^{-1})
HOT	650	4.0	118.2
MOT	500	3.0	91.2
LOT	300	2.5	24.6
MOT/HOT	500/600	3.0/3.5	94.4
VOT 1	variable (DO maintained over 15%)		53.7
VOT 2	variable (DO maintained over 15%)		59.9

Table 2. Process Performance of *B. licheniformis* under different oxygen transfer conditions

	<i>HOT</i>	<i>MOT</i>	<i>LOT</i>	<i>MOT/</i> <i>HOT</i>	<i>VOT 1</i>	<i>VOT 2</i>
Total count _{max} (10 ⁹ CFU/mL)	0.90	2.36	0.49	1.81	1.48	1.64
Spore count _{max} (10 ⁸ CFU/mL)	1.41	1.51	0.01	1.88	0.65	1.17
Protease activity _{max} (I.U./mL)	7.75	4.17	0.95	5.63	9.84	12.71
Y _{p/x} (I.U./10 ⁹ bacterial cell)	8.71	1.77	1.93	3.11	6.65	7.75
% sporulation	15.72	6.40	0.20	10.39	4.44	7.13
OUR _x (t-6 h)(μmol O ₂ /10 ⁹ cells.h)	31.3	16.0	-	21.3	9.0	14.9
OUR _x (t-20 h) (μmol O ₂ /10 ⁹ cells.h)	1.55	0.54	-	0.90	0.57	1.10

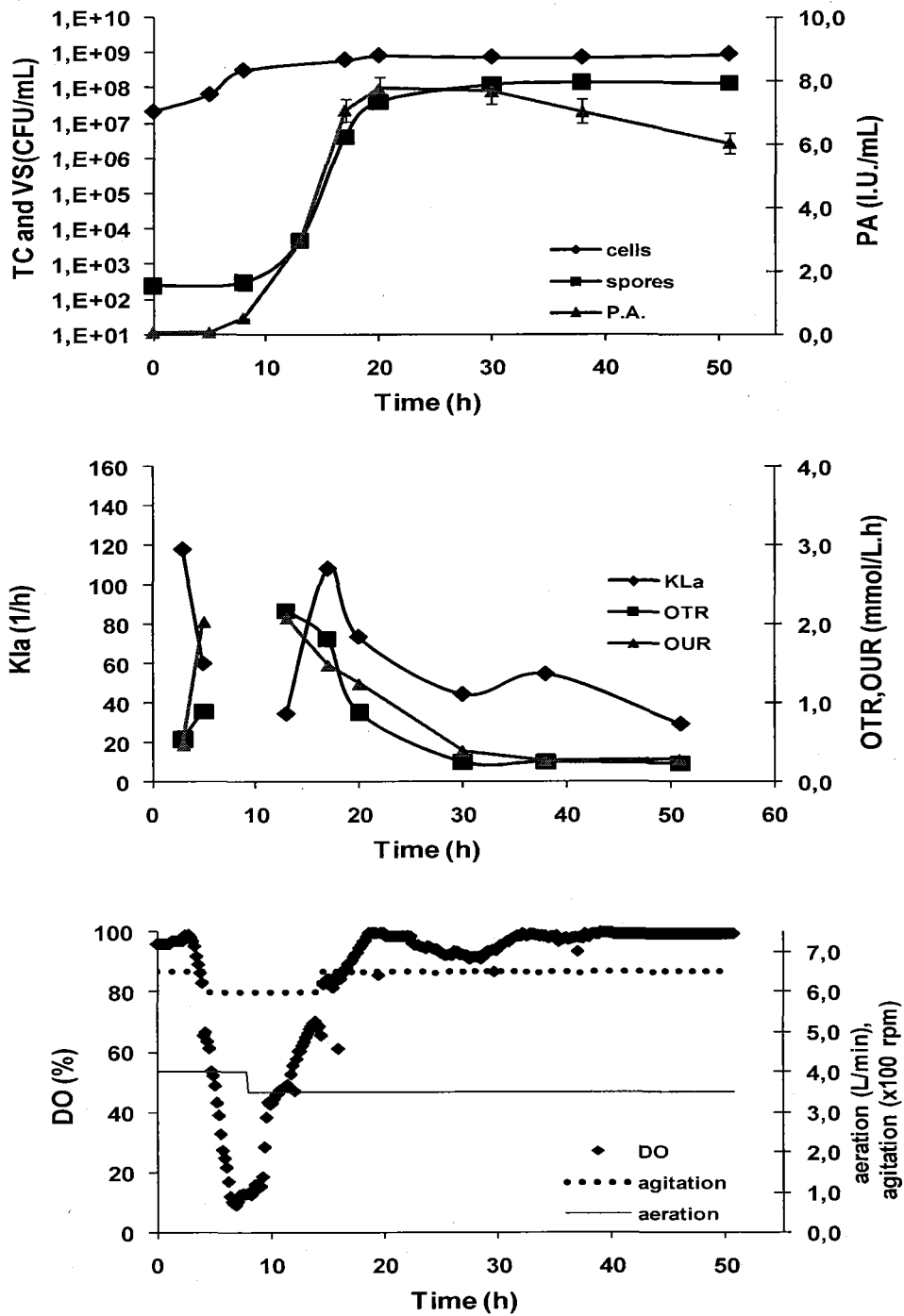


Figure 1: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa, OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates (c) during *Bacillus licheniformis* growth in HOT experiment.

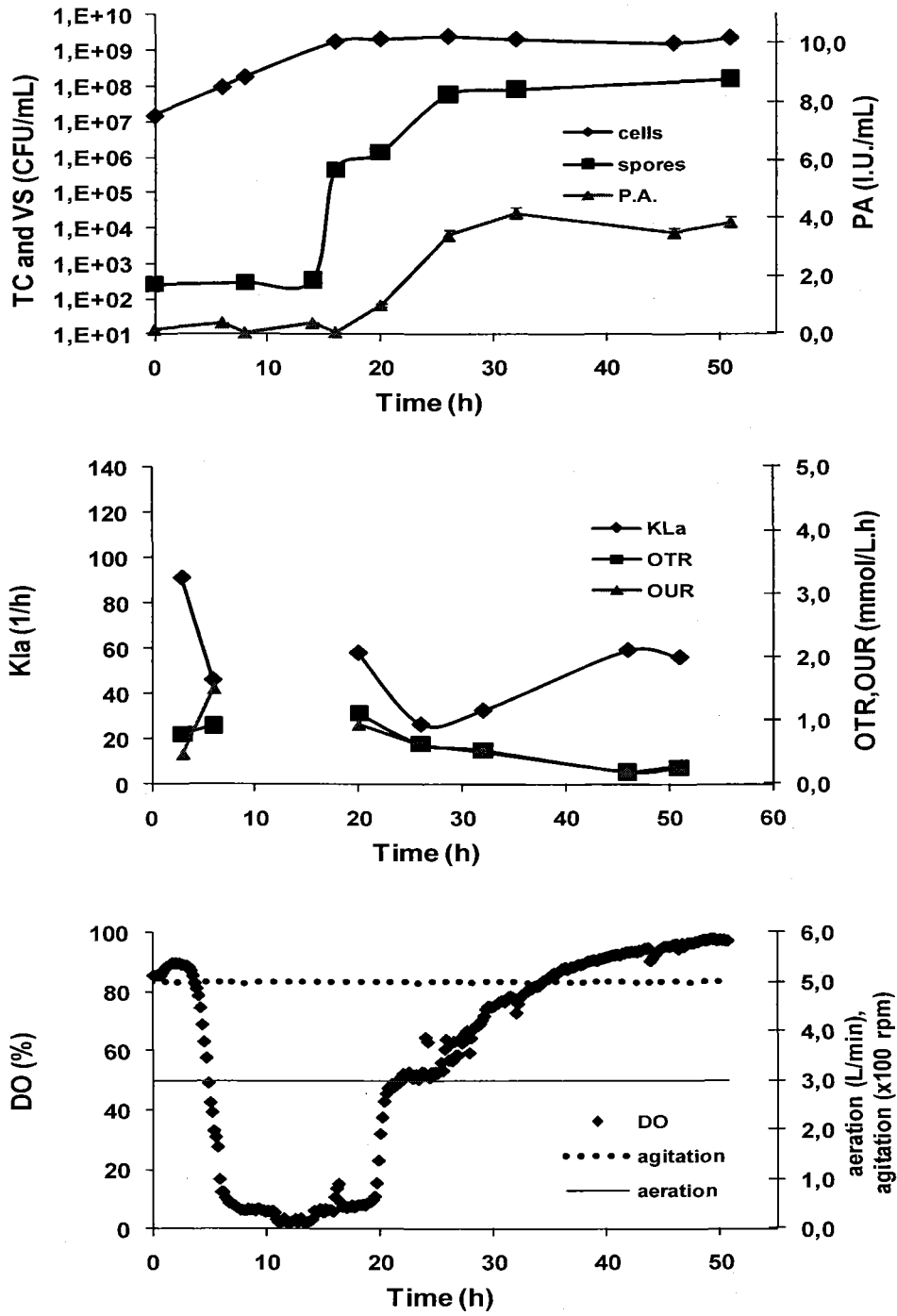


Figure 2: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa , OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates (c) during *Bacillus licheniformis* growth in MOT experiment.

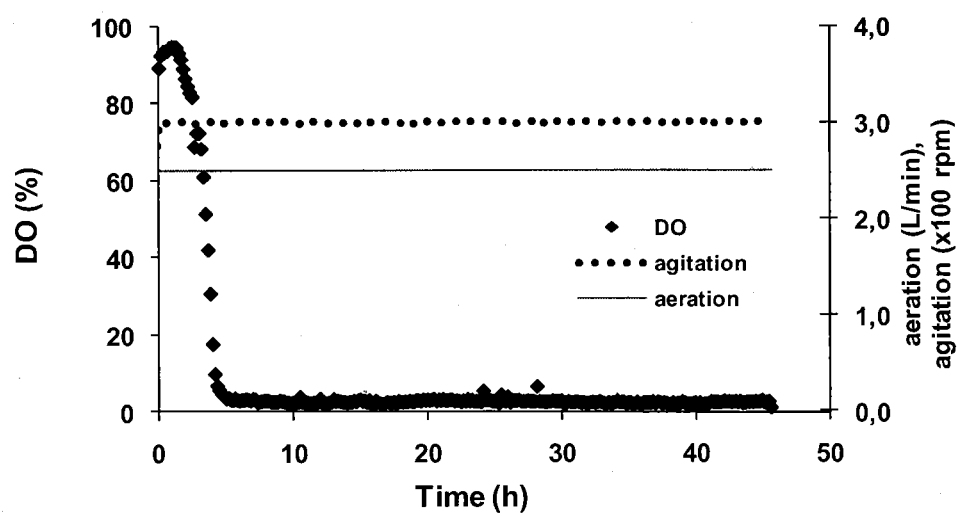
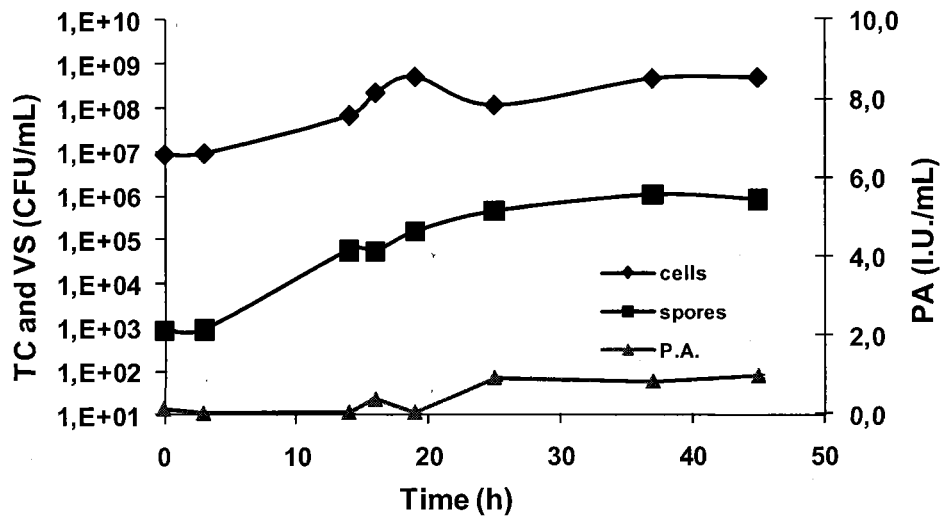


Figure 3: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a) and profiles of DO, agitation and aeration rates (b) during *Bacillus licheniformis* growth in LOT experiment.

