

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

**PRODUCTION ECONOMIQUE D'ENZYMES LIGNINOLYTIQUES PAR
FERMENTATION À L'ÉTAT SOLIDE DES DÉCHETS
AGROINDUSTRIELS ET LEURS APPLICATIONS**

Par

FATMA GASSARA

Thèse présentée
pour l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Examineur externe
et président de jury

Yann Le Bihan – CRIQ

Examineur externe

Antonio Avalos Ramirez – IRDA

Examineur interne

Patrick Drogui – INRS-ETE

Directrice de recherche

Satinder K. Brar – INRS-ETE

Codirecteur de recherche

Rajeshwar D. Tyagi – INRS-ETE



RÉSUMÉ

Les champignons responsables de la pourriture blanche du bois sont capables de synthétiser des enzymes extracellulaires dégradant des produits chimiques insolubles, comme la lignine et plusieurs polluants toxiques très persistants dans l'environnement. Cependant, la production d'enzymes reste très coûteuse en raison du coût élevé de la matière première, qui représente entre 40% et 60% du coût de production. Dans cette perspective, cette étude vise l'utilisation des déchets comme matière première pour la production d'enzymes. Ces matières premières ont été choisies comme substrats de croissance pour la production d'enzymes en raison de leur présence en très grande quantité, leur haute biodégradabilité, leur richesse en carbone et leur élimination de ses propres effets néfastes sur l'environnement.

Cette étude porte sur la production d'enzymes ligninolytiques en se basant sur une fermentation à l'état solide de différents déchets agro-industriels. Quatre déchets ont été testés (les résidus de poisson, les déchets de microbrasserie, les déchets de l'industrie de jus de pomme et les rejets de l'industrie de pâte et papier) afin de cibler le déchet permettant une meilleure croissance du microorganisme (*Phanerocheate chrysosporium*) et une meilleure production des enzymes ligninolytiques. L'utilisation des déchets comme matière première a permis de résoudre le problème du coût élevé de la matière première (40-60% du coût de production). Après criblage des déchets, une optimisation des conditions de fermentation (humidité, concentration de veratryl alcool et de sulfate de cuivre) dans les fioles a été réalisée en se basant sur la méthodologie de surface de réponse. Une modification de la méthode de quantification de la lignine (remplacer l'étape d'acidolyse par reflux utilisée dans la méthode de Klason par la digestion par micro-onde) a été réalisée afin de quantifier la lignine plus rapidement et efficacement. Après l'optimisation des conditions de fermentation en fioles, des expériences de fermentation à grande échelle (12 L) ont été réalisées, tout en optimisant l'agitation et l'aération dans le fermenteur. En outre, une fermentation en culture liquide en utilisant la même souche a été faite afin de comparer la production des enzymes en culture liquide avec celle en culture solide. Puis, les enzymes ont été extraites puis formulées en microcapsules. L'extrait libre et les enzymes formulées ont été par la suite testés dans la dégradation d'une eau fortifiée avec un contaminant émergent, bisphénol A (BPA) et dans la clarification des jus. Une évaluation de l'impact environnemental et économique du procédé de production des enzymes ligninolytiques par fermentation des déchets solides de jus de pomme a été finalement réalisée.

Les résultats de cette étude ont montré en premier lieu que les déchets de jus de pomme (*apple pomace*) et les déchets de microbrasserie (*brewery spent grain*) sont des excellentes matières premières pour la production des enzymes ligninolytiques. De plus, il a été confirmé que l'addition des inducteurs (veratryl alcool, sulfate de cuivre) dans le milieu de culture a amélioré la production des enzymes ligninolytiques et accélère la croissance de *P. chrysosporium*. D'après la méthodologie de surface de réponse RSM, les valeurs optimales de MnP, LiP et le Log 10 de la viabilité of *P.chrysosporium* dans AP ont été obtenues avec 80 % d'humidité, 3 mmole/kg VA et 0.5 mmole/kg de sulfate de cuivre. Néanmoins, la production maximale de LiP dans les déchets de microbrasserie a été obtenue avec 70 % d'humidité, 2 mmole/kg de VA et 1 mmole/kg de sulfate de cuivre. De même, la production maximale de laccase dans *apple pomace* et les déchets de microbrasserie a été obtenue avec 80 % (p/p) d'humidité, 3 mmole/kg de VA et 1.5 mmole/kg de sulfate de cuivre. Aussi, il a été montré que les meilleures conditions de digestion par microonde obtenues se présentent de la façon suivante : pression = 30 bar, température = 170 °C, temps = 15 min. L'emploi de la micro-onde a réduit considérablement le temps nécessaire pour quantifier la lignine dans les déchets et a amélioré la précision de la méthode de Klason. En second lieu, les résultats de la fermentation d'apple pomace dans un fermenteur de 12 ont montré que la production d'enzymes a été fortement influencée par le débit d'aération et le mode d'agitation. Les productions maximales de MnP (1690,3 ± 87,6), LiP (387,9 ± 14,3) et de la laccase (898,9 ± 53,3 U /gss) ont été obtenues en utilisant 1,66 VVM comme débit d'air et une agitation continue pendant la phase de latence, discontinue pendant la phase exponentielle et continue pendant la phase stationnaire de croissance. En outre, les activités maximales de MnP, LiP et laccase, obtenues par fermentation en culture liquide de la boue d'ultrafiltration (220 U / L, 6,5 U / L, 45 U / L) ont été de l'ordre de 10 000 , 40 000 et 6000 fois plus faibles que les activités obtenues dans une culture de déchets solide de jus de pomme. En troisième lieu, la formulation des enzymes dans trois structures d'hydrogel à savoir les réseaux semi-interpénétrés de poly (acrylamide) / gélatine (P (AAM) / Gel), poly (acrylamide) / pectine (P (AAM) / Pec) et poly (acrylamide)/ CMC (P (AAM) / CMC) a augmenté considérablement la stabilité thermique des enzymes ligninolytiques et a empêché de leur inactivation. En quatrième lieu, il a été prouvé que le traitement du jus de grenade et des fruits rouges par des enzymes ligninolytiques encapsulées, a abouti à une réduction des composés polyphénoliques (plus de 60% dans tous les traitements) et à une amélioration de la clarté plus significatives ($p > 0,05$) que celles obtenues par le traitement par des enzymes libres (45%). Il a été aussi démontré qu'une forte dégradation de BPA (diminution de 90% de la concentration initiale) a été obtenue après 8 h de traitement d'eau fortifié par BPA (10 ppm) par des enzymes ligninolytiques

encapsulées dans un hydrogel de polyacrylamide et pectine. Par contre, la dégradation du bisphénol A par les enzymes libres (diminution de 26% de la concentration initiale) était inférieure à celle obtenue par des enzymes encapsulées. Par la suite, l'encapsulation des enzymes a permis l'amélioration de la stabilité thermique des enzymes et l'augmentation de leurs activités dans la bioremédiation et la clarification des jus. En dernier lieu, une comparaison des émissions de gaz à effet de serre durant la fermentation des déchets solides de jus de pomme avec celles générés par d'autres types de gestion (l'incinération, l'enfouissement, alimentation animale et compostage) a été étudiée. Les résultats trouvés dans cette étude ont montré que la production d'enzymes est un procédé moins polluant pour l'environnement en termes de rejet de GES (906,81 tonnes de CO₂ éq par année). En comparaison, l'enfouissement a été trouvé comme le procédé le plus polluant (1841 tonnes de CO₂ éq par année). Ces résultats incitent l'utilisation des déchets solides de jus de pomme dans la production d'enzymes, afin de respecter l'environnement et diminuer la production de gaz participant au réchauffement de la planète. Enfin, il a été prouvé que l'utilisation des déchets solides de jus de pomme comme substrat de fermentation, réduit le coût de production des enzymes ligninolytiques de 32,30 % par rapport à celui trouvé en utilisant le milieu synthétique (son de blé) comme milieu de culture.

Ce projet de recherche a contribué à apporter une solution à la problématique de gestion des déchets agroindustriels et faire d'eux une matière première pour la production des enzymes ligninolytiques. Il a permis donc la préparation d'un produit formulé à valeur ajoutée d'enzymes ligninolytiques qui pourra être utilisé dans la dégradation des contaminants émergents comme le BPA et la clarification des jus de fruits.



ABSTRACT

White rot fungi are one group of fungi that produces a family of enzymes called ligninolytic enzymes which possess extensive biodegradation properties. These enzymes are able to degrade several persistent toxic pollutants in the environment and these enzymes have been employed for their decontamination. However, enzyme production is very expensive due to the high cost of raw material, which represents 40-60% of the cost of production. In this perspective, this study aims to use solid and liquid waste as substrate for the production of ligninolytic enzymes. Agro-industrial wastes were chosen as growth medium due to their omnipresence, high biodegradability, and richness in carbon which if left as such would lead to disposal problems and hence adverse environmental impacts.

This study comprised solid-state fermentation (SSF) to test the production of lignocellulosic enzymes, namely lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase by *Phanerochaete chrysosporium* using different agro-industrial wastes, such as fishery residues, municipal dewatered sludge, brewery waste, apple waste (pomace) and pulp and paper industry sludge. The use of waste as raw material has solved the problem of high cost of raw material (40-60% of production costs). After the screening of substrates, an optimization of fermentation conditions (moisture, concentration of veratryl alcohol and copper sulphate) in flasks was performed based on the response surface methodology. The influence of microwave heating during the mild acidolysis step to replace traditional refluxing in order to quantify lignin by Klason method was also investigated to arrive at a simple and rapid analysis method. The enzyme production process was then scaled up in 12 L fermentor, while optimizing the agitation and aeration conditions. In addition, liquid culture fermentation using the same strain was carried out to compare the production of enzymes in liquid culture with that in solid culture. Later, enzymes were extracted and formulated into microcapsules. Free extract and encapsulated enzymes were tested in the degradation of an emerging contaminant bisphenol A (BPA) and for the clarification of juice. An assessment of the environmental and economic impact of the production process of ligninolytic enzymes by solid state fermentation of apple pomace was also carried out.