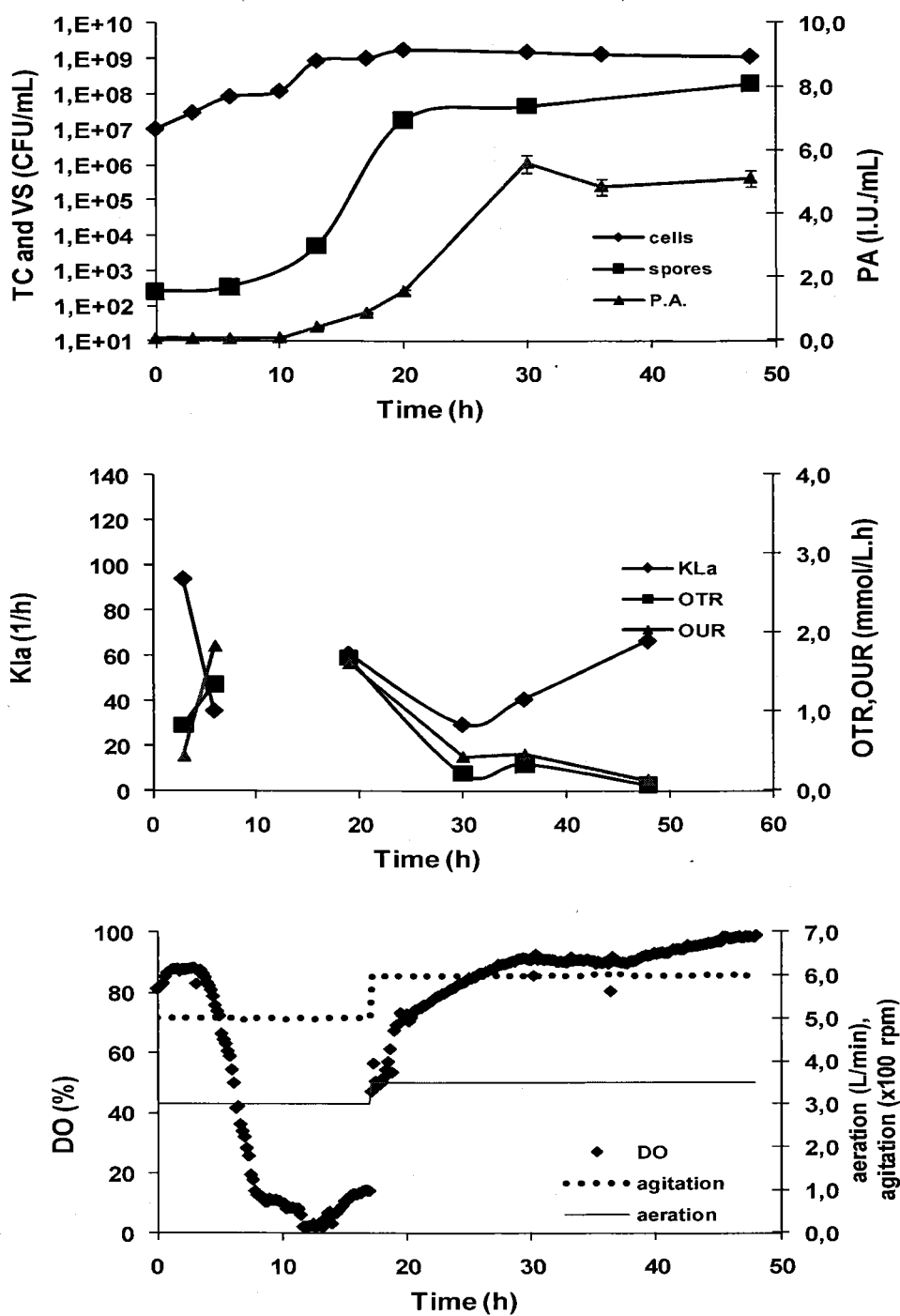


Figure 4: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa, OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates (c) during *Bacillus licheniformis* growth in MOT/HOT experiment.

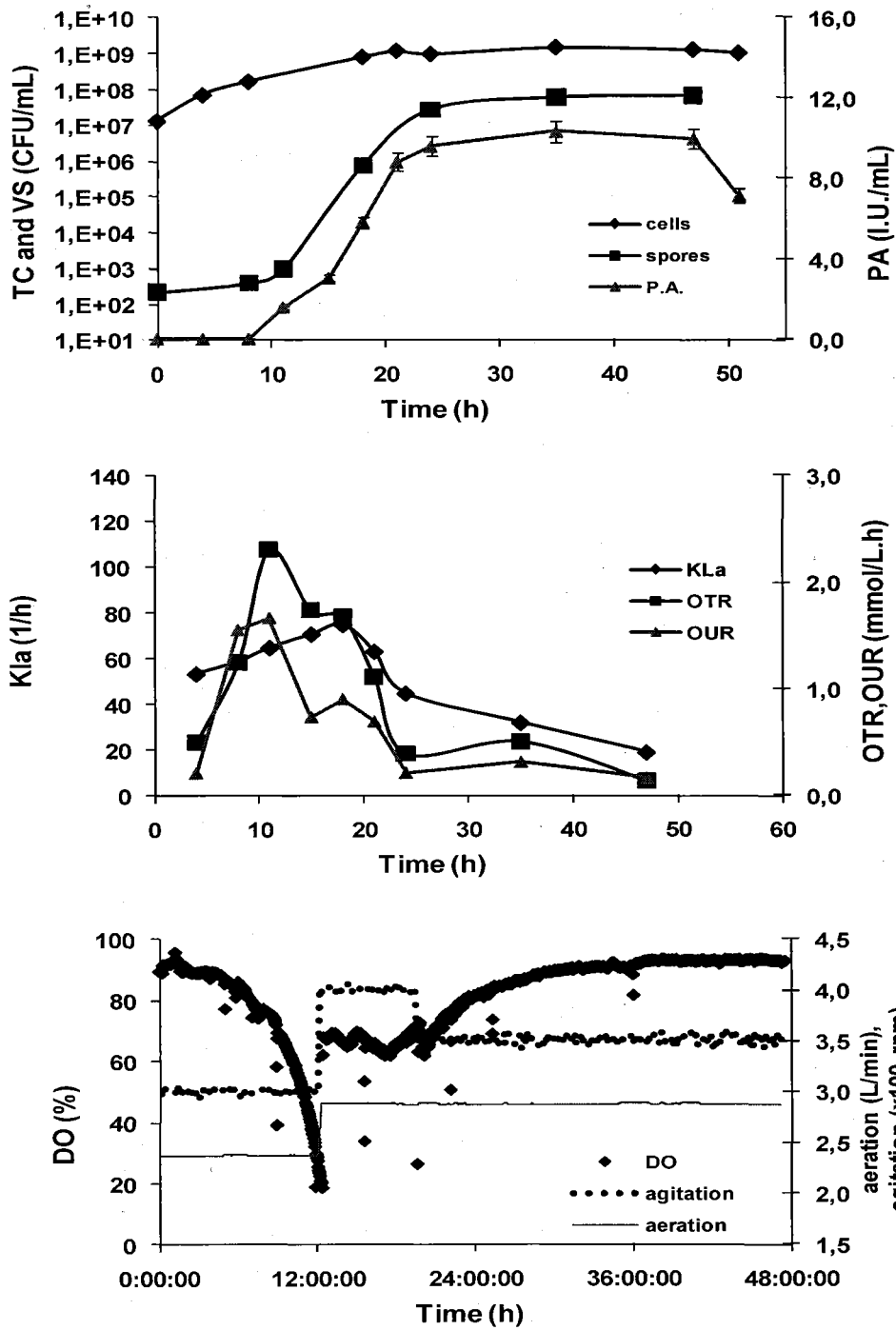


Figure 5: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa, OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates (c) during *Bacillus licheniformis* growth in VOT 1 experiment.

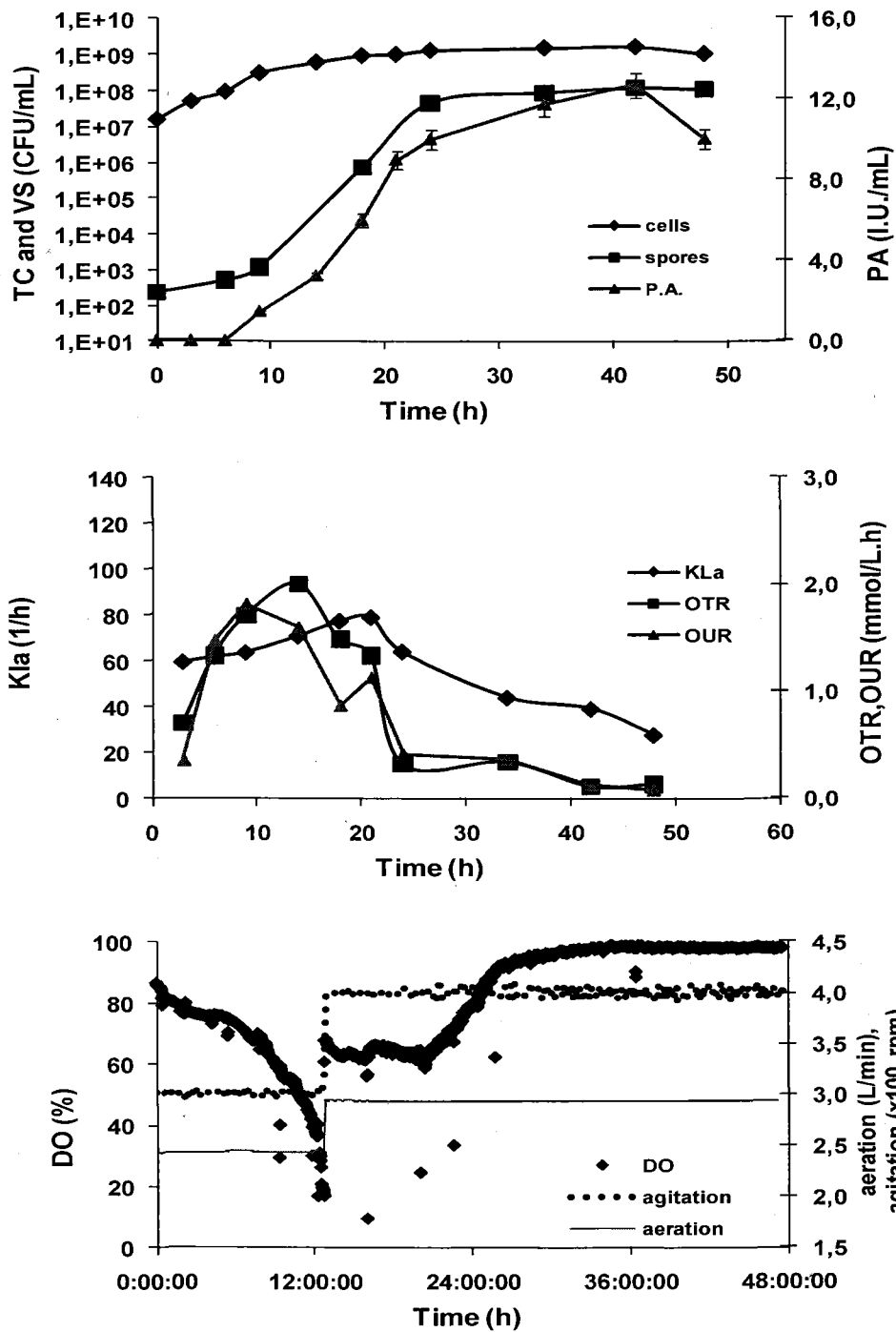


Figure 6: Evolution of total viable cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) (a), KLa, OTR, OUR (b) and profiles of DO, agitation and aeration rates (c) during *Bacillus licheniformis* growth in VOT 2 experiment.

CHAPITRE 4:
INFLUENCE DU PROCÉDÉ DE
TRAITEMENT DES EAUX SUR
LA PRODUCTION DE
PROTÉASES

(Résultats de l'objectif 3)



**EVALUATION OF THE POTENTIAL OF MUNICIPAL WASTEWATER SLUDGE AS
A NEW, ABUNDANT AND WIDELY AVAILABLE RAW MATERIAL FOR ALKALINE
PROTEASE PRODUCTION**

M. Drouin*, J. Bezawada*, R.D. Tyagi* and R.Y. Surampalli**

*Institut National de la Recherche Scientifique, centre Eau, Terre et Environnement, Université
du Québec, 490 de la Couronne, Québec, G1K 9A9, Canada

** US EPA, P.O. Box-17-2141, Kansas City, KS 66117, USA

(EN PRÉPARATION)



RÉSUMÉ

Des essais de production de protéases ont été menés en bioréacteurs de 7,5 et 15 L en utilisant des boues d'épuration provenant de deux différentes installations de traitement des eaux usées municipales comme substrat de fermentation. Les résultats obtenus ont démontré que l'ajout d'alun et de polymères dans les boues au cours du procédé de traitement des eaux usées de la ville de Québec (Québec, Canada) a un effet bénéfique sur la production de protéases (+16%) lorsque ces boues sont employées pour la production de protéases. Cependant, l'addition de chlorure ferrique aux boues au cours du procédé de traitement des eaux usées de la ville de Victoriaville (Québec, Canada) n'a pas d'impact significatif sur la production de protéases. Les activités protéolytiques obtenues dans les boues de la ville de Québec ont été plutôt constantes (-6% à +9%) d'un échantillon de boue à l'autre, alors que les activités protéolytiques obtenues dans les différents échantillons de boues de la Ville de Victoriaville ont présenté des variations considérables (-22% à +32%). Des fermentations ont été conduites dans les boues de la ville de Québec en combinant les conditions trouvées les plus efficaces pour la production de protéases lors de travaux précédents. Des boues non prétraitées (RAW) et un mélange de boues prétraitées et non prétraitées (MIX) ont été utilisées pour ces expériences. Des activités protéolytiques maximum ont été obtenues après 36 h dans les boues MIX et après 42 h dans les boues RAW. Les fermentations ont été conduites à pH 7,5, mais l'augmentation du pH de 7,5 à 10 à la fin de la fermentation a permis une meilleure récupération des enzymes. La combinaison des meilleures conditions a permis une augmentation significative des activités protéolytiques: à pH 10 et à 55°C, les protéases produites dans les boues RAW et MIX ont généré des activités de 66.74 U.I./ml et 80.93 U.I./ml, respectivement.