The results of this study have shown that apple pomace and brewery waste are excellent raw materials for the production of ligninolytic enzymes. Moreover, it was found that the addition of inducers (veratryl alcohol, copper sulfate) in the culture enhanced the production of ligninolytic enzymes and accelerated the growth of *P. chrysosporium*. According to the response surface methodology, higher values of manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP) and

viability of *P. chrysosporium* on apple pomace (1287.5 U MnP/gds (units/gram dry substrate), 305 U LiP/gds, and 10.38 Log 10 viability) and brewery waste (792 U MnP/gds and 9.83 Log 10 viability) were obtained with 80% moisture, 3 mmol/kg VA, and 0.5 mmol/kg copper. LiP production in brewery waste (7.87 U/gds) was maximal at 70% moisture, 2 mmol/kg VA, and 1 mmol/kg copper. Higher production of laccase in apple pomace (789 U/gds) and brewery waste (841 U/gds) were obtained with 80% moisture, 3 mmol/kg VA, and 1.5 mmol/kg copper. Likewise, the best conditions for microwave digestion to extract lignin were obtained as: pressure = 30 bar, temperature = 170 ° C, time = 15 min. The use of microwave has significantly reduced the time needed to quantify the lignin in waste and improved the precision of the Klason method. The results of solid state fermentation in 12 L fermenter showed that enzyme production was strongly influenced by the aeration rate and mode of agitation. The maximum production of MnP (1690.3 ± 87.6), LiP (387.9 ± 14.3) and laccase (898.9 ± 53.3 U / gss) were obtained using 1.66 VVM as air flow and continuous agitation during the lag phase, discontinuous during the exponential phase and continuous during the stationary phase of growth. In addition, the maximal activities of laccase (220 U/L), LiP (6.5 U/L) and laccase (45 U/L) in liquid culture were 10000, 40000 and 6000 -folds lower than the activities obtained in solid culture of apple pomace waste, respectively. The formulation of the three enzymes in hydrogel structures, namely semi-interpenetrating networks of poly (acrylamide) / gelatin (P (MAA) / Gel), poly (acrylamide) / pectin (P (AAM) / Pec) and poly (acrylamide) / CMC (P (AAM) / CMC) significantly increased the thermal stability of ligninolytic enzymes and prevented their inactivation. It was also seen that the polyphenolic compound reduction and clarity amelioration in berry pomegranate juice using encapsulated enzymes treatment (more than 60% in all treatment) was highly significant ($p > 0.05$) as compared to free enzymes used for the treatment (45 %). Hence, ligninolytic enzymes (LiP, MnP and laccase) were able to clarify the juice and this method can replace the traditional ultrafiltration method in order to make the clarification process more economical for the industries. It was shown that higher degradation of BPA (90 % of initial concentration of 10 ppm) by ligninolytic enzymes encapsulated on polyacrylamide hydrogel and pectin after 8 hour of contact time. The degradation of Bisphenol A with free enzyme (26%) was lower when compared with encapsulated enzymes. Thus, the encapsulation of enzymes has allowed the improvement of thermal stability of enzymes and increased their activities in bioremediation and the juice clarification of juice. Finally, greenhouse gas (GHG) emission analysis of apple pomace management strategies, namely incineration, landfill, composting, solid-state fermentation to produce high-value enzymes and animal feed, using life cycle assessment (LCA) model was performed. The GHG analysis indicated that, among all the

apple pomace management sub-models for a functional unit, solid-state fermentation to produce enzymes was one from the more effective method for reducing GHG emissions and carbon credit (906.81 tons CO₂ eq. per year, 27204 \$ of carbon credit taking into consideration an assumption of \$30/ton of CO₂ equivalent), while apple pomace landfill resulted in higher GHG emissions (1841.00 tons CO₂ eq. per year, 55230 \$ of carbon credit). These results showed that solid-state fermentation gave positive indications of environmental sustainability for the use of this strategy to manage apple pomace and other agricultural wastes, particularly in Quebec and also extended to other countries. Finally, it was shown that the use of apple pomace as raw material reduced the cost of ligninolytic enzymes production of 32.30% compared with the synthetic medium (wheat bran).

In this project, an interesting observation that was made was the higher production of valuable compounds, namely ligninolytic enzymes by the solid state fermentation of pomace which is otherwise composted or used as animal feed. Moreover, this work is novel in the sense that there is integrated management of pomace wastes through production of ligninolytic enzymes that was used in the degradation of emerging contaminants, such as BPA and clarification of fruit juices, important applications in the field of bioremediation and juice manufacture.



PUBLICATIONS / MANUSCRITS DANS CETTE THÈSE

1. **Gassara F.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Verma M., Surampalli R.Y. (2010). Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*, 49 (3) : 388-394
2. **Gassara F.**, Brar S.K., Pelletier F., Verma M., Godbout S., Tyagi R.D. (2011). Pomace waste management scenarios in Québec-Impact on greenhouse gas emissions. *Journal of Hazardous Materials*, 192 (3) : 1178-1185.
3. **Gassara F.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Valero J.R. (2011). Biological degradation of bisphenol a in wastewater / Net dégradation biologique du bisphénol A dans les eaux usées. *Environnemental Reviews*, 19 (1) : 32-54.
4. **Gassara F.**, Brar S.K., Tyagi R.D., John R.P., Verma M., Valero J.R. (2011). Parameter optimization for production of ligninolytic enzymes using agro-industrial wastes by response surface method. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.*, 16 (2) : 343-351.
5. **Gassara F.**, Ajila.C.M, Brar S.K., Tyagi R.D., John R.P., Verma M., Valero J.R. (2012). Liquid state fermentation of apple pomace sludge for the production of ligninolytic enzymes and liberation of polyphenolic compounds. *Process Biochemistry*. *Accepted*.
6. **Gassara F.**, Ajila.C.M, Brar S.K., Tyagi R.D., John R.P., Verma M., Valero J.R. (2012). Lignin Analysis using microwave digestion. *Biotechnology Letters*. *Accepted*.
7. **Gassara F.**, Ajila.C.M, Brar S.K., Tyagi R.D., John R.P., Verma M., Valero J.R. (2012). Influence of aeration and agitation modes on solid state fermentation of apple pomace waste by a wood decay fungus "*Phanerochaete chrysosporium*" to produce ligninolytic enzymes and co-extract polyphenols. *Biochemical Engineering Journal*. *Under review*.
8. **Gassara F.**, Ajila.C.M, Brar S.K., Tyagi R.D., John R.P., Verma M., Valero J.R. (2012). Ligninolytic enzyme encapsulation and application in pomegranate clarification and bisphenol A degradation. *Food chemistry*. *Under review*.
9. **Gassara F.**, Brar S.K., Tyagi R.D., John R.P., Verma M., Valero J.R. (2012). Bisphenol A degradation in water by ligninolytic enzymes. *Bioresource Technology*. *Submitted*.

PUBLICATIONS / MANUSCRITS EN DEHORS DE CETTE THÈSE

1. Ajila C.M., **Gassara, F.**, Brar, S. K., Verma, M. Tyagi, R.D., Valéro, J.R. (2011). Phenolic antioxidant mobilization in apple pomace by different methods of solid-state fermentation and evaluation of its antioxidant activity. *Food and Bioprocess Technology*. DOI 10.1007/s11947-011-0582-y.
2. Mohapatra, D.P., **Gassara, F.**, Brar, S.K. (2011). Nanoparticles – Production and Role in Biotransformation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(2):899-918.
3. Dhillon, GS., Brar, S. K., Kaur, S., **Gassara, F.**, Verma, M., Valéro, J.R. (2012). Optimization of xylanase production using Apple pomace waste by *Aspergillus niger* through koji fermentation. *Engineering in Life Sciences*. DOI10.1002/elsc.201100102.
4. **Gassara F.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Verma M., Surampalli R.Y. (2012).. Trends in biological degradation of cyanobacteria and toxins. In “Environmental Protection Strategies for Sustainable Development” Malik et al.2012. Editor (*Springer, The Netherlands*)(In press).
5. Dhillon, G.S., **Gassara F.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Verma M. (2012). Biotechnological applications of Lignin- "Sustainable alternative to non-renewable materials".In Paterson. R. J., (ed). Lignin: Properties and Applications in Biotechnology and Bioenergy. *Nova Publishers*.

CONGRÈS ET CONFÉRENCES

1. **Gassara, F., Brar, S. K., Tyagi, R.D.** (2011). Fermentation à l'état solide de déchets solides de jus de pomme pour produire des enzymes ligninolytiques par *Phanerocheate chrysosporium*. 26 ième congrès de l'EST du Canada sur la qualité de l'eau (CAWQ), octobre 2011-Québec.
2. **Gassara F., Brar S.K., Pelletier F., Verma M., Godbout S., Tyagi R.D.** (2011). Pomace waste management scenarios in Québec-Impact on greenhouse gas emissions. Conference of 47th Central Canadian Symposium on Water Quality Research, academics presentations, Canada Centre for Inland Waters, 22nd and 23rd Feb. 2011, Burlington, ON, Canada
3. **Gassara, F., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli. R. Y.** (2010). Solid state fermentation of waste biomass to produce manganese peroxidase by *Phanerocheate chrysosporium*. Indian Institute of Technology, Madras, Chennai, India.
4. Mhamdi, N., Rouissi, T., **Gassara, F., Rojan, J., Prévost, D., Pouleur, S., Brar, S.K., Tyagi. R.D.** (2010). Étude d'un mélange *Trichoderma viride et Sinorhizobium meliloti*: optimisation et effet sur la luzerne. CONGRÈS CONJOINT AQSSS – SPPQ, Abbaye d'Oka, 1er au 3 juin 2010.
5. Mhamdi, N., Rouissi, T., **Gassara, F., Rojan, J., Prévost, D., Pouleur, S., Brar, S.K., Tyagi.** (2010). Optimisation d'un mélange *Trichoderma viride et Sinorhizobium meliloti* et son application sur la luzerne. Saint Laurent chapter congress, Quebec 2010.
6. **Gassara, F., Brar, S. K., Tyagi, R.D.** (2009). Fermentation à l'état solide de déchets agroindustriels pour produire des enzymes ligninolytiques par *P. chrysosporium*. 25ième congrès de l'EST du Canada sur la qualité de l'eau(CAWQ), octobre 2009-Ottawa.
7. **Gassara, F., Brar, S. K., Tyagi, R.D.** (2009). Déchets agro-industriels: source précieuse d'enzymes dégradant les contaminants émergents.10ème JSTE, 27 Mars, ULaval.
8. **Gassara, F., Brar, S K., Mhamdi, N, Mahmoudi, A, Tyagi. R.D.** (2010) Sélection des déchets agro-industriels pour produire des enzymes ligninolytiques par

Phanerocheate chryso sporium. Journée des Sciences de la Terre et l'Environnement. 11^{ème} JSTE ,26 mars 2010.

9. Mhamdi, N., Rouissi, T., **Gassara, F.**, Rojan, J., Prévost, D., Pouleur, S., Brar, S.K., Tyagi. (2010). Optimisation d'un mélange a base de *Sinorhizobium meliloti*-*Trichoderma viride* produits dans les eaux usées; amidon et son effet sur la luzerne. Journée des Sciences de la Terre et de l'Environnement. 11^{ème} JSTE ,26 mars 20

REMERCIEMENTS

S'il est vrai que le travail de thèse constitue avant tout un exercice solitaire, la présente recherche n'aurait pas pu aboutir sans le concours de nombreuses personnes autres que son auteur. La liste de ceux et celles qui ont apporté leur pierre à cet édifice est bien trop longue pour figurer ici *in extenso*. Que ceux qui ne sont pas nommément cités n'y voient donc pas le reflet d'une quelconque ingratitude ou d'un oubli de ma part.

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à ma directrice de thèse Satinder Kaur Brar et mon codirecteur R. D Tyagi. En effet, cette thèse n'existerait pas s'ils n'avaient pas accepté de la diriger. A cette qualité d'ouverture d'esprit, s'ajoute une exigence qui, si elle est synonyme, à court terme, de longues séances de travail, ne peut qu'être bénéfique à plus long terme. Je peux dire aujourd'hui que les échanges que j'ai eus avec ma directrice et mon co-directeur de thèse ont toujours été riches et denses et qu'elle a été un guide avisé tout au long de mon cheminement vers la soutenance. Qu'ils trouvent ici toute l'expression de ma gratitude.

Je suis très reconnaissante envers Antonio Avalos Ramirez, Yann Le bihan, Patrick Drogui d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai travaillé pendant ces années de thèse. Je suis particulièrement redevable à Stéphane Godbout, Frédéric Pelletier, José Valéro et Mausam Verma.

Des remerciements tout particuliers s'adressent également à tous mes collègues du laboratoire, en particulier à Ajila, Dipti, Amine, Nejib et Koukou qui m'ont apporté une aide précieuse durant toute cette période d'étude.

Un tel travail, avec son lot de difficultés, de doutes et de remises en question ne peut se concevoir que dans un environnement propice à sa réalisation. C'est pourquoi je souhaite ardemment rendre hommage à mes parents Habib et Najwa, mon frère Mohamed, ma sœur Souhir et mon oncle Mohsen leur affection, leur aide et, quand cela était nécessaire, leur indulgence à mon égard. Ces remerciements s'adressent également à mes meilleures amies Asma et Xiaolei, pour leur disponibilité, leur support moral et leur gentillesse.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma profonde reconnaissance à mon époux Walid et mon petit trésor Adam pour leur patience et leur compréhension, leur soutien indéfectible et, de manière plus générale, pour avoir si bien su m'accompagner sur ce long chemin. A notre nouvelle vie, Walid et Adam !



TABLES DES MATIERES

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT	VII
PUBLICATIONS / MANUSCRITS DANS CETTE THÈSE.....	XI
PUBLICATIONS / MANUSCRITS EN DEHORS DE CETTE THÈSE	XII
CONGRÈS ET CONFÉRENCES	XIII
REMERCIEMENTS	XV
TABLES DES MATIERES	XVII
Liste des tableaux.....	XXV
Liste des figures	XXVII
ABRÉVIATIONS.....	XXXI
INTRODUCTION	XXXIII
CHAPITRE I.....	1
SYNTHÈSE.....	1
PARTIE 1. REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE	3
1.1.1. Définition	3
1.1.2. Application de la fermentation en milieu solide.....	3
1.1.3. Avantages de la fermentation à l'état solide	4
1.1.4. Inconvénients de la fermentation solide.....	4
1.2. LES ENZYMES	5
1.2.1. Définition des enzymes.....	5
1.2.2. Application des enzymes	6
1.2.3. Les enzymes ligninolytiques	7
1.2.4. Utilisation des enzymes dans la bioremédiation	17
1.2.5. Utilisation des enzymes ligninolytiques dans la clarification des jus	18
1.3. PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM.....	19
1.3.1. Caractéristiques générales	19
1.3.2. MÉTABOLISME DE PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM	19
1.3.3. Les gènes de <i>P chrysosporium</i> responsables de la sécrétion des enzymes ligninolytiques ...	19
1. 4. LES MILIEUX DE CULTURES UTILISÉS POUR LA PRODUCTION DES ENZYMES LIGNINOLYTIQUES PAR PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM.....	21
1.4.1. Les sources de nutriments	22
1.4.2. Utilisation des déchets agro-industriels dans la production des enzymes ligninolytiques.....	22
1.4.3. Stimulateurs de la production d'enzymes ligninolytiques par <i>Phanerocheate chrysosporium</i> .	25
PARTIE 2 PROBLÉMATIQUES.....	26
2.1 PROBLÉMATIQUE DES CONTAMINANTS ÉMERGENTS.....	26
2.2 PROBLÉMATIQUE DU COÛT ÉLEVÉ DE PRODUCTION D'ENZYMES.....	27
PARTIE 3. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	28
3. 1. HYPOTHÈSES.....	28
3.1.1. Hypothèse 1	28
3.1.2. Hypothèse 2.....	29
3.1.4. Hypothèse 3.....	29

3.2. OBJECTIFS DE RECHERCHE	29
3.3 ORIGINALITÉ DU TRAVAIL	30
PARTIE 4. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	31
4.1 PRODUCTION DES ENZYMES LIGNINOLYTIQUES DANS DES FIOLES.....	31
4.1.1 <i>Criblage des déchets agroindustriels assurant une meilleure production d'enzymes ligninolytiques</i>	31
4.1.2 <i>Optimisation des conditions de fermentation par la méthode de surface des réponses</i>	32
4.1.3 <i>Quantification de la teneur en lignine dans les déchets agroindustriels</i>	33
4.2 PRODUCTION DES ENZYMES LIGNINOLYTIQUES DANS DES FERMENTEURS.....	34
4.2.1 <i>Production des enzymes ligninolytiques dans un fermenteur en culture solide de 12 L</i>	34
4.2.2 <i>Production des enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état liquide des boues d'ultrafiltration</i>	35
4.3. FORMULATION DES ENZYMES LIGNINOLYTIQUES.....	36
4.4 APPLICATION DES ENZYMES LIGNINOLYTIQUES.....	37
4.4.1 <i>Clarification des jus de fruits</i>	37
4.4.2 <i>Dégradation de bisphénol A</i>	37
4.5 ÉVALUATION DE L'IMPACT ENVIRONNEMENTAL ET ÉCONOMIQUE DU PROCÉDÉ DE PRODUCTION DES ENZYMES LIGNINOLYTIQUES.....	38
4.5.1 <i>Impact environnemental du procédé de production des enzymes</i>	38
4.5.2 <i>Analyse technico-économique du procédé de production des enzymes ligninolytiques</i>	39
PARTIE 5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	40
5.1. CONCLUSIONS	40
5.2. RECOMMANDATIONS	41
BIBLIOGRAPHIE	43
CHAPITRE II.....	51
DÉGRADATION BIOLOGIQUE DU BISPHÉNOL A DANS LES EAUX USÉES	51
RÉSUMÉ.....	53
ABSTRACT	54
INTRODUCTION	55
DÉGRADATION MICROBIENNE DU BPA PRÉSENT DANS LES EAUX USÉES.....	56
BACTÉRIES.....	56
<i>Streptomyces sp</i>	56
<i>Sphingomonas paucimobilis FJ-4</i>	57
<i>Pseudomonas sp. et Pseudomonas putida</i>	57
<i>Sphingomonas sp. strain AO1</i>	58
<i>Sphingomonas sp. strain BP7</i>	58
<i>Bactérie gram-1 souche MV1</i>	59
<i>Achromobacter xylooxidans B-16</i>	60
CHAMPIGNONS	60
<i>Stereum hirsutum et Heterobasidium insulare</i>	61
<i>Pleurotus ostreatus O-48</i>	62
<i>Phanerochaete chrysosporium ME-446 et Trametes versicolor IFO-6482</i>	62
ALGUES.....	63
CULTURE MIXTE DE MICROORGANISMES	63
DÉGRADATION ENZYMATIQUE DU BPA PRÉSENT DANS LES EAUX USÉES	65
GÉNÉRALITÉS	65
ENZYMES IMPLIQUÉES DANS LA DÉGRADATION DU BPA	66
<i>La peroxydase</i>	67
<i>La laccase</i>	68

PROCÉDÉS DE DÉGRADATION ENZYMATIQUE	69
<i>Dégradation du BPA par des enzymes libres</i>	69
<i>Biodégradation du BPA par des enzymes immobilisées</i>	72
<i>Dégradation enzymatique du BPA dans un milieu organique</i>	74
<i>Dégradation du BPA par combinaison de l'action de la laccase et des boues activées</i>	75
EVALUATION DE LA TOXICITÉ DES PRODUITS DE DÉGRADATION	76
EFFET DES CONDITIONS DE TRAITEMENT SUR L'EFFICACITÉ DE LA BIODÉGRADATION	76
EFFET DU SUBSTRAT ET DES CONSTITUANTS DU MILIEU DE DÉGRADATION SUR L'ENZYME	77
CONCLUSION	78
REMERCIEMENTS	80
RÉFÉRENCES	81
CHAPITRE III	101
PARTIE 1	101
SCREENING OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES TO PRODUCE LIGNINOLYTIC ENZYMES BY PHANEROCHETE CHRYSOSPORIUM	101
RÉSUMÉ	103
ABSTRACT	104
1. INTRODUCTION	105
2. MATERIALS AND METHODS	106
2. 1 FUNGI AND SPORES COLLECTION	106
2. 2 SOLID-STATE FERMENTATION	106
2. 3 SOLID SUBSTRATES TYPES	106
2. 4 EFFECT OF INDUCERS ON LACCASE AND PEROXIDASE PRODUCTION	107
2. 5 ENZYME EXTRACTION	107
2. 5. 1 <i>Extraction by centrifugation</i>	107
2. 5. 2 <i>Extraction by filtration</i>	108
2. 6 ENZYME ASSAYS	108
2. 6. 1 <i>Lignin peroxidase (LiP)</i>	108
2. 6. 2 <i>Laccase activity</i>	108
2. 6. 3 <i>Manganese peroxidase (MnP)</i>	108
2. 7 VIABILITY ASSAY	108
2. 8 STATISTICAL ANALYSIS	109
3. RESULTS AND DISCUSSION	109
3.1 EFFECT OF INDUCERS ON LACCASE AND PEROXIDASE PRODUCTION	109
3.2. EFFECT OF EXTRACTION METHODS AND BUFFER PH ON PEROXIDASE RECOVERY	112
3. 3 VIABILITY ASSAY	113
4. CONCLUSION	114
ABBREVIATIONS	115
ACKNOWLEDGEMENTS	115
REFERENCES	117
CHAPITRE III	127
PARTIE 2	127
PARAMETER OPTIMIZATION FOR PRODUCTION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES USING AGRO-INDUSTRIAL WASTES BY RESPONSE SURFACE METHOD	127
RÉSUMÉ	129

ABSTRACT	130
1. INTRODUCTION	131
2. MATERIALS AND METHODS	132
2. 1 ORGANISM AND INOCULUM PREPARATION	132
2. 2 SOLID-STATE FERMENTATION	132
2. 3 EXPERIMENTAL DESIGN AND OPTIMIZATION	133
2. 4 ENZYME EXTRACTION AND MOISTURE MEASUREMENT	134
2.5 ENZYME ASSAYS	134
2. 6 VIABILITY ASSAY	134
3. RESULTS AND DISCUSSION	135
3. 1 EFFECTS OF VARIABLES ON PEROXIDASES PRODUCTION AND THE VIABILITY OF <i>PHANEROCHAETE</i> <i>CHRYSOSPORIUM</i>	135
3.2 EFFECTS OF VARIABLES ON LACCASE PRODUCTION	137
3.3 DETERMINATION OF OPTIMAL CONDITIONS AND OPTIMAL RESPONSES	138
4. CONCLUSION	140
ACKNOWLEDGEMENTS	140
REFERENCES	141
CHAPITRE III.....	151
PARTIE 3.....	151
LIGNIN ANALYSIS USING MICROWAVE DIGESTION	151
RÉSUMÉ.....	153
ABSTRACT	154
INTRODUCTION	155
MATERIALS AND METHODS	156
LIGNIN QUANTIFICATION	156
REFERENCES	163
CHAPITRE IV	171
PARTIE 1.....	171
INFLUENCE OF AERATION AND AGITATION MODES ON SOLID STATE FERMENTATION OF APPLE POMACE WASTE BY A WOOD DECAY FUNGUS "PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM" TO PRODUCE LIGNINOLYTIC ENZYMES AND CO-EXTRACT POLYPHENOLS	171
RÉSUMÉ.....	173
ABSTRACT	174
1. INTRODUCTION	175
2. MATERIAL AND METHODS	176
2. 1 MICROORGANISM AND INOCULUM PREPARATION	176
2. 2 SOLID STATE FERMENTATION	176
2. 3 ENZYME ASSAYS	177
2. 3. 1 <i>Lignin peroxidase (LiP)</i>	177
2. 3. 2 <i>Laccase activity</i>	177
2. 3. 3 <i>Manganese peroxidase (MnP)</i>	177
2. 4 VIABILITY ASSAY	177
2. 5 EXTRACTION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS	178