ABSTRACT

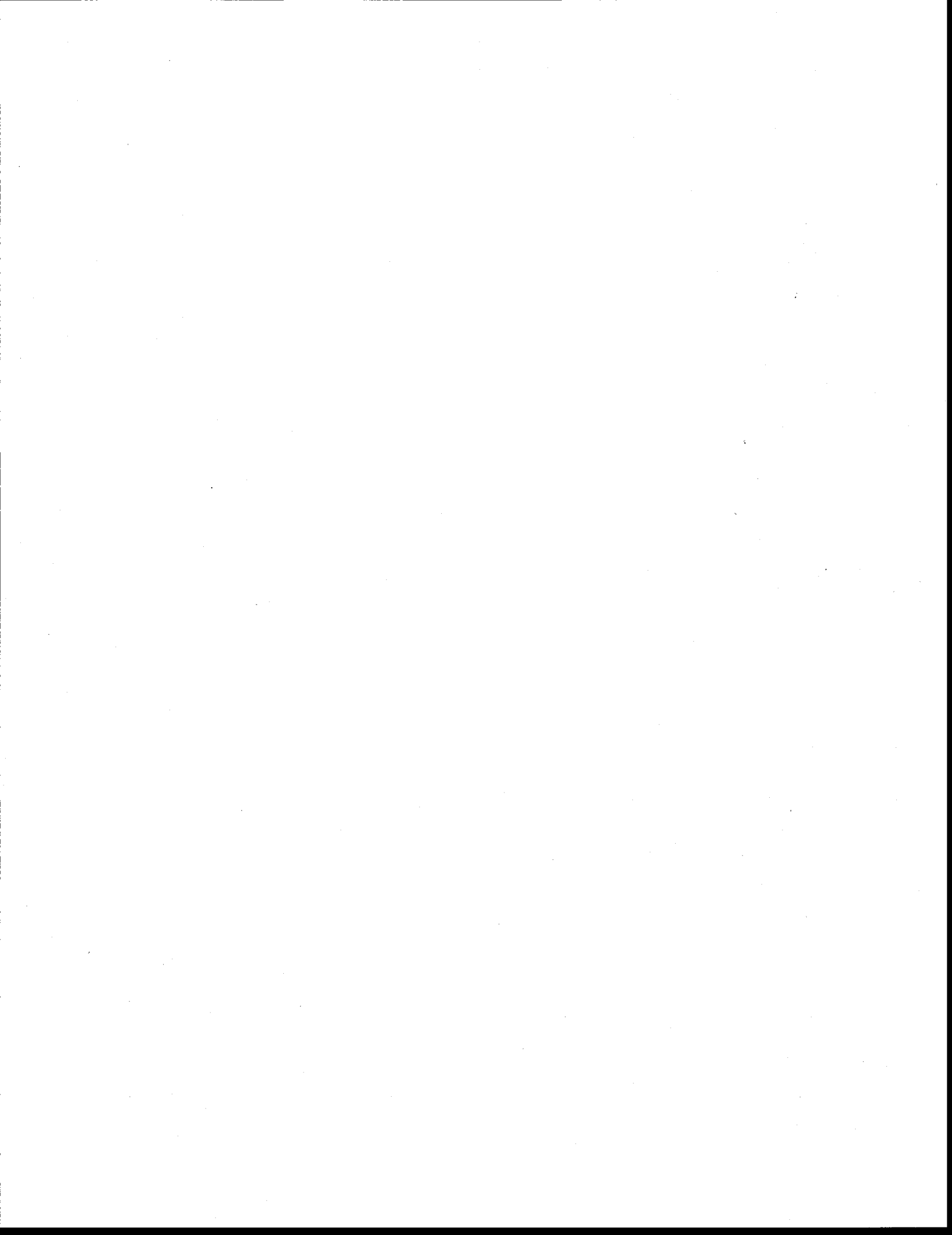
Protease production essays have been conducted in bench-scale bioreactors (7.5 and 15 L) using sludge samples from two different municipal wastewater treatment plants as raw material. Results demonstrated that the addition of alum and polymers into sludge during the Québec (Québec, Canada) wastewater treatment process has a beneficial effect on protease activity (+16%) when the sludge are employed for protease production whereas the addition of ferric chloride to sludge during the Victoriaville (Québec, Canada) wastewater treatment process do not have significant impact on protease production. Protease activities obtained in Québec sludge were fairly constant (-6% to +9%) from one batch to another, whereas considerable variations (-22% to +32%) were recorded in sludges from Victoriaville. Experiments with sludge from Québec treatment plant were conducted by combining the conditions found the most suitable for protease production in previous works. Untreated sludge (RAW), and a mixture of thermal-alkaline pretreated sludge and untreated sludge (MIX) were used for these experiments. Maximum protease activities were recorded after 36 h in MIX sludge and after 42h in RAW sludge. Fermentations were conducted at pH 7.5 but the increase of pH from 7.5 to 10 at the end of fermentation permitted better enzyme recovery. The combination of the most suitable conditions allowed significant increases in protease activities: at pH 10 and 55°C, proteases recovered from RAW and MIX sludge produced activities of 66.74 I.U./ml and 80.93 I.U./ml, respectively.



4.1 INTRODUCTION

Developing new ways for economical disposal or re-use of wastewater sludge is worldwide challenge. Production of many values added products from wastewater sludge is a promising avenue. Among them, microbial proteases are attractive, as they constitute one of the most important groups of industrial enzymes (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002; Shrinivas *et al.*, 2012). Proteases from diverse microorganisms such as *Bacillus licheniformis* are normally produced in complex, expensive synthetic culture media which is responsible for 30 to 40% of the production costs (Kumar and Parrack, 2003; Joo *et al.*, 2002). Thus, municipal wastewater sludge represents an abundant, widely available, cheap medium that could support protease production at considerably lower costs. The protease production process also allowed an important volume reduction of residual sludge (Drouin *et al.*, 2011b). Many parameters influencing protease production by *B. licheniformis* in wastewater sludge were studied in previous works (Table 1). Thus the most suitable conditions were identified and the results are promising. However, the different parameters were studied separately. So the combination of the identified conditions is suitable in order to increase further the process performance.

Moreover, until now all the protease production essays were performed in secondary sludge from the same treatment plant. Municipal wastewater sludge is complex and heterogeneous materials mainly composed of different forms of organic matters ranging from easily biodegradable to non-biodegradable (Tirado-Montiel *et al.*, 2003). Many factors can influence the sludge composition, such as the wastewater composition and the type of wastewater treatment process (Barnabé *et al.*, 2004). Also, chemicals are frequently added to wastewater and/or to sludge to improve the wastewater treatment processes efficiency. These chemicals are modifying the composition and the physical characteristics of sludge and their effects on protease production were never evaluated. Thus, essays with municipal wastewater sludge issued from different wastewater treatment processes/plants must be performed in order to evaluate the global potential of wastewater sludge for protease production.



4.2 MATERIAL AND METHODS

4.2.1 *Bacillus licheniformis* strain

Bacillus licheniformis ATCC 21424 was used in this study. An active culture was maintained by streaking on nutrient agar plates (3 g/L of beef extract, 5 g/L peptone and 15 g/L agar) and incubating at 35°C for 48 h. The plates were stored at 4°C.

4.2.2 Sludge sampling

4.2.2.1 Samples from Québec (Québec, Canada) wastewater treatment plant

After screening and grit removal pre-treatment steps, the Quebec treatment plant process consisted of a primary settling step, followed by a biofiltration step. At regular interval, the biofilters must be washed/de-clogged and the secondary sludge is resulting from the procedure. Alum and polymers are added to the wash-waters exiting from the biofilters. Then the wash-waters are routed to settling basin to allow decantation of the suspended solids. Samples were collected at two different points and stored at 4°C.

Upstream from alum/polymer injection points: first, wash-waters were collected during the washing of biofilter, and then settled by gravity settling to increase the suspended solids (SS) concentration up to 20 g/L.

Downstream from alum/polymer injection points: after, sludge was collected at the bottom of the settling basin and was settled by gravity settling in order to obtain the desired SS concentration (20 or 35 g/L).

4.2.2.2 Samples from Victoriaville (Québec, Canada) wastewater treatment plant

After screening and grit removal pre-steps, the Victoriaville treatment plant used activated sludge as sole treatment process, so the sludge are resulting from the settling of the mixed liquor. Ferric chloride (FeCl_3) is added to the mixed liquor exiting from the aeration basin before this one gets routed to a settling basin. Samples were collected at two different points and stored at 4°C.

Upstream from FeCl₃ injection point: first, mixed liquor was collected at level of the aeration basin overflow and then settled by gravity settling to increase the SS concentration up to 20 g/L.

Downstream from FeCl₃ injection point: after, sludge was collected at the bottom of the settling basin and was settled by gravity settling in order to obtain the desired SS concentration (20 g/L).

4.2.3 Sludge pre-treatment

Two different types of sludge (with and without pre-treatment) were used in this study.

Raw sludge (RAW): sludge settled by gravity settling (20 or 35 g/L SS)

Mixed sludge (MIX). A mixture, containing 75 % of raw sludge and 25 % of thermal-alkaline pre-treated sludge, was used as fermentation medium. The complete procedure for the thermo-alkaline pre-treatment of sludge was described in Drouin *et al.* (2011b). The SS concentration of raw and pre-treated sludge used to do the mixture was previously adjusted to 35 g/L, respectively.

4.2.4 Inoculum preparation

An inoculum prepared in two steps was found to be optimal in our previous study (Drouin *et al.*, 2011a) and was used in this study. A starting culture was prepared in 100 mL of nutrient broth (with composition (g/L): beef extract - 3, peptone - 5. The preparation was carried out in an Erlenmeyer of 500 mL). The medium pH was adjusted to 7.5 by addition of 4N NaOH or 4N H₂SO₄ and then autoclaved (121° C, 15 min). The sterilised medium was inoculated with a loopful of *B. licheniformis* grown and stored on nutrient agar. The Erlenmeyers were incubated at 35°C under a constant agitation of 250 revolutions per minute (rpm) for 12 h in an incubator-shaker (Lab-Line, Dubuque, Iowa, USA). A 2% (v/v) of this broth (first stage inoculum) was used as seed culture to inoculate 500 mL Erlenmeyer flask containing 150 mL of the same medium as the fermentation substrate (raw or pre-treated sludge) (second stage inoculum). The suspended solids concentration used to grow the inoculum was 15 g/L. The flasks were then incubated in a rotary shaking incubator at 35 °C and at 250 rpm for 12 h. Finally, a 4.5 % (v/v) of inoculum volume of the actively growing cells of the pre-culture was transferred to the fermentor.

4.2.5 Fermentation procedure

4.2.5.1 7.5 L bioreactor

A total of 6 experiments were carried out in a 7.5 L bioreactor (Labfors 3, Infors AG, Switzerland), with a working volume of 4 L, equipped with agitation, aeration, temperature, pH, foam and dissolved oxygen (DO) control. The DO probe was calibrated to zero (with 1N sodium sulfite solution) and 100 % (with saturated air), and then installed on the bioreactors. 20 mL solution of polypropylene glycol (Sigma-Aldrich, Canada) was added to fermentor as anti-foam agent prior to sterilization. Sterilization was carried out by placing the apparatus in an autoclave and autoclaved at 121° C for 30 min. After the sterilization, the bioreactor was cooled down to 35°C, and the DO probe was recalibrated to zero by sparging N₂ gas, and to 100 % saturation by sparging air at the maximum agitation (650 rpm) and air flow (4 L/min.), prior to the inoculation. Fermentations were carried out at 35°C for 48 h. Agitation was controlled between 300 and 600 rpm whereas an aeration rate between 2.5 – 4 litre per minute (LPM) was used to keep the DO level above 20% of saturation. The pH was automatically controlled at 7.5 using sodium hydroxide solution (NaOH 4N) or sulphuric acid (H₂SO₄ 4N) through computer controlled peristaltic pumps. Samples were drawn from the fermentor at regular intervals to determine cell and spore counts and protease activity.

4.2.5.2 15 L bioreactor

Two experiments were carried out in a 15 L fermentor (Biogénie Inc, Quebec, Quebec, Canada) with a working volume of 9 L, equipped with agitation, aeration, temperature, pH, foam and dissolved oxygen (DO) control. The fermentor was filled with 9 L of culture medium. 20 mL solution of polypropylene glycol (Sigma-Aldrich, Canada) was added and the sterilization was carried out in situ at 121° C for 30 min. DO probe calibration, inoculation and temperature control during fermentation were done as the same way as with the 7.5 L bioreactor. Agitation and aeration rates were controlled in accordance with the variable oxygen transfer conditions strategy developed in previous work (Drouin *et al.*, 2011d). The pH was automatically controlled at 7.5 using sodium hydroxide solution (NaOH 4N)/ concentrated ammonium hydroxide (NH₄OH 25%) or sulphuric acid (H₂SO₄ 4N) through computer controlled peristaltic pumps. Samples were drawn from the fermentor at regular intervals to determine cell and spore counts and protease activity.

4.2.6 Analytical

4.2.6.1 Viscosity measurements

Viscosity analyses were carried out on fresh samples by using a rotational viscometer (DVII+, Brookfield) equipped with small sample adapter spindle (SC4 34, Brookfield). The calibration and the measurements were carried out according to the instrument's manual.

4.2.6.2 Cell and spore counts

The samples were serially diluted with sterile saline solution (0.85% w/v NaCl). The appropriately diluted samples (0.1 ml) were plated (3x) on nutrient agar plates and incubated at 35°C for 16-24 h to form colonies. For spore count, the appropriately diluted samples were heated in a water bath at 80°C for 10 min. After cooling, the samples were plated (3x). Afterwards, the fully developed colonies were counted. In order to establish the reliability and reproducibility of the plate count technique, 10 independent samples were drawn (at the same time) from a shake flask experiment and were serially diluted and plated. Each dilution was plated on three different plates. A standard deviation of 7% was calculated from the results.

4.2.6.3 Protease activity assay

Protease activity was determined according to Kunitz (1947) with minor modifications. Samples collected from the fermentor were centrifuged at 3620 g (5000 rpm) for 10 min at 4 °C. The supernatant was appropriately diluted with borate buffer, pH 8.2 (or with pH 10 buffer if specified). 1 ml of the properly diluted enzyme solution was incubated with 5 ml of casein solution (1.2% w/v) (Sigma-Aldrich, Canada) for 10 minutes at 37 °C (or at 55°C if specified) in a constant temperature water bath. The reaction was then terminated by adding 5 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA). This mixture was incubated for 30 min in order to precipitate the total non-hydrolyzed casein. Blanks were prepared with inactivated casein. At the end of this incubation period, the samples and the blanks were filtered using Whatman paper 934-AH (Whatman Inc, USA). The absorbance of the filtrate was measured at 275 nm using a Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian Techtron Pty. Ltd., Australia). Validation of the method was established by treating a standard enzyme solution of known enzymatic activity, in the same way and under the same conditions. One protease activity unit was defined as the

amount of enzyme required to liberate 1 μmole (181 μg) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37 °C. In order to establish the reliability and reproducibility of the method, the procedure was repeated 10 times from a single sample. Statistical treatment of these results showed maximal deviation of 5%.

4.2.6.4 Desorption of enzyme from solid phase

At the end of the fermentation, the pH of the fermentation broth was increased and maintained to 10 by the addition of concentrated NaOH (10N). The agitation was maintained for 5 min and sample was drawn from the fermentor. The sample was centrifuged at 3620 g (5000 rpm) for 10 min at 4°C and the supernatant was kept for protease activity measurement, as described above.