2. 6 ESTIMATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT.....	178
2. 7 PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS.....	178
2. 8 STATISTICAL ANALYSES.....	179
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	179
3. 1 ENZYME PRODUCTION.....	179
3. 1. 1 <i>Agitation rate optimization</i>	179
3.1.2. <i>Aeration optimization</i>	180
3. 2 LIBERATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS.....	182
3. 2. 1 <i>Agitation optimization</i>	182
3. 2. 2 <i>Aeration optimization</i>	182
3. 3 VIABILITY.....	183
3. 4 PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS.....	184
4. CONCLUSION.....	187
ACKNOWLEDGEMENTS.....	187
ABBREVIATIONS.....	188
REFERENCES.....	189
CHAPITRE IV.....	201
PARTIE 2:.....	201
LIQUID STATE FERMENTATION OF APPLE POMACE SLUDGE FOR THE PRODUCTION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES AND LIBERATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS.....	201
RÉSUMÉ.....	203
ABSTRACT.....	204
1. INTRODUCTION.....	205
2. MATERIALS AND METHODS.....	206
2. 1 MEDIA.....	206
2. 2 MICROORGANISM AND INOCULUM PREPARATION.....	206
2.3. FERMENTATION.....	207
2. 4 ENZYME ASSAYS.....	207
2. 5 VIABILITY ASSAY.....	207
2. 6 EXTRACTION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS.....	207
2. 7 ESTIMATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF POLYPHENOLIC EXTRACTS.....	208
2. 8 PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS.....	208
2. 8. 1 <i>Viscosity</i>	208
2. 8. 2 <i>Particle size</i>	208
2. 8. 3 <i>Zeta potential</i>	208
2.9 STATISTICAL ANALYSES.....	208
3. RESULTS & DISCUSSION.....	209
3.1 PRODUCTION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES AND VIABILITY OF PHANEROCHETE CHRYSOSPORIUM DURING LIQUID STATE FERMENTATION OF APPLE POMACE SLUDGE AND SYNTHETIC MEDIUM.....	209
3. 2 COMPARISON OF PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS.....	210
3. 3 LIBERATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS DURING FERMENTATION AND EVALUATION OF ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY.....	211
4. CONCLUSION.....	212
ACKNOWLEDGEMENTS.....	213
ABBREVIATIONS.....	213

REFERENCES	214
CHAPITRE V	223
PARTIE 1	223
ENCAPSULATION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES AND ITS APPLICATION IN CLARIFICATION OF JUICE.....	223
RÉSUMÉ.....	225
ABSTRACT	226
1. INTRODUCTION	227
2. MATERIALS AND METHODS	229
2. 1 SOLID STATE FERMENTATION	229
2.2. ENZYME FORMULATION.....	229
2. 3 ENZYME ASSAYS	230
2. 3. 1 <i>Lignin peroxidase (LiP)</i>	230
2. 3. 2 <i>Laccase activity</i>	230
2. 3. 3 <i>Manganese peroxidase (MnP)</i>	230
2.4. PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS OF ENZYMES FORMULATIONS	231
2.4.1. <i>Viscosity</i>	231
2. 4. 2 <i>Particle size analysis</i>	231
2. 4. 3 <i>Zeta potential</i>	232
2. 5 STATISTICAL ANALYSES.....	232
2. 6 JUICE TREATMENT BY ENZYMES	232
2.6.1. <i>Physico-chemical analyses of juice</i>	232
2. 7 STABILITY OF THE NATIVE ENZYME AND ENZYME NANOGEL AT HIGH TEMPERATURES.....	233
3. RESULTS AND DISCUSSION	233
3. 1 <i>Effect of temperature</i>	233
3. 2 PHYSICO-CHEMICAL ANALYSES OF DIFFERENT FORMULATIONS.....	234
3. 2. 1 <i>Particle size</i>	234
3. 2. 2 <i>Viscosity</i>	235
3. 2. 3 <i>Zeta potential</i>	235
3. 3 APPLICATION OF FORMULATIONS IN JUICE CLARIFICATION	235
3. 3. 1 <i>Polyphenolic compounds quantification</i>	235
3. 3. 2 <i>Juice clarity study</i>	237
4. CONCLUSION	237
ACKNOWLEDGEMENTS	238
ABBREVIATIONS	238
CHAPITRE V	251
PARTIE 2	251
BISPHENOL A DEGRADATION IN WATER BY LIGNINOLYTIC ENZYMES	251
RÉSUMÉ.....	253
ABSTRACT	254
1. INTRODUCTION	255
2. MATERIALS AND METHODS	256
2. 1 SOLID STATE FERMENTATION	256
2. 2 ENZYMES FORMULATION.....	257
2. 3 EXTRACTION OF BISPHENOL FROM THE MATRIX	257

2. 4 BISPHENOL A DEGRADATION AND QUANTIFICATION IN WATER.....	258
2. 5 STATISTICAL ANALYSIS	258
3. RESULTS AND DISCUSSION	259
3. 1 BISPHENOL A DEGRADATION BY LIGNINOLYTIC ENZYMES	259
3. 2 K_M AND V_M DETERMINATION	260
3. 3 BY-PRODUCTS OF BISPHENOL A BY LIGNINOLYTIC ENZYMES	261
4. CONCLUSION.....	261
ACKNOWLEDGEMENTS	263
REFERENCES	264
CHAPITRE VI	271
PARTIE 1.....	271
POMACE WASTE MANAGEMENT SCENARIOS IN QUÉBEC – IMPACT ON GREENHOUSE GAS EMISSIONS	271
RÉSUMÉ.....	273
ABSTRACT	274
I. INTRODUCTION	275
2. METHODOLOGY	277
2.1 LIFE CYCLE ASSESSMENT	277
2. 2 THE GOAL AND SCOPE	277
2. 3 SYSTEMS BOUNDARIES AND FUNCTION UNIT.....	277
2. 4 EMISSION CATEGORIES.....	278
2. 4. 1 <i>GHG emissions from the waste collection and transportation</i>	278
2. 4. 2 <i>Production of enzymes</i>	280
2. 4. 3 <i>Animal feed</i>	280
2. 4. 4 <i>Incineration</i>	281
2. 4. 5 <i>Composting</i>	283
2. 4. 6 <i>Landfill</i>	284
2.5 MAJOR LIMITATIONS	285
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	286
3. 1 PRODUCTION OF ENZYMES.....	287
3. 2 ANIMAL FEED	287
3. 3 INCINERATION	287
3. 4 COMPOSTING.....	288
3. 5 LANDFILL	288
4. CONCLUSIONS	290
ACKNOWLEDGEMENTS	291
REFERENCES	292
CHAPITRE VI	303
PARTIE 2.....	303
ANALYSE TECHNIQUE-ÉCONOMIQUE DU PROCÉDÉ DE PRODUCTION DES ENZYMES LIGNINOLYTIQUES PAR FERMENTATION DE DÉCHETS SOLIDES DE JUS DE POMME (APPLE POMACE).....	303
1. DESCRIPTION DES SCÉNARIOS DE SIMULATION EMPLOYÉS POUR L'ANALYSE TECHNIQUEÉCONOMIQUE DE LA PRODUCTION DES ENZYMES LIGNINOLYTIQUES.....	305

2. DIMENSIONNEMENT DES ÉQUIPEMENTS	307
3. COÛTS EN CAPITALS	308
3. 1 LES COÛTS DIRECTS	309
3. 2 LES COÛTS INDIRECTS	311
3. 3 FRAIS DE GESTION DE CONSTRUCTION ET FRAIS CONTINGENTS	312
4. COÛTS DE PRODUCTION	314
4.1. LA CONSOMMATION DE PRODUITS CHIMIQUES NÉCESSAIRES	314
4. 2 ESTIMATION DES COÛTS LIÉS À LA PRODUCTION	315
RÉFÉRENCES	320
ANNEXE 1	321
ANNEXE 2	323
ANNEXE 3	329
ANNEXE 4	330

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. 1 Microorganismes utilisés dans la production des enzymes par fermentation à l'état solide	9
Tableau 1. 2 Gènes reliés à la biodégradation de la lignine chez <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (source Martinez <i>et al.</i> 2004).....	21
Tableau 1. 3 Substrats utilisés pour la production des enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide	23
Tableau 2. 1 Elimination du BPA des eaux usées par les WRF et leurs enzymes lignolytiques.	88
Table 3. 1 Physical-chemical characteristics of wastes	120
Table 3. 2 Effect of inducer on MnP, LiP and laccase production	121
Table 3. 3 Effect of extraction methods and buffer pH on peroxidase and laccase recovery....	122
Table 4. 1 Experimental range of the three variables studied using CCD in terms of actual and coded factors	144
Table 4. 2 Results of experimental plan by central composite design for pomace and brewery waste, shaded cells represent maximum value	145
Table 4. 3 Model coefficients estimated by central composite design and best selected prediction models; Where, M is Moisture, V A is Veratryl alcohol and CS is Copper sulfate	146
Table 5. 1 Results of experimental plan by Box-Behnken design for acidolysis of apple pomace waste using microwave, shaded cells represent maximum value	165
Table 5. 2 Model coefficients estimated by Box-Behnken design and best selected prediction models; where, X_1 is temperature, X_2 is pressure and X_3 is time	166
Table 6. 1 pH and moisture content variations during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration; \pm represents standard error calculated using triplicate sets	193
Table 7. 1 Physico-chemical composition of apple pomace sludge	217
Table 8. 1 Color and clarity studies during juice treatment by different ligninolytic enzymes formulations	242
Table 10. 1 GHG emission coefficients related to the combustion of fuels by semi-trailers.....	295
Table 10. 2 Feed rations of cattle and carbon and nitrogen contributions of different nutrients	296
Table 10. 3 Coefficients of emissions of CH_4 for enteric fermentation – for bovine cattle from 1990 to 2006 (adopted from Boadi <i>et al.</i> , 2004).....	297
Table 10. 4 GHG emissions during different scenarios of apple pomace management	298
Tableau 11. 1 Paramètres d'opération de base.....	305
Tableau 11. 2 Les simplifications utilisées dans les différents Scénarios	306
Tableau 11. 3 Dimensionnement du fermenteur et de la centrifugeuse, utilisés dans les quatre scénarios.....	308
Tableau 11. 4 Estimation du capital total par année d'une entreprise produisant des enzyme par fermentation à l'etat solide : Facteurs de Lang (Castilho <i>et al.</i> , 2000).....	310
Tableau 11. 5 Coûts d'acquisition des différents équipements	311
Tableau 11. 6 Coûts en Capitaux	313