4.3 RESULTS AND DISCUSSION

Fermentations were done with sludge samples from the Quebec and Victoriaville municipal wastewater treatment plants. At each treatment plants, the sludge samples were collected at the same moment, eliminating the potential effect of wastewater composition variability on sludge composition. With the samples from the Québec treatment plant, the effect of alum and polymer on protease production was evaluated, whereas the effect of FeCl_3 on protease production was evaluated with samples from the Victoriaville treatment plant. In previous study (Drouin *et al.*, 2011a), the highest protease activities were obtained in sludge with SS concentration of 35 g/L. However, collection of the sample upstream from the alum/polymer injection points in the Québec treatment plant was a tough task as the wash-waters had to be manually collected on the top of the biofilters with a bucket and rope. As the SS concentration of the wash-waters was very low, an important volume had to be collected only to obtain a small volume of concentrated sludge (20 g/L SS) after settling. Consequently, sludge with lower SS concentration (20 g/L SS) were used for all these experiments and the use of a smaller bench-scale bioreactor (7.5L) was more suitable.

4.3.1 Effect of the addition of alum and polymer to sludge on protease production

Evolution of viable cells, spore counts and protease activity during fermentation in Quebec municipal wastewater sludge with and without added alum and polymer are illustrated in Figure 1. The growth and protease activity profiles were similar in both conditions: the growth phases occurred during the first 18 h, and practically no protease activity was observed during the first hours of growth phase. The increase in the protease activity started after 10-12 h and continued to increase during the stationary phase until 35- 40 h, followed by a slight decrease. However, the number of cells (2.07×10^9 UFC/mL) and spores (2.33×10^8 UFC/mL), and the protease activity (8.18 I.U./mL) measured in sludge with added alum and polymer were higher than the equivalent values recorded in sludge only (1.85×10^9 UFC/mL, 1.03×10^8 UFC/mL and 7.05 I.U./mL, respectively) (Table 2).

Once collected, sludge had to be settled to increase the SS concentration. During the wastewater treatment process, alum and polymer were added to biofilters wash-waters to favor agglomeration

and decantation of the thin/colloidal particles. Once present in decanted sludge, these particles could have constituted easily assimilable nutrients which favored better growth during fermentation, explaining the slightly higher cell counts obtained in sludge with added alum and polymer. Thus, the highest protease activities obtained in the same media are explained by the highest cell count as the $Y_{p/x}$ (I.U./ 10^9 bacterial cell) are very similar in both sludge samples (Table 2).

The addition of polymer, a viscous substance to sludge also has effect in increasing the viscosity of sludge. In previous work (Drouin *et al.*, 2008), increase in viscosity was found to have a great negative impact on growth and protease production. However, sludge was sterilized prior to fermentation. Heat seemed to have denatured/degraded the polymer, as there was no major difference in the initial viscosity (measured after sterilization, prior to inoculation) measured in both sludge samples (Table 2).

4.3.2 Effect of the addition of ferric chloride to sludge on protease production

Evolution of viable cells, spore counts and protease activity during fermentation in Victoriaville municipal wastewater sludge with and without FeCl_3 are illustrated in Figure 2. The growth and protease activity profiles are similar in both conditions (Figure 2). Furthermore, they are also similar to the results obtained in sludge from Québec treatment plant and described above. The number of cells (3.06×10^9 UFC/mL) and spores (8.36×10^7 UFC/mL), and the protease activity (12.12 I.U./mL) measured in sludge with added FeCl_3 are similar than the equivalent values recorded in sludge only (2.98×10^9 UFC/ml, 9.44×10^7 UFC/mL and 11.31 I.U./mL, respectively) (Table 2).

In Victoriaville wastewater treatment plant process, FeCl_3 is added during summer seasons to the mixed liquor exiting from the aeration basin to favour the sedimentation of phosphorus. The similar cell and spore counts and protease activities obtained in both Victoriaville sludge samples demonstrated that the dephosphatation step did not significantly affected the process performance when Victoriaville sludge were employed as fermentation media. Moreover, the protease activities obtained in Victoriaville sludge samples were considerably higher than the same obtained in Québec sludge samples (Table 2).

4.3.3 Reproducibility of the results

Municipal wastewater sludge represents a potential cheap raw material for large scale protease production as they are abundantly available. However any bioprocess implied the use of a consistent production media to avoid variability between fermentation batches. In case of a *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide using wastewater sludge as raw material, the effect of sludge variability was evaluated by collecting sludge samples over a year at different times to cover possible variations (day, night, seasonal, etc.). It was found that the use of a constant sludge solids concentration from one batch to another gave fairly constant process performance (Yezza *et al.*, 2004). In previous work, it was determined that the optimal suspended solids concentration for protease production in secondary wastewater sludge from Québec treatment plant was 35g/L (Drouin *et al.*, 2011a) and over the past years many experiments were conducted in that sludge using the same operational conditions (control experiments). Although the compilation of these results could not be interpreted as reproducibility study in due form that covered all the possible sludge variations, it could give an idea of the consistency of process performances. Similarly, experiment with sludge from Victoriaville was repeated in present study; over months, three different sludge samples were collected at different times at the bottom of the settling tank, concentrated by gravity settling up to 20 g/l SS and used as fermentation medium.

Thus, the data compilation demonstrated the protease activities obtained in the different Quebec sludge batches were fairly constant (-6% to +9%), whereas the same obtained in sludge batches from Victoriaville presented more important variations (-22% to +32%) (Table 3). Many hypotheses were suggested to explain these results. First, the entire treatment plant is sheltered inside a building in case of Québec treatment plant whereas all the treatment devices are located outside at Victoriaville treatment plant, leaving wastewaters more affected by great seasonal temperature variations. As it is well-known that temperature is affecting any bioprocess, the seasonal variations in sludge composition could be more important in case of Victoriaville. Also, Québec treatment plant biofilters are washed/de-clogged at regular intervals after few days of continuous operation. So, the wash-waters composition is not varying in function of the daily repetitive variations (day, night, etc.) in wastewater composition. Moreover, the Quebec plant process includes a primary settling step prior to biofiltration which could have a buffering effect on raw wastewater variability. Barnabé *et al.* (2004) mentioned that primary sludge is more likely to be subjected to important variations in composition than secondary sludge. On the contrary, as

Victoriaville treatment process employs activated sludge as sole treatment, the aeration basins are directly supplied by raw wastewaters. Also, discharges from agro-industries located on the territory causes important charge fluctuations in the entering wastewaters (ref: personal communication) Thus composition of the mixed liquor, and of the sludge by extension could be more subjected to important variations.

4.3.4 Combination of the most suitable conditions for protease production

The conditions found to be more suitable for protease production in secondary sludge from Québec treatment plant in previous works (Table 1) were combined. Thus, one fermentation was conducted using raw, non-pretreated sludge (RAW sludge) with NH_4OH 25% and H_2SO_4 4N as pH-control agents. A second fermentation was also done using mixed sludge containing 75 % of raw sludge and 25 % of thermal-alkaline pre-treated sludge (MIX sludge) with NaOH 4N and H_2SO_4 4N as pH-control agents. For both fermentations, the sludge suspended solids concentration was adjusted to 35g/L and agitation and aeration rates were controlled during fermentation according to the variable oxygen transfer conditions strategy developed in previous work (Drouin *et al.*, 2011d). The process performances obtained are described in Table 4. As expected, the combination of strategies permitted important augmentation of protease activities, in comparison with the same obtained (Table 1) when the operational strategies were applied separately. A maximum of 16.52 I.U./mL was obtained after 42 h of fermentation in RAW sludge, whereas MIX sludge permitted to reach 19.71 I.U./mL after 36 h of fermentation (Table 4).

Sludge is a complex and heterogeneous material containing different types of organic matter and there are lot of possible interactions between enzymes and solid organic matter. It was demonstrated in previous work that a portion of enzymes was lost i.e. stayed adsorbed on the solid fraction when the broth was centrifuged for enzyme recovery from supernatant at the end of fermentation. However, suspension of the solid phase in different pH buffer (4, 6, 8.2, 10) followed by a re-centrifugation showed that maximum amount of protease was desorbed from the solid phase in both RAW and MIX sludge when a pH 10 buffer was used for desorption (Drouin *et al.*, 2011b). Following these results, a strategy was used in present work. After the last sampling i.e at the end of fermentation, the pH of the broth was increased from 7.5 up to 10 and the agitation was maintained for 5 min. Then, a sample was drawn again for protease activity measurement. For both RAW and MIX sludge, the protease activities measured from the samples

recovered at pH 10 were significantly higher (11% and 12%, respectively) than the same values measured in the equivalent samples recovered at 7.5 (Table 4). Moreover, it was also determined in previous work that maximum protease activity obtained at pH 10 and 55 °C (Drouin *et al.*, 2011b). Thus, the protease activity from samples recovered at pH 10 was again measured at pH 10 and 55 °C instead of pH 8.2 and 37 °C. Under these conditions, protease activities reached considerably higher values (66.74 I.U./mL and 80.93 I.U./mL in RAW and MIX sludge, respectively) (Table 4).



4.4 CONCLUSIONS

In municipal wastewater treatment processes, chemicals are frequently added to wastewater and/or to sludge to improve treatment process performances. In present work, it was demonstrated that the addition of chemicals in sludge were having diverse effects on protease production. As the nature and concentration of added chemicals differs from one treatment plant to another, the effect of these chemicals must be evaluated individually. It was also demonstrated that the reproducibility of the results depend on the characteristics of the wastewater and on the type of wastewater treatment process from which the sludge came from. Thus, these results highlighted the crucial importance of reproducibility study that takes into account all factors that could influence sludge composition before considering protease production in sludge from any wastewater treatment plant.

The results obtained in sludge from Québec treatment plant by the combination of the operational strategies developed in previous work permitted to reach considerably higher production yields. However, the downstream steps implied in any enzyme production process (concentration, purification and formulation of the enzymes) must also be evaluated in future works to determine the real potential of wastewater sludge for protease production at considerably lower costs.



ACKNOWLEDGEMENT

Sincere thanks are due to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant A 4984, Canada Research Chair) for their financial support.



REFERENCES

- Barnabé S. (2004). Hydrolyse et oxydation partielle des boues d'épuration comme substrat pour produire *Bacillus thuringiensis* HD-1 (*Hydrolysis and partial oxydation of wastewater sludge as raw material to produce Bacillus thuringiensis* HD-1). PhD Thesis, INRS-ETE, Université du Québec, Canada. 235 pages.
- 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 (3): 423-429.
- Drouin M., Yan S., Tyagi R.D., Valéro J.R. and Surampalli R.Y. (2011a). Production of alkaline proteases using wastewater sludge as a raw material. Submitted to *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*
- Drouin M., Yan S., Lai C.K., Tyagi R.D. and Surampalli R.Y. (2011b). Improvement of municipal wastewater sludge biodegradability to enhance the production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis*. Submitted to *Bioresour. Technol.*
- Drouin M., Yan S. and Tyagi R.D. (2011c). Study on different pH-control strategies to stimulate the protease production by *Bacillus licheniformis* using municipal wastewater sludge as raw material. Submitted to *Bioprocess Biosyst. Eng.*
- Drouin M., Bezawada J. and Tyagi R.D. (2011d). Impact of oxygen transfer conditions on protease production by *Bacillus licheniformis* in submerged fermentation process using municipal wastewater sludge as raw material. Submitted to *Process Biochem.*
- Gupta R., Beg Q.K. and Lorenz P. (2002). Bacterial alkaline proteases : molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 15-32.
- Joo H-S., Kumar C.G., Park G-C., Kim K.T., Paik S.R. and Chang C-S. (2002). Optimisation of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochem.* 38: 155-159.
- Kumar G. and Parrack P. (2003). Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 757-762.

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

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. and Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (3): 597-625.

Shrinivas D., Kumar R. and Naik G.R. (2012). Enhanced production of alkaline thermostable keratinolytic protease from calcium alginate immobilized cells of thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39: 93-98.

Tirado-Montiel M.L., Tyagi R.D., Valéro J.R. and Surampalli R.Y. (2003). Production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of process parameter. *Water Sci. Technol.* 48 (8): 239-246.

Yezza A., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y. and Smith J. (2004). Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 545-552

Table 1. Previous studies on the influence of different parameters on protease production by *Bacillus licheniformis* in Québec (Québec, Canada) municipal wastewater sludge.

Parameter investigated	Most suitable conditions	Maximum protease yields (I.U./mL)	References
Sludge suspended solids concentration	35 g/L	11.22	Drouin <i>et al.</i> (2011a)
Sludge pre-treatment	75% raw sludge/25% thermal-alkaline pre-treated sludge (MIX sludge)	18.41	Drouin <i>et al.</i> (2008) Drouin <i>et al.</i> (2011b)
pH control	NH ₄ OH 25%/H ₂ SO ₄ 4N (raw sludge)	15.43	Drouin <i>et al.</i> (2011c)
	NaOH 4N/H ₂ SO ₄ 4N (MIX sludge)	16.74	
DO control	Variable oxygen transfer conditions	12.71	Drouin <i>et al.</i> (2011d)

Table 2. Process performance of *Bacillus licheniformis* in different sludge tested.

Parameter	Victoriaville		Québec	
	<i>Mixed liquor</i>	<i>Mixed liquor with ferric chloride</i>	<i>Biofilters wash-waters</i>	<i>Biofilters wash waters with alum/polymers</i>
Total count _{max} (10 ⁹ CFU/mL)	2.98	3.07	1.85	2.07
Spore count _{max} (10 ⁸ CFU/mL)	0.94	0.84	1.03	2.33
Protease activity _{max} (I.U./mL)	11.31	12.11	7.05	8.18
Y _{p/x} (I.U. _{max} /10 ⁹ bacterial cell)	3.79	3.96	3.81	3.95
Initial viscosity (mPaS)*	32.6	33.1	35.3	43.2

*measured on sterilized sludge prior to inoculation

Table 3. Protease activities obtained during fermentation of different sludge batches from Québec and Victoriaville under the same operational conditions.

Sludge	Essay	Protease activity (I.U./mL) (% variation)	Reference
Québec (35 g/L SS)	1	11.22 (+9%)	Drouin <i>et al.</i> (2011a)
	2	10.40 (-)	Drouin <i>et al.</i> (2008)
	3	10.31 (-1%)	Drouin <i>et al.</i> (2011b)
	4	10.13 (-3%)	Drouin <i>et al.</i> (2011c)
	5	9.84 (-6%)	Drouin <i>et al.</i> (2011d)
Average value		10.38	-
Victoriaville (20g/L SS)	1	12.12 (+32%)	present work
	2	7.14 (-22%)	present work
	3	8.36 (-9%)	present work
Average value		9.20	-

Table 4. Process performance of *Bacillus licheniformis* in sludge from Québec with the combination of conditions found the most suitable for protease production in previous work.

Parameter	<i>RAW</i> <i>sludge</i>	<i>MIX</i> <i>sludge</i>
Total count _{max} (10 ⁹ CFU/mL)	3.18	4.36
Spore count _{max} (10 ⁸ CFU/mL)	2.49	2.91
Protease activity _{max} (I.U./mL) (sample recovered at pH 7.5)	16.52	19.71
Y _{p/x} (I.U. _{max} /10 ⁹ bacterial cell)	5.19	4.52
Protease activity _{max} (I.U./mL) (sample recovered at pH 10)	18.36	22.08
Protease activity _{pH 10, 55°C} (I.U./mL) (sample recovered at pH 10)*	66.74	80.93

*Protease activity essay performed at pH 10 and 55°C

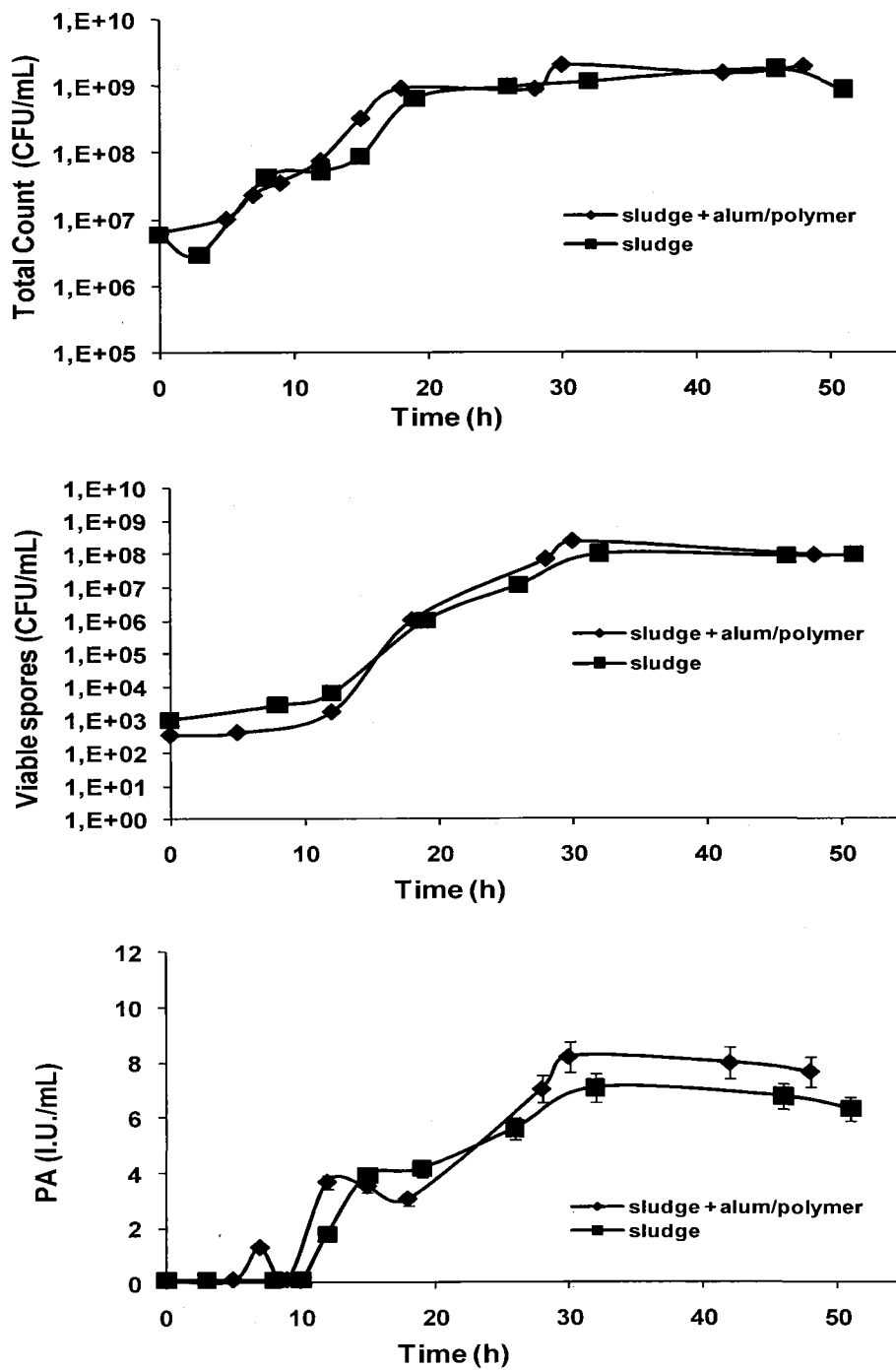


Figure 1: Evolution of total viable cell count (a), viable spore count (b) and protease activity (c) during *Bacillus licheniformis* growth in Québec wastewater sludge with and without added alum and polymer.

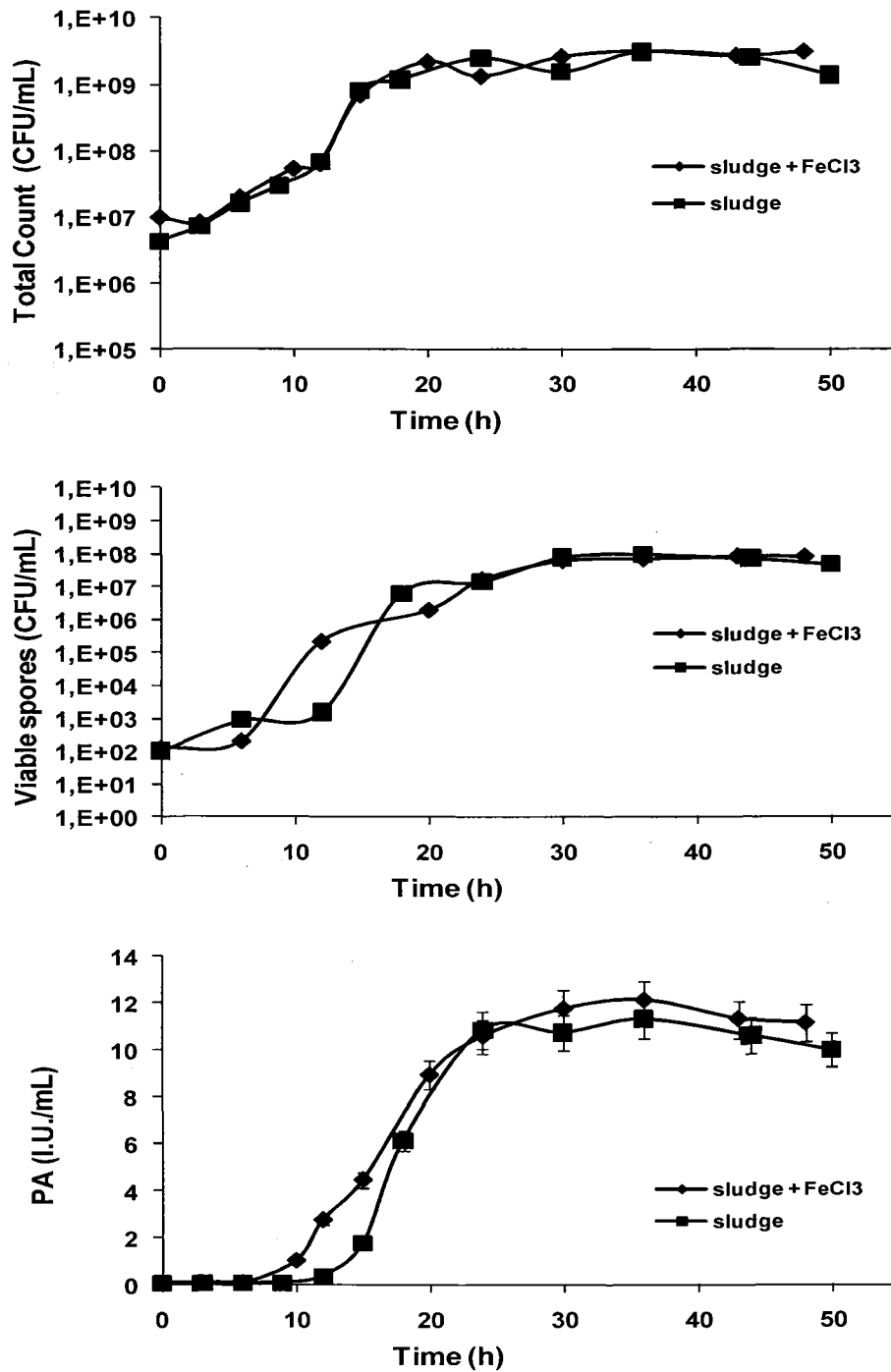


Figure 2: Evolution of total viable cell count (a), viable spore count (b) and protease activity (c) during *Bacillus licheniformis* growth in Victoriaville wastewater sludge with and without added ferric chloride.

**CONCLUSIONS ET
RECOMMANDATIONS**



CONCLUSIONS

Face à l'augmentation de la quantité de boues d'épuration à gérer et à l'accroissement des coûts associés à leur élimination et/ou disposition, la mise au point de nouvelles méthodes innovatrices et économiques de revalorisation de ces rejets est souhaitable. Dans cette optique, les travaux actuels ont consisté à utiliser les boues d'épuration municipales comme milieu de culture pour la production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis*. Les protéases produites à partir d'un substrat bon marché comme les boues d'épuration seraient plus compétitives sur les marchés. De plus, les gains financiers associés à la commercialisation de protéases ainsi produites permettraient de diminuer les coûts globaux associés à la gestion des boues d'épuration. Cependant, un bioprocédé efficace implique d'avoir des rendements en produits élevés. Les présents travaux ont donc consisté à mettre au point des stratégies et des méthodes de production visant à augmenter les activités protéolytiques obtenues dans les boues.

Ainsi, un pré-traitement d'hydrolyse thermo-alcaline visant à augmenter la biodégradabilité des boues a d'abord été expérimenté. Les conclusions suivantes peuvent être tirées de ces travaux :

- L'emploi de boues hydrolysées n'est pas souhaitable pour la production de protéases. En effet, la présence de concentrations plus élevées de substrats facilement assimilables dans les boues hydrolysées a eu un effet répresser sur la production de protéases, résultant en des activités protéolytiques plus faibles que dans les boues non-hydrolysées.
- L'emploi de mélange de boues hydrolysées et non-hydrolysées constitue une stratégie intéressante pour la production de protéases. Ainsi, grâce à des concentrations en cellules et des activités protéolytiques/cellules élevées, un milieu de culture composé à 75% de boues non-hydrolysées et à 25% de boues hydrolysées a permis une augmentation de 78% de l'activité protéolytique par rapport au milieu de culture composé de boues non hydrolysées uniquement.
- L'augmentation du pH du bouillon de fermentation de 7,5 à 10 à la fin de la fermentation a permis une meilleure récupération des enzymes à partir du surnageant, et cela autant dans les boues non-hydrolysées que dans les boues mélangées (75% non-hydrolysées / 25% hydrolysées).

- Les protéases produites par *Bacillus licheniformis* dans les boues d'épuration sont actives sur une vaste gamme de pH et de température et ont généré un maximum d'activité protéolytique à pH 10 et à T 55°C.
- La fermentation des boues pour la production de protéases permet une diminution importante du volume de boues résiduelles. De plus, les caractéristiques des boues résiduelles issues du procédé permettent de les re-diriger vers les filières de valorisation conventionnelles : les pathogènes présents dans les boues sont éliminés lors de l'étape de stérilisation. Également, le procédé de fermentation agit telle une digestion permettant de stabiliser les odeurs associées aux boues d'épuration fraîches.

En second lieu, des travaux ont été effectués pour comparer des conditions de pH contrôlé et non-contrôlé, et pour évaluer l'effet de l'enrichissement du milieu de fermentation en nutriments, par l'emploi de différents agents de contrôle du pH. Les résultats ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- Le maintien d'un pH constant pendant la fermentation est souhaitable pour la production de protéases dans les boues d'épuration : les activités protéolytiques obtenues en conditions de pH non contrôlé ont été considérablement moins élevées que les activités protéolytiques obtenues en conditions de pH contrôlé.
- Dans les boues non-hydrolysées, l'emploi de NH_4OH , en remplacement de NaOH pour le contrôle du pH est une avenue intéressante pour stimuler la production de protéases, ayant permis une augmentation de 52% de l'activité protéolytique. La combinaison $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ est donc la plus appropriée pour la production de protéases dans les boues non-hydrolysées.
- Cependant, dans un milieu de culture composé à 75% de boues brutes et à 25% de boues hydrolysées, la combinaison $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ a permis d'atteindre des activités protéolytiques 76% plus élevées que la combinaison $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$.

Des travaux ont été réalisés et ont permis de vérifier l'effet de différentes conditions de transfert d'oxygène sur la production de protéases dans les boues et les conclusions de ces travaux furent les suivantes :

- Le maintien de conditions de transfert d'oxygène élevées pendant la phase de production a permis de stimuler la production de protéases. Cependant, de faibles concentrations de cellules ont été obtenues lorsque de telles conditions ont été maintenues pendant la phase de croissance, tout en provoquant la formation excessive de mousse.
- À l'inverse, le maintien de conditions de transfert d'oxygène moins élevées pendant la phase de croissance a permis d'obtenir des concentrations de cellules élevées.
- Le maintien de faibles concentrations en oxygène dissous (< 10%) a eu un effet inhibiteur important sur la production de protéases.
- Suivant ces résultats, une stratégie impliquant des conditions de transfert d'oxygène variables pendant la fermentation a été élaborée et a permis d'obtenir des activités protéolytiques considérablement plus élevées.