Tableau 11. 7 Consommation des produits chimiques	315
Tableau 11. 8 Facteurs utilisés pour l'estimation des coûts de production.....	316
Tableau 11. 9 Coûts de production totaux des enzymes ligninolytiques	317
Table A. 1. 1 Viability of <i>P. chrysosporium</i> cultivated on wastes (Pomace, brewery waste, fishery waste, pulp and paper industry sludge: P A P), inducer (copper sulphate, 3 mM). Viability was determined using MPN method.....	321
Table A. 1. 2 Viability of <i>P. chrysosporium</i> cultivated wastes (Pomace, brewery waste, fishery waste, pulp and paper industry sludge: P A P), inducer (veratryl alcohol, 2 mM). Viability was determined using MPN method.....	321
Table A. 1. 3 Viability of <i>P. chrysosporium</i> cultivated on wastes (Pomace, brewery waste, fishery waste, pulp and paper industry sludge: P A P), without inducer. Viability was determined using MPN method.....	322
Table A. 2. 1 MnP production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration	323
Table A. 2. 2 LiP production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration	325
Table A. 2. 3 Laccase production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration	327
Table A. 3. 1 Ligninolytic enzymes production during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium. Values are expressed as means of three replicates \pm standard deviations.....	329
Table A. 3. 2 Particle size analysis during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium.....	329
Table A. 4. 1 Thermal stability of MnP inside different hydrogelformulations	330
Table A. 4. 2 Thermal stability of LiP inside different hydrogelformulations	330
Table A. 4. 3 Thermal stability of laccase inside different hydrogelformulations.....	331
Table A. 4. 4 Polyphenol reduction during juice treatment by different ligninolytic enzymes formulations	331
Table A. 4. 5 Particle size analysis during juice treatment by different ligninolytic enzymes formulations	331

LISTE DES FIGURES

Figure 1. 1 Processus de fermentation solide.....	3
Figure 1. 2 Mécanisme d'action des enzymes.....	6
Figure 1. 3 Rôle des enzymes dans la diminution de l'énergie d'activation des réactions chimiques.....	6
Figure 1. 4 Application des enzymes.....	7
Figure 1. 5 Cycle catalytique général des peroxydases (Wesenberg <i>et al.</i> , 2003).....	11
Figure 1. 6 Voie d'oxydation du BPA par la laccase (Huang et Weber, 2005).....	14
Figure 2. 1 Voie de dégradation du BPA par <i>Sphingomonas paucimobilis</i> FJ-4 (données tirées de Ike et al. 2000).....	91
Figure 2. 2 Voie de dégradation du BPA par <i>Sphingomonas sp.</i> strain AO1 (données tirées de Sasaki et al. 2005).....	92
Figure 2. 3 Voie de dégradation du BPA par <i>Sphingomonas sp.</i> strain BP7 (données tirées de Sakai et al. 2007).....	93
Figure 2. 4 Voie de dégradation du BPA par la souche Mv1 (données tirées de Spivack et al. 1994).....	94
Figure 2. 5 Voie de dégradation du BPA par <i>Achromobacter xylosoxidans</i> B-16 (données tirées de Zhang et al. 2007).....	95
Figure 2. 6 Voie de dégradation de BPA par <i>Pleurotus ostreatus</i> O-48 (données tirées de Hirano et al. 2000).....	96
Figure 2. 7 Cycle catalytique général des peroxydases (modifié de Wesenberg et al. 2003).....	97
Figure 2. 8 Voie d'oxydation du BPA par la laccase (modifié de Huang et Weber, 2005).....	98
Figure 2. 9 Voie de dégradation de BPA par une peroxydase bactérienne (données tirées de Sakurai et al. 2001).....	99
Figure 2. 10 Voie de dégradation de BPA par la peroxydase de raifort (HRP) (données tirées de Sakuyama et al. 2003).....	100
Figure 3. 1 Viability of <i>P. chrysosporium</i> cultivated on wastes (Pomace, brewery waste, fishery waste, pulp and paper industry sludge: P A P), without inducer. Viability was determined using MPN method.....	123
Figure 3. 2 Viability of <i>P. chrysosporium</i> cultivated on wastes (Pomace, brewery waste, fishery waste, pulp and paper industry sludge: P A P), inducer (copper sulphate, 3 mM). Viability was determined using MPN method.....	124
Figure 3. 3 Viability of <i>P. chrysosporium</i> cultivated wastes (Pomace, brewery waste, fishery waste, pulp and paper industry sludge: P A P), inducer (veratryl alcohol, 2 mM). Viability was determined using MPN method.....	125
Figure 4. 1 Response surface of MnP production obtained by varying: concentration of copper sulfate (X_3) and the concentration of veratryl alcohol (X_2) and keeping the moisture (X_1) constant= 70% (w/w) a) : case of brewery waste; b) apple pomace;.....	147

Figure 4. 2 Response surface of LiP production obtained by varying: moisture (X_1) and the concentration of veratryl alcohol (X_2) and keeping the concentration of copper sulfate (X_3) constant= 1 mmol/kg a) case of brewery waste); b) apple pomace.	148
Figure 4. 3 Response surface of laccase production obtained by varying: moisture (X_1) and the concentration of copper sulfate (X_3) and keeping the concentration of veratryl alcohol (X_2) constant = 2 mmol/kg a) case of brewery waste); b) apple pomace.....	149
Figure 4. 4 Response surface of Log10 viability obtained by varying: moisture (X_1) and the concentration of veratryl alcohol (X_2) keeping the concentration of copper sulfate (X_3) constant =1 mmol/kg a) case of brewery waste); b) apple pomace.....	150
Figure 5. 1 Parity plot showing the distribution of experimental vs. predicted values of lignin content in apple pomace waste	167
Figure 5. 2 Response surface of lignin content obtained by varying: a) Temperature (X_1) and pressure (X_2), keeping time (X_3) constant.....	168
Figure 5. 3 Response surface of lignin content obtained by varying: a) pressure (X_2) and time (X_3) keeping temperature (X_1) constant	169
Figure 6. 1 LiP production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration.....	194
Figure 6. 2 MnP production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration	195
Figure 6. 3 Laccase production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration	196
Figure 6. 4 Liberation of total polyphenolic compounds production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of aeration and agitation	197
Figure 6. 5 <i>Phanerocheate chrysosporium</i> viability during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration.....	198
Figure 6. 6 Water activity variation during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration.....	199
Figure 7. 1 Ligninolytic enzymes production during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium. Values are expressed as means of three replicates \pm standard deviations.....	218
Figure 7. 2 Viability of <i>Phanerochete chrysosporium</i> during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium.	219
Figure 7. 3 Physicochemical properties of liquid medium during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium	221
Figure 7. 4a Total polyphenolic content of acetone and ethanol extracts of apple sludge during liquid fermentation. Values are expressed as means of three replicates \pm standard deviations.	222
Figure 7. 4a IC 50 value for free radical scavenging activity of acetone and ethanol extracts of apple sludge during liquid fermentation. Values are expressed as means of three replicates \pm standard deviations.	222
Figure 8. 1 Thermal stability of MnP inside different hydrogelformulations	243
Figure 8. 2 Thermal stability of LiP inside different hydrogel formulations.....	244

Figure 8. 3 Thermal stability of laccase inside different hydrogel formulations.....	245
Figure 8. 4 Particle size analyses of the different hydrogel formulations.....	246
Figure 8. 5 Viscosity analyses of the different hydrogel formulations.....	247
Figure 8. 6 Zeta potential analyses of different hydrogel formulations	248
Figure 8. 7 Polyphenol reduction during juice treatment by different ligninolytic enzymes formulations	249
Figure 9. 2 Linweaver-Burk plots between rates, V and Bisphenol A concentrations, S using different treatments with free and encapsulated enzymes	267
Figure 9. 3 By-products of BPA degradation by ligninolytic enzymes	268
Figure 9. 4 Possible pathways of degradation of Bisphenol A	269
Figure 10. 1 Scenarios of apple pomace management.....	299
Figure 10. 2 Schematic for aerobic fermentation of apple pomace to produce enzymes: collection of CO ₂ as a GHG.....	300
Figure 10. 3 Net GHG emissions from various apple pomace waste management methods...	301
Figure 11. 1 Scénarios utilisés dans l'analyse technico-économique.....	307
Figure 11. 2 Diagramme de la participation des différents paramètres dans le coût de production des enzymes	318
Figure 11. 3 Coût de production de 1 MU d'enzymes ligninolytiques (\$) en utilisant différents scénarios.....	318



ABRÉVIATIONS

- 1-HBT:** 1-hydroxy-benzotriazole
- AAO:** alcool oxydase
- ABTS:** 2, 2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic)
- ATCC:** American Type Culture Collection
- Aw:** water activity
- BPA:** Bisphénol A
- C:** carbone
- DDT:** dichlorodiphényltrichloroéthane
- EDCs:** Endocrine Disrupting Chemicals
- GLOX:** glyoxal oxydase
- gss:** gramme de substrat solide
- HAPs:** hydrocarbures aromatiques polycycliques
- LiP:** Lignine peroxydase
- MnP:** Maganese peroxydase
- PEG:** polyéthylène glycol
- TEMPO:** 2,2,6,6-tetraméthoxypiperidine 1-oxyl
- UF:** ultrafiltration
- VA:** veraryl alcool
- VLA:** l'acide violuric
- WRF:** white-rot fungi
- COD:** Chemical oxygen demand
- BOD:** Biochemical oxygen demand
- PDA:** Potato dextrose agar
- SSF:** Solid state fermentation
- MPN:** Most probable number
- OD:** Optical density
- Gel:** gelatine
- Pec:** pectine
- CMC:** carboxymethyl cellulose
- P(AAm)/ Gel:** polyacrylamide/ gélatine
- P(AAm)/ Pec:** polyacrylamide/ pectine
- P(AAm)/ CMC:** polyacrylamide/ carboxymethyl cellulose

GES: gaz à effet de serre

Unités

kDa: Kilo Dalton

mPa.s: milli pascal. Seconde

mV: millivolt

p/p: poids / poids

rpm: rotation par minute

UFC: unité formant colonie

v/p: volume/ poids

v/v: volume/ volume

U: unité d'activité enzymatique

VVM: Volume per Volume per Minute

gds: Gram dry substrate;

U/gds: Units per gram dry substrate;

gdw: Gram dry weight

U/ml: Units per mL of medium

INTRODUCTION

Le traitement des substances toxiques (perturbateurs endocriniens) par des enzymes possède plusieurs avantages à savoir leur grande spécificité aux substrats, leur utilisation sur une large gamme de conditions environnementales, leur simplicité et la facilité de contrôle des procédés utilisant des enzymes (Ahuja *et al.*, 2004; Gianfreda et Rao, 2004; Mao *et al.*, 2011). En revanche, les procédés de remédiation moyennant les enzymes possèdent quelques limitations à savoir le coût élevé de production et de purification des enzymes et la faible stabilité de ces catalyseurs (Aitken et Heck., 1998). Le coût de production élevé des enzymes est dû au coût élevé du milieu de culture utilisé pour les produire (40-60 % du coût de production).