Également, des boues issues de deux différents procédés de traitement des eaux différents ont été utilisées pour la production de protéases et les résultats ont permis de formuler les conclusions suivantes :

- Dans le procédé de traitement des eaux usées de la ville de Québec, l'ajout d'alun et de polymère aux eaux de lavage des biofiltres afin de favoriser la floculation et la décantation des particules semble avoir un effet bénéfique sur la production de protéases : les activités protéolytiques obtenues dans les boues contenant de l'alun et des polymères ont été 16% supérieures aux activités protéolytiques obtenues dans les boues n'en contenant pas.
- Dans le procédé de traitement des eaux usées de la ville de Victoriaville, l'ajout de FeCl_3 à la liqueur mixte afin de favoriser l'abattement du phosphore ne semble pas avoir d'effet sur la production de protéases : les activités protéolytiques obtenues dans les boues additionnées de FeCl_3 ont été similaires à celles obtenues dans les boues non-additionnées de FeCl_3 .
- Les activités protéolytiques obtenues dans les boues de la ville de Québec ont été plutôt constantes d'un échantillon de boue à l'autre (-6% à +9%), alors que les activités protéolytiques obtenues dans les boues de la ville de Victoriaville ont présenté de plus importantes variations (-22% à +32%).

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux mettent en évidence le potentiel des boues pour la production de protéases. Cependant, de nombreux travaux doivent encore être réalisés et voici quelques recommandations concernant ces futurs travaux

RECOMMANDATIONS

L'accomplissement des objectifs fixés au départ a permis d'identifier différentes avenues permettant de stimuler la production de protéases dans les boues d'épuration. Cependant, les travaux actuels devraient être suivis de travaux visant à optimiser certains paramètres étudiés dans la présente étude. Par exemple, les travaux actuels ont permis de déterminer qu'un milieu de culture composé à 75% de boues non-hydrolysées et à 25% de boues hydrolysées permet une augmentation considérable de l'activité protéolytique. Des travaux supplémentaires consistant à évaluer quelques autres ratios de mélange de boues non-hydrolysées/hydrolysées (60/40, 70/30, 80/20) doivent être effectués afin de déterminer le ratio optimal. Les paramètres (pH, température, durée) du pré-traitement d'hydrolyse thermo-alcaline pourraient également faire l'objet de travaux d'optimisation.

Également, les conclusions tirées des travaux sur l'emploi de mélanges de boues hydrolysées et non-hydrolysées suggèrent que la fermentation en mode fed-batch pourrait constituer une autre stratégie permettant d'augmenter les rendements en production de protéases. Ainsi, par l'emploi d'un tel procédé, des ajouts de boues non-hydrolysées ou hydrolysées à différents moments (durant les phases de croissance et/ou phase de production) pourraient permettre de stimuler la croissance cellulaire et/ou la production de protéases. Les travaux consisteraient à déterminer les paramètres adéquats (fréquence et nombre d'ajouts pendant la fermentation, volume des ajouts et nature des boues ajoutées).

Ensuite, les présents travaux ont permis d'identifier les conditions de transfert d'oxygène à employer pendant le procédé de production. Cependant, des travaux supplémentaires devraient avoir comme objectif d'optimiser les combinaisons de taux d'aération / agitation à employer.

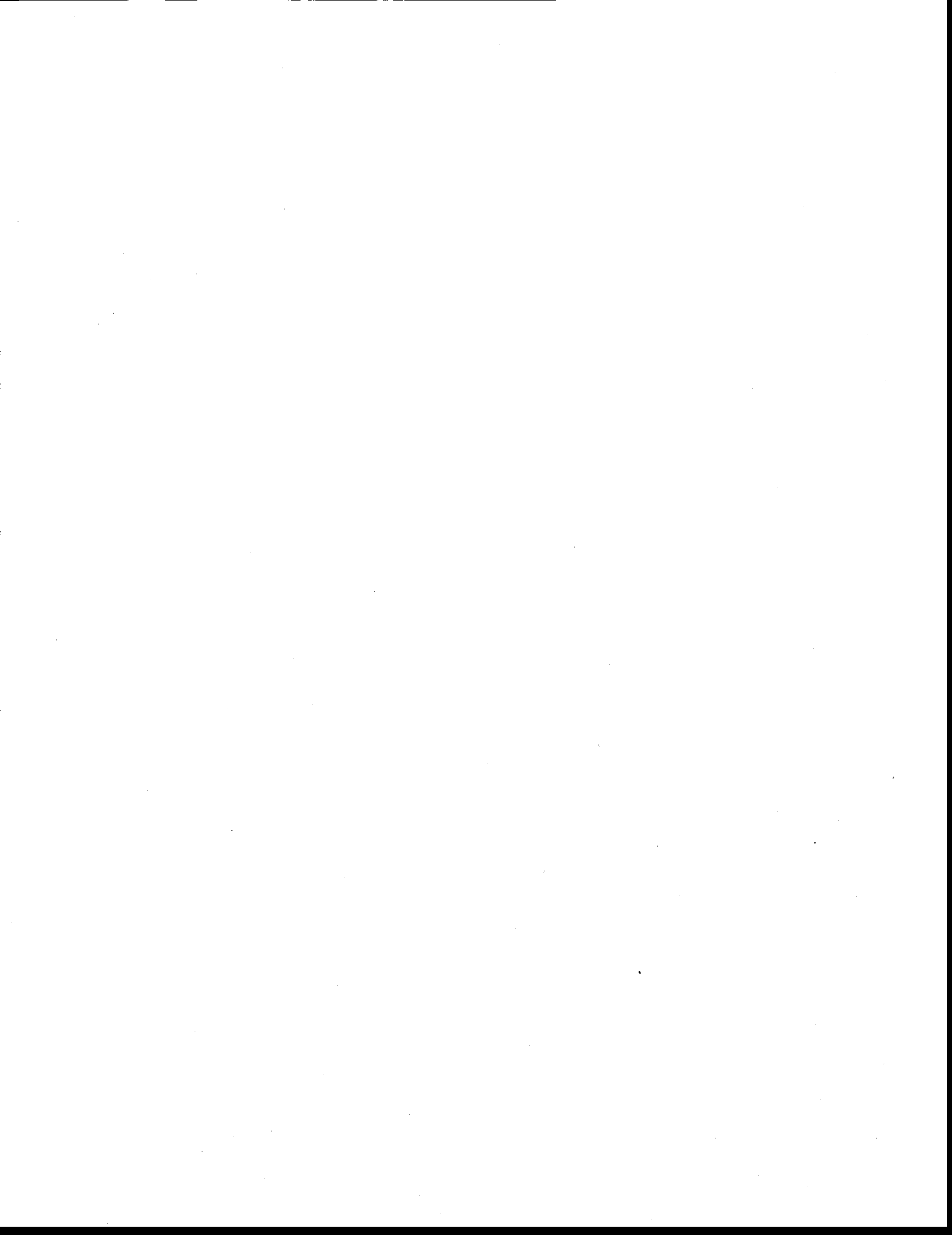
Et en dernier lieu, les boues d'épuration, tel que mentionné précédemment, sont abondamment disponibles et pourraient donc être considérées comme une matière première potentielle mondialement disponible pour l'obtention de nombreux produits à valeur ajoutée. Cependant, dans le cas spécifique des protéases, les résultats ont démontré que les rendements et la reproductibilité du procédé varient selon la provenance des boues et le type de procédé de traitement des eaux employé. Ainsi, la mise en place d'un procédé de production de protéases à partir de boues d'épuration d'une station de traitement des eaux donnée devrait être

impérativement précédée d'une étude exhaustive concernant la reproductibilité du procédé. Une telle étude implique la mise en place d'un plan d'échantillonnage des boues tenant compte de tous les facteurs journaliers (ex : jour, nuit, périodes de pointe, rejets ponctuels d'industries situées sur le territoire), climatiques (ex : épisode de fortes pluies), saisonniers (ex : été, hiver, fonte des neiges) pouvant affecter la composition et les caractéristiques des boues à l'étude, et la réalisation d'essais de production de protéases à partir des différents échantillons recueillis. De plus, la caractérisation des échantillons de boues recueillis (ex : rapports solides volatils totaux/solides totaux, matières volatiles en suspension/matières en suspension, concentrations en azote total, ammonium, phosphore total, carbone total, carbone organique total et dissous, contenu en protéines dissoutes, teneurs en divers éléments inorganiques et métaux, etc.) pourrait permettre d'évaluer l'impact de chacun des paramètres ainsi analysés sur la production de protéases.

En dernier lieu, des travaux concernant les étapes d'extraction et de purification des protéases produites devront aussi être entrepris car l'optimisation de ces étapes est cruciale pour la mise au point d'un procédé efficace et économique.

ANNEXES

(Données brutes)



ANNEXE 1

EFFECT OF SLUDGE PRETREATMENTS ON PROTEASE PRODUCTION

(CHAPITRE 2, PARTIE 1)



Table 1: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) and viscosity during *Bacillus licheniformis* growth in RAWsludge.

Time (h)	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (I.U./ml)	viscosity (mPaS)
0	2,17E+07	7,43E+03	0,03	47,4
3	5,67E+07	7,00E+03	0,03	43,4
6	2,62E+08	2,41E+04	0,03	43,4
9	5,23E+08	1,32E+04	0,03	38,3
12	8,27E+08	1,03E+04	2,93	35,0
15	9,10E+08	9,13E+04	4,54	38,3
18	9,93E+08	3,33E+05	6,11	31,5
21	3,33E+09	5,50E+06	7,47	31,5
24	3,23E+09	3,20E+07	9,54	28,3
30	2,97E+09	2,33E+07	10,15	25,1
36	2,84E+09	7,47E+07	10,40	24,9
42	3,07E+09	9,57E+07	10,34	24,8
48	3,13E+09	8,20E+07	10,04	24,5

Table 2: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) and viscosity during *Bacillus licheniformis* growth in TAH sludge.

Time (h)	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (I.U./ml)	viscosity (mPaS)
0	1,53E+07	8,90E+03	0,03	85,7
3	7,80E+07	8,07E+03	0,03	87,2
6	1,10E+08	3,73E+04	0,03	90,8
9	2,45E+08	2,49E+04	0,03	92,1
12	3,07E+08	5,40E+04	0,22	79,7
15	6,10E+08	9,40E+04	2,35	76,5
18	9,40E+08	4,13E+05	5,24	71,3
21	1,00E+09	7,37E+06	4,97	68,0
24	9,30E+08	5,20E+07	6,69	65,9
30	1,06E+09	7,63E+07	7,13	50,8
36	1,25E+09	5,47E+07	8,74	49,8
42	1,27E+09	8,17E+07	9,84	48,3
48	1,13E+09	8,20E+07	9,34	48,0

Table 3: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) and viscosity during *Bacillus licheniformis* growth in MIX sludge.

Time (h)	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (I.U./ml)	viscosity (mPaS)
0	3,50E+07	8,23E+03	0,03	52,7
3	7,97E+07	8,23E+03	0,03	45,9
6	3,40E+08	3,50E+04	0,03	46,5
9	6,45E+08	2,32E+04	0,25	43,8
12	8,77E+08	5,33E+04	0,32	41,0
15	2,01E+09	8,20E+04	3,68	37,2
18	2,09E+09	2,44E+05	5,73	35,6
21	2,10E+09	6,53E+06	8,34	32,7
24	2,19E+09	4,23E+07	10,22	30,6
30	3,17E+09	8,43E+07	11,94	27,9
36	3,20E+09	7,33E+07	13,03	27,0
42	2,51E+09	1,02E+08	12,13	26,7
48	3,02E+09	7,23E+07	12,55	25,8

Table 4: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) and viscosity during *Bacillus licheniformis* growth in ISH sludge.

Time (h)	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (I.U./ml)	viscosity (mPaS)
0	1,67E+07	8,77E+03	0,03	20,4
3	7,90E+07	8,20E+03	0,03	18,6
6	3,43E+08	4,53E+04	0,03	18,0
9	8,47E+08	4,27E+04	0,03	17,6
12	1,10E+09	5,40E+04	0,21	16,7
15	2,11E+09	7,40E+04	2,56	19,7
18	2,05E+09	2,41E+05	4,68	28,4
21	1,97E+09	6,43E+06	5,74	26,6
24	2,21E+09	5,20E+07	5,42	16,5
30	2,11E+09	4,93E+07	8,91	13,7
36	2,14E+09	4,47E+07	10,58	12,5
42	1,34E+09	9,40E+07	11,52	11,7
48	2,23E+09	7,23E+07	10,81	11,9

ANNEXE 2

EFFECT OF SLUDGE PRETREATMENTS ON PROTEASE PRODUCTION

(CHAPITRE 2, PARTIE 2)

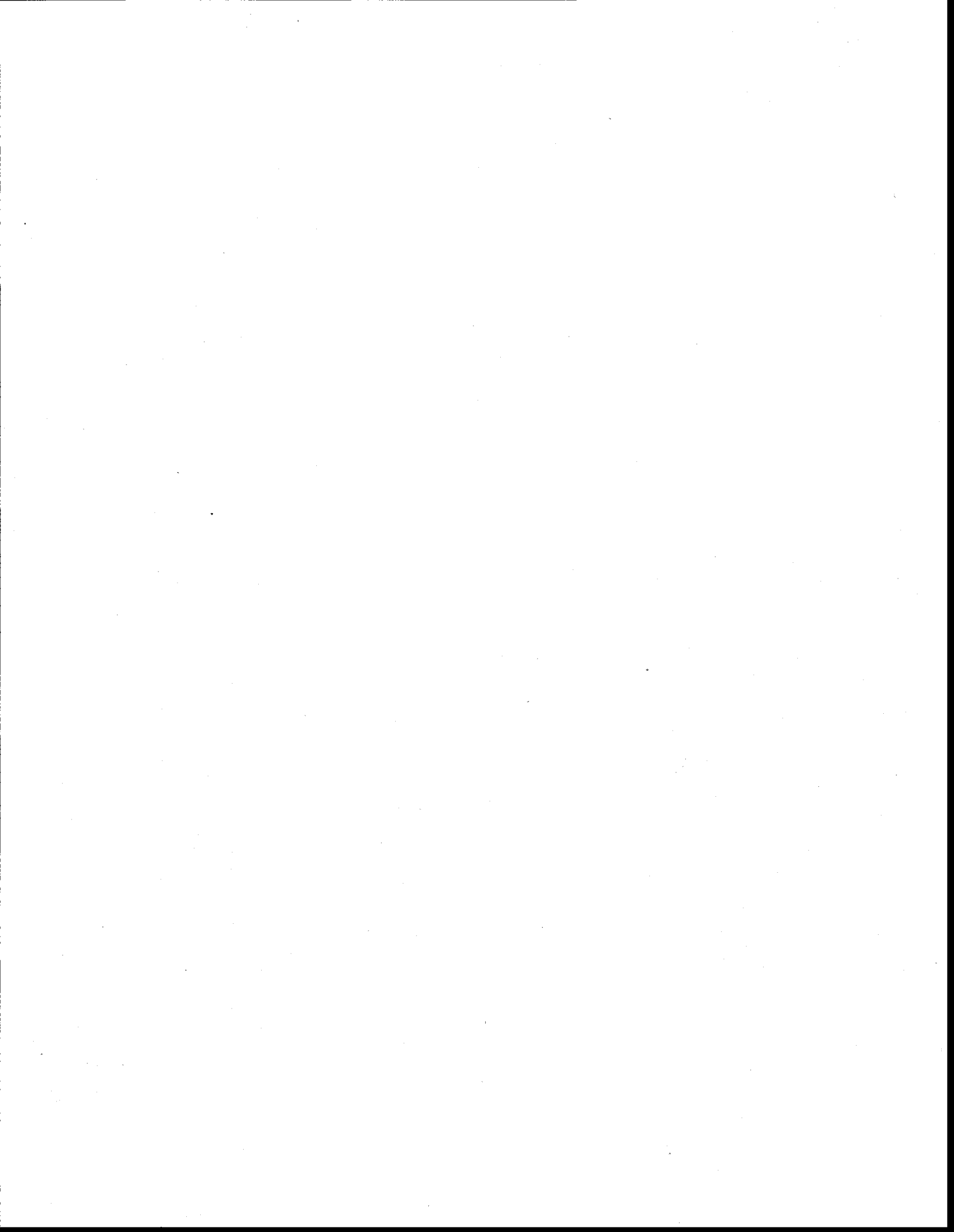


Table 1: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA), $K_{L,a}$, OTR and OUR during *Bacillus licheniformis* growth in RAW sludge.