Il est désormais admis que la fermentation à l'état solide (SSF) est le processus le plus économique pour la production d'enzymes ligninolytiques par des champignons (Iwashita *et al.*, 2002). Les champignons de pourriture blanche de bois sont les producteurs d'enzymes ligninolytiques les plus robustes, qui sont primordiaux pour la dégradation des composés organiques toxiques (Gianfreda et Rao., 2004 ; Lee *et al.*, 2005). *Phanerochaete chrysosporium* est l'un parmi les champignons de pourriture blanche de bois les plus étudiés, qui produit surtout la manganèse peroxydase et la lignine peroxydase (Ashoka *et al.*, 2000).

Le bisphénol A (BPA) est l'un des contaminants émergents qui doit être éliminé des eaux usées. Il est employé dans la fabrication des résines époxydes et des plastiques. Il est produit à grande échelle et ses utilisations sont répandues au Canada. Le BPA est également un perturbateur endocrinien et les études ont confirmé son estrogenicité et ses effets sur le comportement reproductif des animaux et des êtres humains. Ce composé indésirable est libéré, consciemment ou inconsciemment, dans le milieu aquatique, ce qui affecte la faune. Différentes méthodes d'élimination de ce perturbateur endocrinien sont possibles à savoir les méthodes physicochimiques qui utilisent des substances chimiques (ozone, chlore, fer...) ou des forces physiques (UV, filtration...) et les méthodes microbiologiques (microorganismes). Toutefois, de nouvelles stratégies de bioremédiation basées sur la catalyse par des enzymes ligninolytiques ont été développées ces dernières années pour le traitement de matrices environnementales (eau, sol, boues) contaminées par différents substances chimiques toxiques (colorants, hydrocarbures aromatiques polycycliques, explosifs, perturbateurs endocriniens comme BPA).

Dans cette perspective, ce projet de recherche vise à l'utilisation des déchets comme matière première pour la production d'enzymes. Les déchets agro-industriels ont été choisis comme

milieu de croissance en raison de leur omniprésence, leur biodégradabilité élevée et leur richesse en carbone.

Par conséquent, notre projet de recherche proposé adresse quatre thèmes : a) production économique des enzymes dans des cultures solides de *Phanerocheate chrysosporium* ; b) gestion soutenable des déchets agroindustrielles, engendrant moins de pollution de l'environnement ; c) Extraction et formulation des enzymes ligninolytiques. Normalement, les enzymes produites sont purifiées et utilisées pour la remédiation et pour d'autres buts. D'ailleurs, la technologie proposée dans notre projet de recherche traitera de la production d'un cocktail d'enzymes (brutes) en se basant sur une fermentation à l'état solide. Ce cocktail est extrait puis encapsulé dans des formulations stables pour diverses applications. Par conséquent, le coût d'enzymes sera sensiblement réduit ; d) application de l'extrait enzymatique et des enzymes formulées dans la dégradation des contaminants émergents comme le BPA et la clarification des jus de fruits.

CHAPITRE I
SYNTHÈSE



PARTIE 1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Fermentation en milieu solide

1.1.1. Définition

La fermentation en milieu solide correspond à la croissance de microorganismes aérobies ou anaérobies sur des particules solides humides en l'absence ou la quasi-absence d'eau libre (Durand, 2003 ; Gervais *et al.* 2003 ; Rahardjo *et al.* 2006). Ces microorganismes croissent sur une matrice solide à laquelle est liée une phase liquide et une phase gazeuse est piégée dans ces particules ou entre elles (Rahardjo *et al.* 2006). La plupart des procédés de fermentation en milieu solide implique des champignons filamenteux. Néanmoins, il existe quelques procédés qui intègrent les bactéries et les levures. La fermentation en milieu solide peut impliquer une culture pure d'organismes, où la culture de plusieurs souches inoculées simultanément ou successivement. Le processus de fermentation en milieu solide est présenté dans la Figure 1. 1.

Les substrats utilisés dans les processus de SSF sont souvent des produits ou sous-produits de l'agriculture, de la foresterie ou de la transformation alimentaire. Typiquement, la source d'éléments nutritifs est au sein de la particule, bien qu'il existe quelques cas dans lesquels les éléments nutritifs sont fournis par une source externe. Habituellement, un polymère permettant d'obtenir la structure solide ne peut pas être dégradée par les micro-organismes pendant la fermentation. Il existe également quelques cas dans lesquels des supports artificiels ou inertes sont utilisés, avec une solution nutritive absorbée dans la matrice.

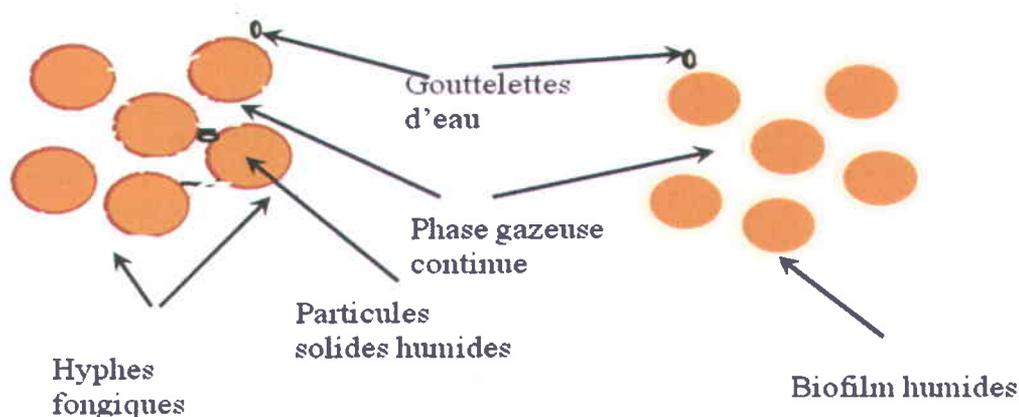


Figure 1. 1 Processus de fermentation solide

1.1.2. Application de la fermentation en milieu solide

Généralement, les applications de la fermentation solide se concentrent sur l'alimentation humaine (fromages, production de champignons comestibles, choucroute et saucissons secs), le compostage et l'ensilage, la bio-filtration de gaz malodorants, la production d'aliments riches

en protéines pour l'alimentation animale, la production d'enzymes (amylases, cellulases, xylanases, etc.) et de métabolites spécifiques (éthanol, acides organique, citrique, etc.).

Les travaux actuels sur SSF se focalisent sur l'application de ces procédés dans le développement de bioprocédés à savoir la bioremediation, la biodégradation des composants toxiques, la détoxification biologique des résidus agroindustriels, la biopulpage et la production de produits à haute valeur ajoutée. Ces derniers se composent, à titre indicatif, de métabolites secondaires biologiquement actives incluant les antibiotiques, d'alcaloïdes, biofertilisants, d'enzymes, d'acides organiques, de biopesticides incluant mycopesticides et de bioherbicides, biosurfactants, biocarburant, composants aromatiques,..., etc. Durant les décennies précédentes, les systèmes SSF ont été utilisés pour la production de produits à valeur ajoutée à faible volume et à coût élevé comme les biopharmaceutiques. Les procédés de SSF offrent des avantages potentiels dans la bioremédiation et la détoxification biologique des composants dangereux et toxiques.

1.1.3. Avantages de la fermentation à l'état solide

L'utilisation des procédés de fermentation à l'état solide possède plusieurs avantages. En effet, ces derniers sont des procédés simples qui ont recours à des technologies simples. Ils ne demandent pas des équipements sophistiqués et chers pour contrôler les paramètres environnementaux. De plus, les produits de la fermentation en culture solide sont la plupart du temps concentrés, ce qui facilite leur purification. En outre, la faible humidité du milieu et le grand volume utilisés en SSF réduisent la possibilité de contamination par d'autres microorganismes. Cependant, la majorité des bactéries demandent des taux d'humidité élevés pour survivre. De plus, lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides, il n'y a pas de production de mousses en plus que les volumes des déchets générés sont faibles. Les enzymes produits lors d'une fermentation solide sont moins sensibles aux répressions cataboliques et aux inductions (Singhania *et al*, 2009).

Les avantages de la fermentation en culture solide encouragent le recours à ce procédé pour produire des métabolites à haute valeur ajoutée. Par contre, ce type de culture possède quelques limitations à considérer, en essayant de les minimiser au maximum possible.

1.1.4. Inconvénients de la fermentation solide

Bien que la fermentation solide possède plusieurs avantages, ce procédé souffre de quelques limitations. En effet, la fermentation en milieu solide ne peut être effectuée que par un nombre limité de microorganismes, lesquels peuvent se développer facilement à des basses activités

d'eau et d'humidité. De plus, dans un milieu solide, le transfert d'oxygène et de chaleur sont limités, ce qui rend difficile les procédés de cette fermentation à grande échelle. Le transfert de chaleur est ralenti par la faible quantité d'eau disponible dans le milieu, ce qui provoque des problèmes de surchauffe lorsque la fermentation est réalisée à grande échelle. Cette surchauffe provoque l'évaporation de l'eau disponible dans le milieu, limitant ainsi l'utilisation de la fermentation en culture solide à grande échelle. Entre autres, la production de forte concentration de produits par la fermentation en culture solide peut être accompagnée par la production de substances inhibitrices aux microorganismes. Parmi les inconvénients de la SSF, on peut aussi soulever la difficulté de l'estimation de la biomasse et de la croissance des microorganismes, qui sont fortement fixés aux substrats. En outre, contrairement à la fermentation liquide, les paramètres de la fermentation solide ne sont pas suivis directement. Ceci est dû à l'absence de sondes adaptées au suivi direct des paramètres de fermentation solide. Il est pratiquement difficile d'assurer une distribution parfaitement homogène de substances ajoutées au milieu de culture. Ceci rend plus difficile le contrôle en ligne des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et les concentrations des nutriments.

1.2. Les enzymes

1.2.1. Définition des enzymes

Les enzymes sont des protéines catalysant une réaction biochimique, ayant de forts poids moléculaires (10000 à 100000 Dalton). Les enzymes ont pour fonction d'accélérer (catalyser) les réactions chimiques dans les organismes vivants. Ainsi, les enzymes catalysent des réactions biochimiques hautement spécifiques tout en abaissant leur énergie d'activation (Figure 1. 3). Lors d'une réaction enzymatique, le substrat se fixe sur le site catalytique de l'enzyme formant ainsi le complexe enzyme-substrat à l'état de transition (Figure 1. 2). Ce complexe pourra, par la suite, se décomposer pour former les produits. Il existe plus de 3 000 enzymes connues. Ces enzymes sont produites soit chez les végétaux (fèves, soja, pomme de terre, ananas, papaye, ..., etc.) soit par des cellules animales (organes internes, blanc d'œuf, ..., etc.) et soit par des microorganismes (levures, bactéries, moisissures). Il y a six classes d'enzymes : les oxydoréductases (oxydation du substrat), les transférases (transfert d'un groupe (e.g. méthyl ou glycosyl d'un composé à un autre), les hydrolases (coupure hydrolytiques de liaisons C-O, C-C ou C-N), les lyases (coupure de liaisons C-O, C-C ou C-N avec formation d'une double liaison), les isomérases (modification intramoléculaire de la structure ou de la géométrie) et les ligases (formation de liaisons C-C, C-N ou C-O).

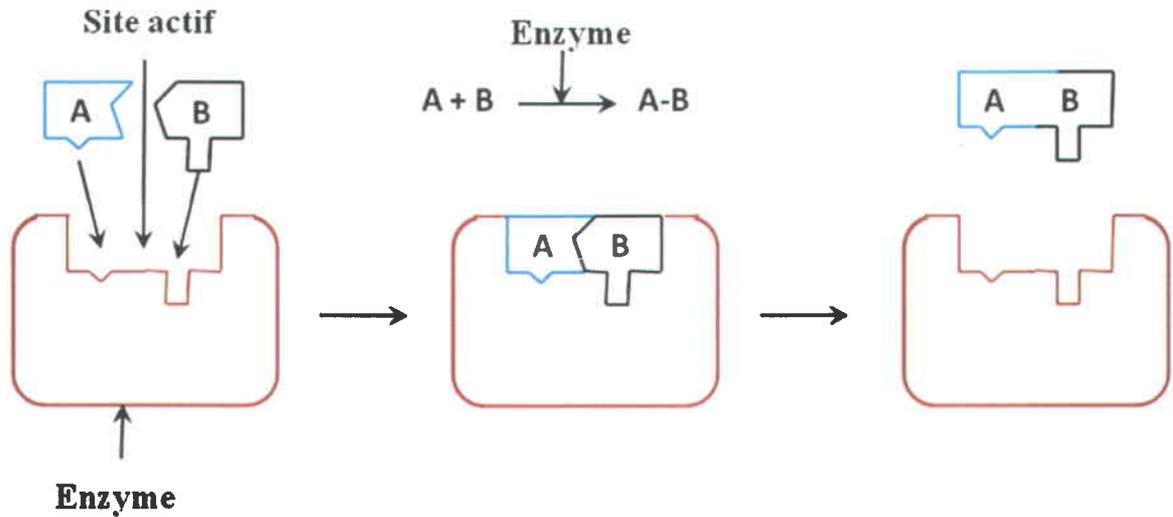


Figure 1. 2 Mécanisme d'action des enzymes

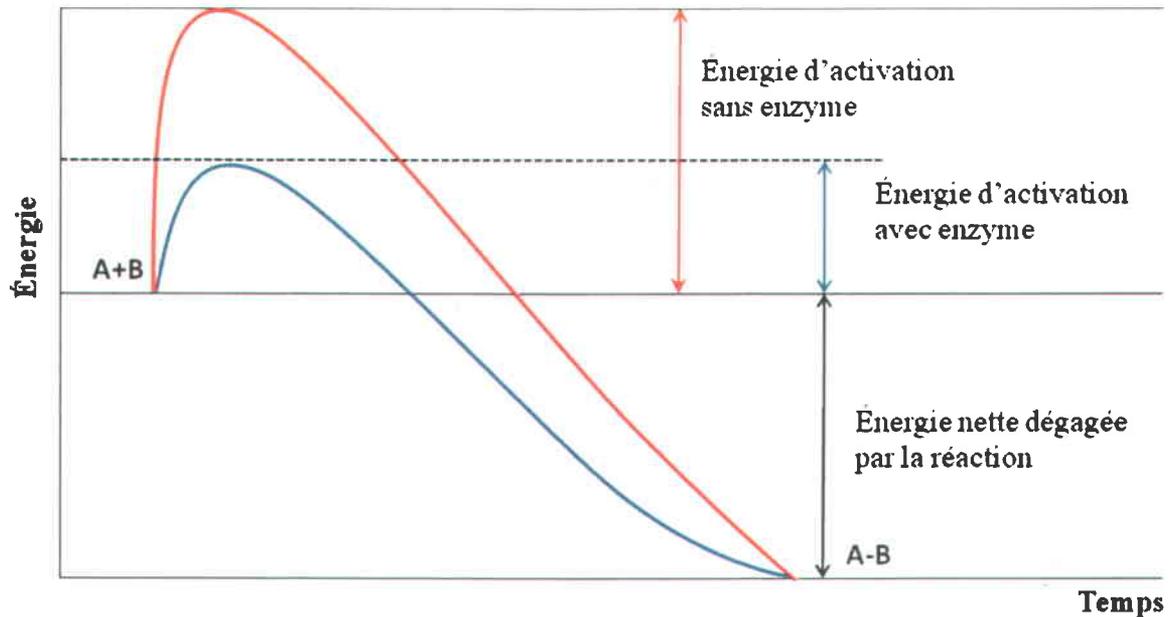


Figure 1. 3 Rôle des enzymes dans la diminution de l'énergie d'activation des réactions chimiques

1.2.2. Application des enzymes

Environ 200 enzymes sont commercialisées dans le marché. Les principales entreprises productrices d'enzymes dans le monde sont Novozyme, Danisco, Mano. Parmi les 200 enzymes commercialisées, 130 sont utilisées dans des procédés industriels, dont moins de 30 représentent plus de 90 %. Il existe un grand nombre d'enzymes spécifiques qui joue un rôle important dans les processus physiologiques (digestion, conduction nerveuse, synthèse d'hormones, etc.), ainsi que dans plusieurs processus industriels à savoir ; l'industrie

agroalimentaire (jus, lait, paille, plats cuisinés..), l'industrie pharmaceutiques (antibiotiques, vitamines...), les industries de nettoyage (traitement d'eau, détergents, lessives).

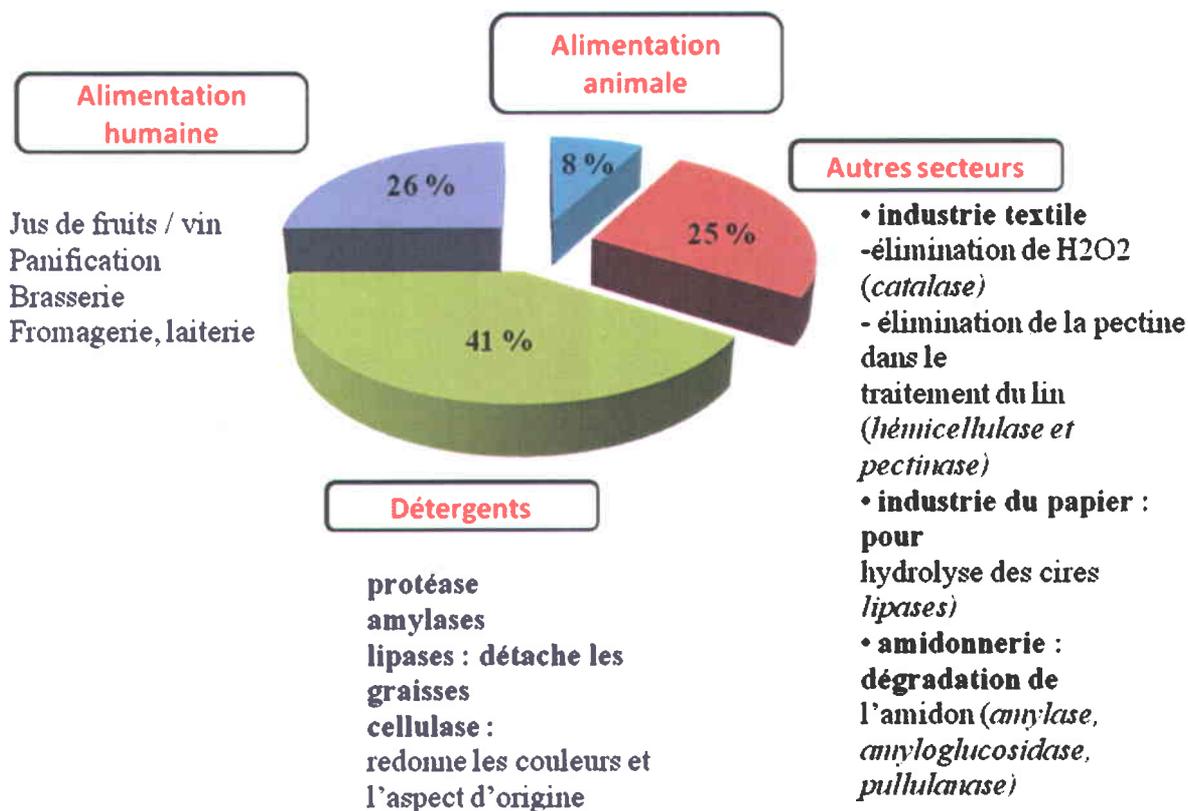


Figure 1. 4 Application des enzymes

1.2.3. Les enzymes ligninolytiques

La lignine est une molécule hydrophobe qui se trouve chez toutes les plantes vasculaires. Elle représente la deuxième plus grande source de carbone sur terre après la cellulose. La lignine est extrêmement récalcitrante à la dégradation à cause de sa structure très complexe et très stable, ce qui est dû en partie à ses cycles benzéniques, et sert à la résistance mécanique du matériau. Ce composé est le résultat d'une polymérisation de monolignols (monomère de lignine). Il existe trois monomères de lignine, qui sont des alcools : alcool coumarylique, alcool coniférylique et l'alcool sinapylique. Ces monomères peuvent être oxydés pour former des radicaux, se coupler par la suite et former des lignines très variées. Rappelons qu'on ne peut pas définir une composition exacte, car elle est extrêmement hétérogène (Burton *et al.*, 2010). La lignine assure la liaison entre les molécules de cellulose (Burton *et al.*, 2010), ainsi qu'elle joue un rôle de protection. En effet, les celluloses et hémicelluloses, composées de sucres, sont

très attractives pour les champignons et les insectes. En réalité, la lignine est beaucoup plus difficile à biodégrader par les microorganismes. Toutefois, il existe en fait certains champignons qui sont capables de dégrader la lignine, tels que les champignons de la pourriture blanche du bois.

Les champignons de la pourriture blanche de bois (White rot fungi WRF) sont des basidiomycètes capables de dégrader efficacement la lignine et la cellulose contenus dans le bois (Kirk *et al.*, 1976). Ces deux molécules sont les composants principaux du bois ayant une structure très complexe et, par conséquent, difficile à dégrader. Plusieurs souches de champignons de la pourriture blanche du bois produisent les enzymes ligninolytiques (Tableau 1. 1). Contrairement aux champignons de pourriture brune qui attaquent principalement la cellulose et ne dégradent pas la lignine, les champignons de la pourriture blanche dégradent la lignine en produisant 4 enzymes extracellulaires : lignine peroxydase (LiP), manganese peroxydase (MnP), Versatile peroxydase (VP) et laccase. Ces enzymes sont toutefois appelés ligninolytiques, leur activité est accélérée par d'autres enzymes accessoires à savoir glyoxal oxidase (EC 1.2.3.5), aryl alcohol oxidase (veratryl alcohol oxidase; EC 1.1.3.7), pyranose 2-oxidase (glucose 1-oxidase; EC 1.1.3.4), cellobiose/quinone oxidoreductase (EC 1.1.5.1), et cellobiose dehydrogenase (EC 1.1.99.18) (Martinez *et al.* 2005; Kersten et Cullen, 2007).

Les enzymes ligninolytiques sont capables de dégrader la lignine (une molécule très complexe et très difficile à dégrader). Ceci leur permettent de dégrader une large catégorie de contaminants émergents, dont leur élimination pose un problème dans les eaux usées notamment les perturbateurs endocriniens comme Bisphénol A.