Time (h)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (I.U./mL)	Time (h)	$K_{L,a}$ (1/h)	OTR (mmol O ₂ /L/h)	OUR (mmol O ₂ /L/h)
0	3,90E+06	1,10E+02	0,67	3	11,1	0,20	0,21
3	1,82E+07			6	62,5	1,52	0,74
6	2,03E+07	2,30E+02	0,12	9	42,5	1,70	1,46
9	1,77E+07		0,12	13	95,7	2,90	1,33
12	1,96E+08	2,57E+02	2,50	15	85,9	2,47	1,14
15		2,97E+04	1,30	18	74,3	1,08	0,46
18	2,44E+09		2,58	21	46,8	0,52	0,33
21	2,48E+09	3,37E+05	4,16	24	51,3	0,40	0,22
24	1,45E+09		7,48	28	43,1	0,51	0,32
30		6,87E+07	10,31	43	15,2	0,14	0,17
36	1,65E+09		10,14				
42		1,10E+08	9,84				
48	1,38E+09		8,85				

Table 2: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA), $K_{L,a}$, OTR and OUR during *Bacillus licheniformis* growth in TAH sludge

Time (h)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (I.U./mL)	Time (h)	$K_{L,a}$ (1/h)	OTR (mmol O ₂ /L/h)	OUR (mmol O ₂ /L/h)
0	1,30E+05	9,00E+01	0,16	3	55,2	1,06	0,11
3	3,63E+07		1,23	6	54,8	1,48	0,26
6	6,17E+07	1,60E+02	0,12	9	60,84	2,87	0,71
9	2,60E+08		0,12	13	68,4	1,78	1,20
12	1,81E+08	1,77E+02	0,14	15	83,9	2,27	0,91
15		2,00E+03	0,12	18	188,3	4,03	1,98
18	2,50E+09	4,00E+05	4,02	21	101,2	2,76	1,35
21	2,25E+09	1,27E+06	4,55	24	60,3	1,31	0,66
24	6,23E+09		5,06	28	41,7	0,87	0,72
30		2,93E+08	5,29	43	27,0	0,32	0,29
36	6,53E+09		5,22	48	58,2	0,62	0,24
42			5,23				
48	4,53E+09	1,17E+08	5,43				

Table 3: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA), $K_{L,a}$, OTR and OUR during *Bacillus licheniformis* growth in MIX 1 sludge

Time (h)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (I.U./mL)	Time (h)	$K_{L,a}$ (1/h)	OTR (mmol O ₂ /L/h)	OUR (mmol O ₂ /L/h)
0	1,24E+05	1,00E+02	0,16	3	13,5	0,41	0,13
3	3,56E+06		0,16	6	44,6	1,62	0,56
6	2,99E+07	1,45E+02	0,16	9	52,5	1,53	0,23
9	4,60E+07	1,79E+02	0,24	13	74,1	2,82	1,30
12	1,21E+08	1,77E+02	0,74	15	106,2	2,77	1,54
15	7,50E+08	1,77E+03	1,34	18	103,1	2,51	1,34
18	2,50E+09	7,00E+04	6,01	21	36,2	1,34	0,34
21	4,43E+09	9,23E+05	8,14	24	65,6	0,60	0,56
24	6,13E+09		11,40	28	22,3	0,71	0,32
30	5,93E+09	3,53E+08	15,64	43	21,6	0,21	0,30
36	5,87E+09		18,41	48	23,2	0,31	0,22
42	5,53E+09	4,63E+08	17,36				
48	4,53E+09	2,23E+08	14,43				

Table 4: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA), $K_{L,a}$, OTR and OUR during *Bacillus licheniformis* growth in MIX 2 sludge

Time (h)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (I.U./mL)	Time (h)	$K_{L,a}$ (1/h)	OTR (mmol O ₂ /L/h)	OUR (mmol O ₂ /L/h)
0	9,00E+04	9,00E+01	0,16	3	60,1	0,99	0,19
3	4,63E+07		0,12	6	48,3	1,25	0,17
6	9,37E+07	1,12E+02	0,12	9	47,5	2,22	0,45
9	8,77E+07		0,12	13	71,3	2,21	0,87
12	1,46E+08	1,55E+02	0,14	15	82,5	3,01	0,91
15	6,57E+08	2,00E+03	1,34	18	111,2	3,02	1,51
18	1,86E+09	6,23E+05	3,04	21	134,1	3,34	1,35
21	3,43E+09		4,37	24	54,3	2,31	0,76
24	3,33E+09	7,37E+06	5,78	28	48,9	0,87	0,72
30	3,42E+09	2,46E+08	7,02	43	31,8	0,49	0,44
36	2,76E+09	2,61E+08	8,72	48	46,3	0,77	0,24
42	2,65E+09	2,54E+08	8,87				
48	2,96E+09	1,14E+08	7,79				

Table 5: Evolution of viscosity and soluble chemical oxygen demand (SCOD) during *Bacillus licheniformis* growth in different sludge

Time (h)	Viscosity (mPaS)		Time (h)	SCOD (mg O ₂ /L)		
	RAW	TAH		RAW	TAH	MIX 1
0	41,85	24,14	0	17383	35917	26606
6	38,10	24,15	3	15933	35861	26911
13	40,80	23,71	6	18000	34850	25444
18	36,45	23,55	9	14406	32872	25843
24	27,85	21,75	12	12156	34633	26050
35	20,55	12,22	15	12172	29700	26789
48	15,90	12,15	18	13983	24822	21711
			21	13900		18811
			24	13222	24683	15711
			30	13344	22622	15106
			36	13667	23672	15756
			42	12450	21567	16906
			48	13611	20478	17633

Table 6: Effect of pH and temperature on the protease produced in RAW and TAH sludges.

Conditions		Protease activity (I.U/mL)	
Temp. (°C)	pH	RAW	TAH
30	6	5,68	1,49
30	7	0,83	2,51
30	8	4,62	3,29
30	9	5,31	2,49
30	10	7,44	3,94
30	11	3,94	2,66
30	12	0,91	2,42
45	6	4,50	2,44
45	7	12,62	5,74
45	8	14,57	6,97
45	9	15,39	6,36
45	10	17,42	11,68
45	11	8,79	5,28
45	12	0,28	0,32
55	6	7,15	4,72
55	7	16,48	10,37
55	8	16,59	14,44
55	9	24,12	14,90
55	10	34,80	20,94
55	11	15,65	11,37
55	12	0,45	0,16
65	6	7,21	5,98
65	7	22,04	16,18
65	8	22,41	15,98
65	9	29,49	18,70
65	10	29,70	19,64
65	11	0,68	7,27
65	12	0,46	0,15

ANNEXE 3

EFFECT OF DIFFERENT PH CONTROL STRATEGIES ON PROTEASE PRODUCTION (CHAPITRE 3, PARTIE 1)



Table 1: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) during *Bacillus licheniformis* growth in RAW sludge in uncontrolled pH conditions

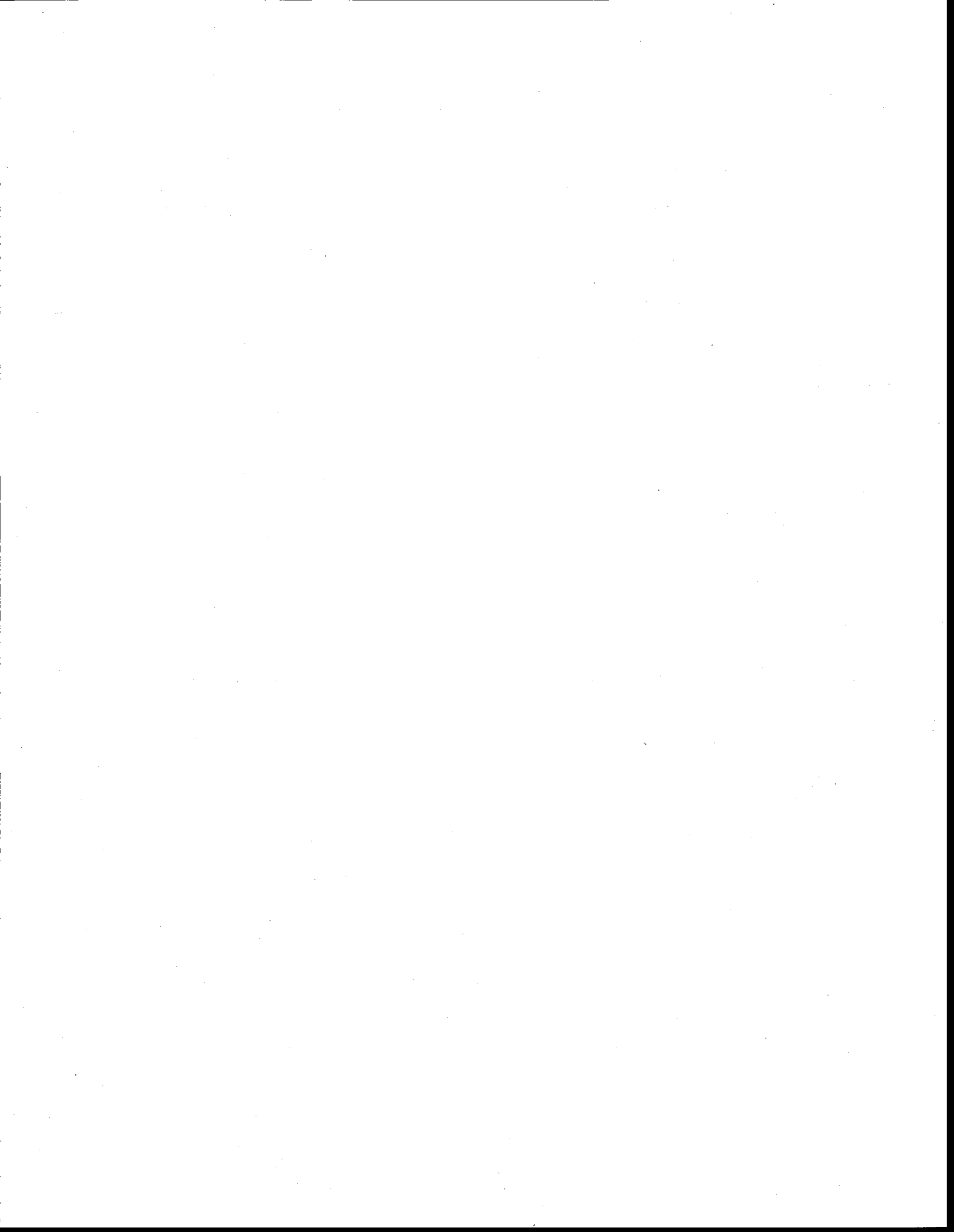
Time (h)	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (I.U./ml)
0	1,71E+07	1,60E+02	0,03
4	2,10E+07		0,03
8	1,50E+08	2,94E+03	0,03
11		5,00E+02	0,35
15	3,97E+08		0,78
18	6,43E+08	6,00E+04	0,90
21	6,33E+08		1,03
24	3,33E+08	3,50E+06	2,03
35	1,24E+08	3,97E+07	3,16
47	3,67E+08	1,45E+07	2,88
51	2,40E+08		1,83

Table 2: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) during *Bacillus licheniformis* growth in RAW sludge with different pH control agent

pH control agent	Time (h)	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (I.U./ml)
H ₂ SO ₄ /NaOH	0	7,43E+06	2,25E+02	0,03
	4	1,35E+07		0,05
	8	1,74E+08	4,10E+02	0,05
	11		1,00E+02	1,63
	15			3,07
	18	1,67E+09	7,30E+05	2,87
	21	9,63E+08		5,83
	24	1,97E+09	2,68E+07	6,61
	35	1,66E+09	1,01E+08	10,13
	47	1,37E+09	6,17E+07	9,18
51	1,45E+09		7,12	
H ₂ SO ₄ /NH ₄ OH	0	1,06E+07	1,75E+02	0,03
	4	6,23E+06		0,05
	8	7,97E+07	3,53E+02	0,05
	11	1,57E+08	2,43E+03	0,79
	15			1,52
	18		3,30E+05	1,69
	21	2,20E+09		3,98
	24	8,67E+08	1,16E+07	6,53
	35	3,27E+09	2,36E+08	11,03
	47	1,23E+09	8,87E+07	15,43
51	1,65E+09		10,63	
CH ₃ COOH/NH ₄ OH	0	2,50E+07	2,51E+03	0,03
	5	2,75E+07		0,05
	8	2,33E+08	3,10E+03	0,05
	13	1,33E+08	3,43E+04	1,06
	17	6,67E+08	2,85E+05	2,32
	20	2,70E+09	2,75E+06	2,66
	30	3,63E+09	6,30E+07	4,21
	38	3,93E+09	4,10E+07	4,41
	51	1,49E+09		5,72

Table 3: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) during *Bacillus licheniformis* growth in MIX sludge with different pH control agent

pH control agent	Time (h)	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (I.U./ml)
H ₂ SO ₄ /NaOH	0	9,80E+06	1,25E+04	0,09
	3	8,13E+06		0,09
	6	1,93E+07	2,01E+04	0,09
	10	5,33E+06		1,06
	13	6,27E+07	2,19E+05	2,78
	17	2,77E+08		4,48
	21	2,17E+09	2,00E+07	10,95
	30	1,33E+09	1,69E+08	12,58
	33	3,53E+09		16,74
	46	2,27E+09	9,50E+07	12,71
	51	8,57E+08	9,10E+07	10,31
H ₂ SO ₄ /NH ₄ OH	0	4,27E+06	1,02E+04	0,09
	3	2,17E+06		0,09
	6	1,60E+07	8,80E+03	0,09
	10	1,03E+07		0,09
	13	2,67E+07	1,54E+05	0,38
	17	8,00E+07		1,77
	21	1,17E+09	1,27E+07	6,10
	30	2,03E+09	9,40E+07	9,20
	33	1,50E+09		8,76
	46	9,03E+08	1,27E+08	9,47
	51	8,43E+08	2,80E+07	6,61



ANNEXE 4

EFFECT OF OXYGEN TRANSFER CONDITIONS ON PROTEASE PRODUCTION (CHAPITRE 3, PARTIE 2)



Table 1: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA), $K_{L,a}$, OTR and OUR during *Bacillus licheniformis* growth in HOT experiment

Time (h)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (I.U./mL)	Time (h)	$K_{L,a}$ (1/h)	OTR (mmol O ₂ /L/h)	OUR (mmol O ₂ /L/h)
0	2,16E+07	2,46E+02	0,05	3	118,2	0,55	0,48
5	6,53E+07		0,05	5	60,2	0,90	2,04
8	3,07E+08	3,03E+02	0,51	13	34,8	2,18	2,09
13		4,67E+03	2,91	17	108,4	1,82	1,49
17	6,07E+08	3,97E+06	7,08	20	73,7	0,89	1,25
20	8,07E+08	3,97E+07	7,75	30	44,5	0,26	0,40
30	7,27E+08	1,23E+08	7,67	38	54,8	0,26	0,28
38	7,17E+08	1,41E+08	7,04	51	29,5	0,24	0,29
51	8,97E+08	1,37E+08	6,04				

Table 2: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA), $K_{L,a}$, OTR and OUR during *Bacillus licheniformis* growth in MOT experiment

Time (h)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (I.U./mL)	Time (h)	$K_{L,a}$ (1/h)	OTR (mmol O ₂ /L/h)	OUR (mmol O ₂ /L/h)
0	1,50E+07	2,57E+02	0,16	3	91,2	0,79	0,47
6	9,50E+07		0,40	6	46,3	0,93	1,52
8	1,80E+08	2,96E+02	0,05	20	58,0	1,12	0,94
14		3,51E+02	0,38	26	26,4	0,63	0,62
16	1,73E+09	4,33E+05	0,07	32	32,5	0,53	0,51
20	2,01E+09	1,34E+06	1,00	46	59,0	0,19	0,19
26	2,36E+09	5,86E+07	3,40	51	55,8	0,26	0,27
32	1,97E+09	8,12E+07	4,17				
46	1,49E+09		3,48				
51	2,07E+09	1,51E+08	3,83				

Table 3: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA), K_{La} , OTR and OUR during *Bacillus licheniformis* growth in LOT experiment

Time (h)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (I.U./mL)	Time (h)	K_{La} (1/h)	OTR (mmol O ₂ /L/h)	OUR (mmol O ₂ /L/h)
0	8,93E+06	8,70E+02	0,16	3	24,6	0,37	0,47
3	9,53E+06	9,00E+02	0,05				
14	6,67E+07	5,60E+04	0,07				
16	2,15E+08	5,33E+04	0,38				
19	4,90E+08	1,47E+05	0,07				
25	1,12E+08	4,20E+05	0,92				
37	4,37E+08	9,77E+05	0,82				
45	4,62E+08	7,77E+05	0,95				

Table 4: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA), K_{La} , OTR and OUR during *Bacillus licheniformis* growth in MOT/HOT experiment

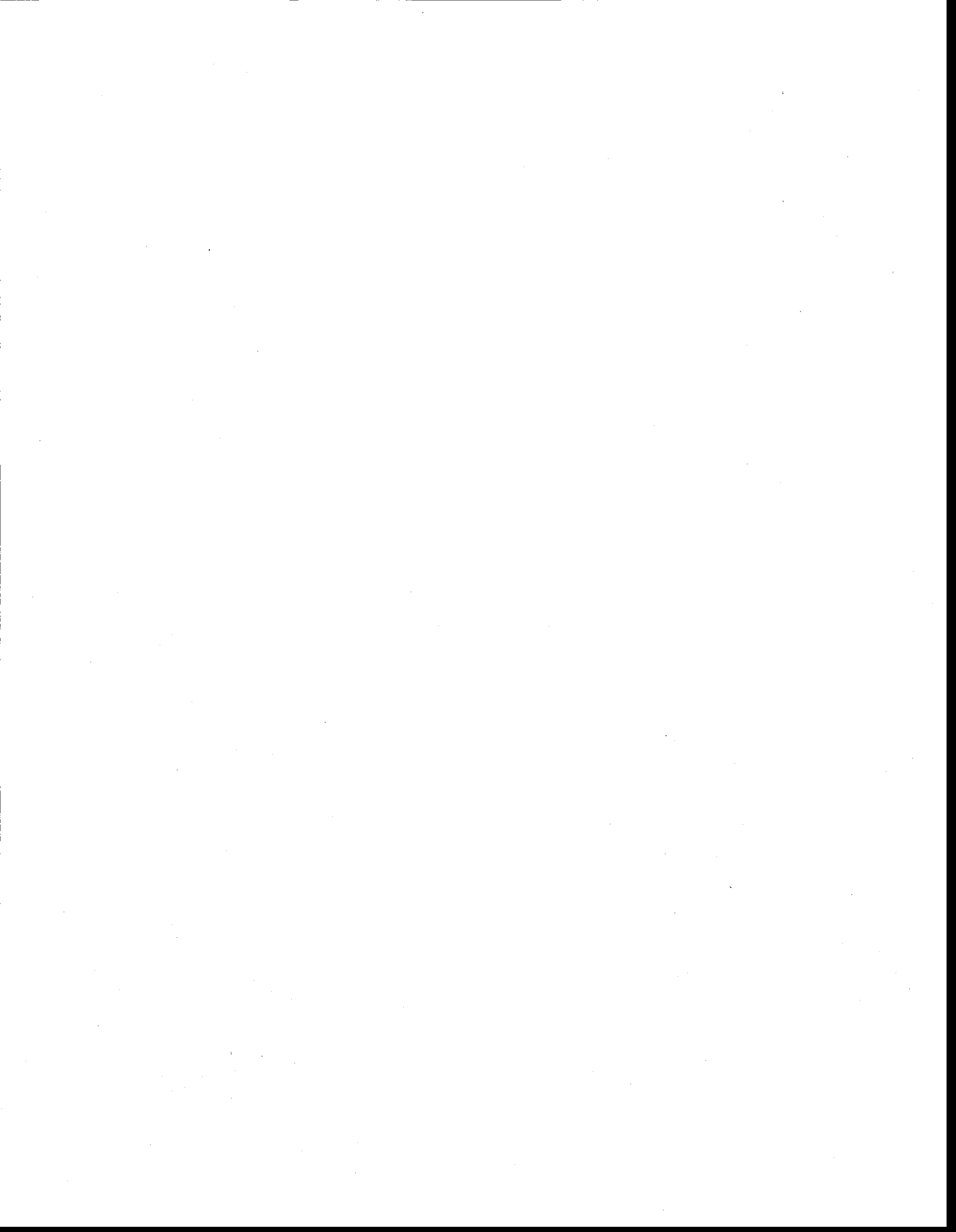
Time (h)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (I.U./mL)	Time (h)	K_{La} (1/h)	OTR (mmol O ₂ /L/h)	OUR (mmol O ₂ /L/h)
0	1,06E+07	2,54E+02	0,09	3	94,4	0,84	0,44
3	3,03E+07		0,09	6	36,2	1,36	1,85
6	8,67E+07	3,50E+02	0,09	19	61,6	1,71	1,63
10	1,23E+08		0,13	30	29,7	0,22	0,43
13	8,93E+08	5,03E+03	0,45	36	40,9	0,34	0,46
17	1,04E+09		0,90	48	66,5	0,07	0,13
20	1,81E+09	1,86E+07	1,57				
30	1,55E+09	4,53E+07	5,63				
36	1,31E+08		4,86				
48	1,11E+09	1,88E+08	5,10				

Table 5: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA), $K_{L,a}$, OTR and OUR during *Bacillus licheniformis* growth in VOT 1 experiment

Time (h)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (I.U./mL)	Time (h)	$K_{L,a}$ (1/h)	OTR (mmol O ₂ /L/h)	OUR (mmol O ₂ /L/h)
0	1,35E+07	2,25E+02	0,05	4	53,7	0,5	0,22
4	7,40E+07		0,05	8	59,1	1,25	1,56
8	1,74E+08	4,10E+02	0,05	11	65,1	2,31	1,67
11		1,00E+03	1,63	15	71,4	1,74	0,74
15			3,07	18	75,2	1,68	0,91
18	8,33E+08	7,30E+05	5,87	21	63,4	1,12	0,71
21	1,23E+09		8,83	24	45,3	0,40	0,22
24	9,97E+08	2,68E+07	9,61	35	32,2	0,51	0,32
35	1,48E+09	5,87E+07	9,84	47	19,4	0,14	0,17
47	1,27E+09	6,57E+07	9,49				
51	1,03E+09		7,12				

Table 6: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA), $K_{L,a}$, OTR and OUR during *Bacillus licheniformis* growth in VOT 2 experiment

Time (h)	TC (CFU/mL)	VS (CFU/mL)	PA (I.U./mL)	Time (h)	$K_{L,a}$ (1/h)	OTR (mmol O ₂ /L/h)	OUR (mmol O ₂ /L/h)
0	1,67E+07	2,34E+02	0,05	3	59,9	0,72	0,36
3	5,33E+07		0,05	6	62,1	1,34	1,48
6	9,93E+07	5,30E+02	0,05	9	64,1	1,71	1,82
9	3,23E+08	1,22E+03	1,49	14	71,2	2,01	1,62
14	6,33E+08		3,27	18	77,7	1,49	0,87
18	9,67E+08	7,23E+05	6,03	21	79,4	1,34	1,13
21	1,03E+09		9,01	24	64,4	0,32	0,42
24	1,33E+09	4,67E+07	10,04	34	44,2	0,34	0,36
34	1,53E+09	8,87E+07	11,74	42	39,1	0,11	0,13
42	1,64E+09	1,17E+08	12,71	48	27,6	0,13	0,08
48	1,03E+09	1,07E+08	10,02				



ANNEXE 5

INFLUENCE OF THE WASTEWATER TREATMENT PROCESS ON PROTEASE PRODUCTION (CHAPITRE 4)



Table 1: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) during *Bacillus licheniformis* growth in Quebec wastewater sludge with and without added alum and polymer.

Sample	Time (h)	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (I.U./ml)
sludge	0	5,87E+06	1,01E+03	0,09
	3	3,00E+06	0,00E+00	0,09
	8	4,30E+07	2,78E+03	0,09
	10	0,00E+00	0,00E+00	0,09
	12	5,33E+07	6,33E+03	1,76
	15	8,97E+07	0,00E+00	3,89
	19	6,67E+08	1,01E+06	4,14
	26	9,90E+08	1,21E+07	5,59
	32	1,20E+09	1,03E+08	7,05
	46	1,85E+09	9,07E+07	6,74
sludge with alum and polymer	0	6,13E+06	3,37E+02	0,09
	5	1,03E+07	4,00E+02	0,09
	7	2,36E+07	0,00E+00	1,28
	9	3,60E+07	0,00E+00	0,09
	12	7,67E+07	1,67E+03	3,66
	15	3,30E+08	0,00E+00	3,50
	18	9,33E+08	1,00E+06	3,04
	28	9,00E+08	6,73E+07	7,01
	30	2,07E+09	2,33E+08	8,18
	42	1,57E+09	0,00E+00	7,97
48	1,97E+09	9,03E+07	7,64	

Table 2: Evolution of total cell count (TC), viable spore count (VS), protease activity (PA) during *Bacillus licheniformis* growth in Victoriaville wastewater sludge with and without added ferric chloride.

Sample	Time (h)	TC (CFU/ml)	VS (CFU/ml)	PA (I.U./ml)
sludge	0	4,27E+06	1,02E+02	0,09
	3	7,17E+06		0,09
	6	1,60E+07	8,80E+02	0,09
	9	3,03E+07		0,09
	12	6,67E+07	1,54E+03	0,38
	15	8,00E+08		1,77
	18	1,17E+09	6,27E+06	6,12
	24	2,43E+09	1,40E+07	10,86
	30	1,50E+09	7,63E+07	10,76
	36	2,98E+09	9,43E+07	11,31
	44	2,44E+09	6,80E+07	10,61
	50	1,33E+09	4,53E+07	9,98
sludge with ferric chloride	0	9,80E+06	1,25E+02	0,09
	3	8,10E+06		0,09
	6	1,93E+07	2,01E+02	0,09
	10	5,33E+07		1,06
	12	6,27E+07	2,20E+05	2,78
	15	6,80E+08		4,48
	20	2,17E+09	2,00E+06	8,95
	24	1,30E+09	1,69E+07	10,58
	30	2,54E+09	6,33E+07	11,74
	36	3,07E+09	7,10E+07	12,11
	43	2,57E+09	8,37E+07	11,31
	48	2,97E+09	8,10E+07	11,13