Tableau 1. 1 Microorganismes utilisés dans la production des enzymes par fermentation à l'état solide

Classification	Microorganisme	Enzyme	Références
Champignons basidiomycètes	<i>Fomes sclerodermeus</i>	Laccase, MnP	Papinutti et Forchiassin, 2007
	<i>P. pulmonarius</i>	Laccase	D'Souza <i>et al.</i> , 2006
	<i>Phanerochaete Chrysosporuim</i>	MnP, LiP, laccase	Gassara <i>et al.</i> , 2010
	<i>Pleurotis Ostrestus</i>	Laccase, MnP	Liu <i>et al.</i> , 2009
	<i>Trametes versicolor</i>	Laccase MnP peroxydase	Couto <i>et Harrara</i> , 2006
	<i>phlebia radiata</i>	Laccase MnP peroxydase, LiP	Kaneko <i>et al.</i> , 2009
	<i>panus tigrinus</i>	Laccase MnP peroxydase, LiP	Fenice <i>et al.</i> , 2003
	<i>Trametes trogii</i>	Laccase endoxylanase Mn peroxydase	Levin <i>et al.</i> , 2008
	<i>Trametes hursita</i>	laccase	Rosales <i>et al.</i> , 2007
	<i>Trametes pubescens</i>	laccase	Osma <i>et al.</i> , 2007
<i>Bjerkandera sp.</i>	LiP, MnP	Mielgo <i>et al.</i> , 2003	
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	MnP, laccase, Beta-glucosidase, xylinase	Ferraz <i>et al.</i> , 2003	

La peroxydase

Une peroxydase est une enzyme de type oxydase qui catalyse l'oxydation des composés phénoliques aux dépens du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les peroxydases sont des enzymes contenant un groupement prosthétique composé de protoporphyrine uni à un atome de fer

(hème). Elles sont responsables de l'oxydation de nombreux substrats et utilisent le peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'électron. La figure 1. 5 présente le cycle catalytique général de ces peroxydases. Cette enzyme est largement produite chez les plantes, les microorganismes et les animaux (Duarte-Vasquez *et al.* 2003). Les peroxydases sont classées en deux superfamilles, enzymes animales et végétales, ayant un poids moléculaire variant de 30 à 150 kDa (Regalado *et al.* 2004). La superfamille des peroxydases végétales est divisée en trois classes selon leurs origines. La classe I correspondant aux peroxydases intracellulaires est constituée des peroxydases de cytochrome C produites par les levures, la catalase bactérienne, l'ascorbate peroxydase (Passardi *et al.* 2007). La classe II correspondant aux peroxydases fongiques est constituée de ligninase ou lignine peroxydase LiP et manganèse peroxydase MnP. Ces deux peroxydases sont des glycoprotéines monomériques impliqués dans la dégradation de la lignine. Ces deux enzymes sont les seules peroxydases produites dans ce projet doctoral. La classe III correspondant aux peroxydases végétales joue plusieurs rôles à savoir l'élimination de H₂O₂ des chloroplastes et des cytosols, l'oxydation des composants toxiques, la biosynthèse des parois des cellules des végétaux et la fabrication de la lignine. Les peroxydases les plus connues appartenant à cette classe sont la peroxydase de raifort (horseradish peroxydase HRP), la peroxydase du navet (turnip peroxidase TP), la peroxydase de la gourde amère (bitter gourd peroxydase BGP) et la peroxydase de soja (soybean peroxidase SBP). Ces peroxydases sont des glycoprotéines contenant quatre ponts de disulfure et nécessitent des ions de calcium pour leur activité (Schuller *et al.* 1996). Ces dernières années, de nombreuses recherches ont été réalisées pour développer des processus de traitement des eaux usées contaminés par des contaminants émergents, en se basant sur des peroxydases fongiques et bactériennes (Husain, 2006, Husain and Husain, 2008; Akhtar *et al.*, 2005a, b; Wesenberg *et al.*, 2003; Mohan *et al.*, 2005).

❖ Mécanisme d'action des peroxydases

La peroxydase sous sa forme originale, avec son hème sous la forme ferrique (Fe(III)), se lie au peroxyde d'hydrogène pour former le composé I. Ce dernier est appauvri de 2 électrons : l'un provenant formé avec un atome d'oxygène du peroxyde d'hydrogène. Cette disposition produit un composé radicalaire cationique. C'est le composé I qui est responsable de l'oxydation d'une molécule de substrat (ce substrat varie selon le type de la peroxydase). Cette étape oxydative implique le transfert d'un électron et d'un proton et résulte en un site catalytique ayant la forme du composé II. Une seconde molécule de substrat est par la suite oxydée, ce qui résulte en la production d'une molécule d'eau et la réduction de l'enzyme en sa forme originale (Figure 1. 5).

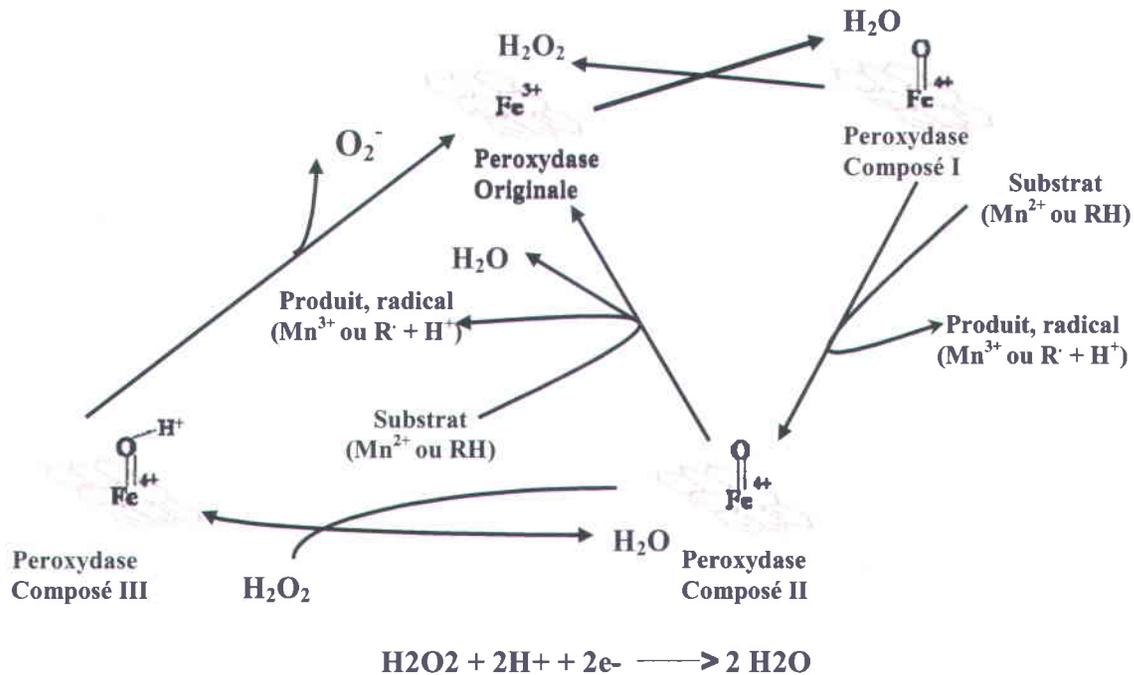


Figure 1. 5 Cycle catalytique général des peroxydases (Wesenberg *et al.*, 2003)

❖ La lignine peroxydase (LiP)

La lignine peroxydase (1,2-bis (3,4-dimethoxyphenyl) propane-1,3-diol:hydrogen- peroxide oxidoreductase) est une peroxydase N-glycolysée à Asn257 et O- glycolysée à Ser334 et Thr320 tous regroupés dans la partie supérieure du domaine proximal. Les chaînes glucidiques peuvent jouer un rôle dans la protection du peptide C-terminal de la protéolyse. Elle possède une masse moléculaire entre 38 et 47 kDa et un potentiel redox de l'ordre de +1450 mV (Wesenberg *et al.*, 2003). La LiP, connue comme ligninase ou diaryl propane oxygénase, était reportée pour la première fois en 1983. Cette enzyme a été découverte chez *Phanerocheate chrysosporium*, puis a été trouvée chez plusieurs autres champignons de pourriture blanche du bois.

✓ Application de la LiP

La LiP fait la dépolymérisation oxydative de la lignine dépendant du peroxyde d'hydrogène (Tien et Kirk, 1983; Hammel *et al.*, 1993). Cette enzyme catalyse aussi l'oxydation de nombreux composés aromatiques phénoliques et nonphénoliques en présence de H₂O₂ (Valli *et al.*, 1990). La réaction globale est représentée de la façon suivante : 1,2-bis (3,4-dimethoxyphenyl) propane-1,3-diol + H₂O₂ ⇌ 3,4 dimethoxybenzaldehyde+1-(3,4 dimethoxyphenyl) ethane- 1,2-diol + H₂O. La LiP est relativement non spécifique à ses substrats. Elle est capable de catalyser les réactions suivantes : l'oxydation de l'alcool benzylique, le clivage de chaînes latérales, l'ouverture de cycles aromatiques, la déméthoxylation et la déchlorination (Gold et Alic, 1993). La LiP a été utilisée dans des applications bio-environnementales pour la minéralisation de HAPs et de perturbateurs endocriniens (Mao *et al.*, 2011), les composants aromatiques recalcitrants (Maciel *et al.*, 2011) et les diphényles polychlorinés (Siripong *et al.*, 2009). L'activité enzymatique de LiP est conventionnellement mesurée en suivant l'augmentation de l'absorbance à 310 nm. Cette augmentation correspondant à l'oxydation du veratryl alcool en veratrylalcohol (VA; 3,4-dimethoxybenzyl alcohol), le substrat le plus favorable de LiP, en veratraldehyde.

❖ La manganese peroxydase (MnP)

La Manganese peroxidase (hydrogen-peroxide oxidoreductase, MnP) est la peroxydase la plus sécrétée par les champignons de la pourriture blanche du bois WRF (Hofrichter, 2002), ayant un poids moléculaire se situant entre 32 et 62.5 kDa et un potentiel redox typique de l'ordre de +1510 mV (Wesenberg *et al.* 2003). La première MnP extracellulaire a été purifiée à partir de *P. chrysosporium*, dont son expression et sa production sont régulées par la présence de Mn (II) dans le milieu de culture (Bonnamme et Jeffries, 1990). Le Mn(II) contrôle la transcription du gène de MnP (Brown *et al.* 1991). MnP est régulée aussi par le taux de transcription de son gène et la présence de H₂O₂ (Alic *et al.*, 1997). En plus de l'effet inducteur de Mn(II), les acides organiques à savoir glycolate, malonate, glucuronate, 2-hydroxybutyrate, ajoutés aux milieux, stimulent la production de MnP par les champignons de pourriture blanche du bois (Mester et Field, 1998).

✓ Application de MnP

MnP oxyde le Mn(II) en Mn(III) en présence de H₂O₂ $2\text{Mn(II)} + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{Mn(III)} + 2\text{H}_2\text{O}$ (Gold *et al.*, 2000 ; Hofricheter, 2002). Le Mn³⁺ est stabilisé par des acides organiques comme l'acide oxalique et le complexe acide organique- Mn³⁺ ainsi formé agit comme un oxydant puissant

(Shlosser and Hofer, 2002). Il peut se diffuser facilement dans la structure de la lignine et agir comme médiateur redox. Ainsi, cette enzyme est impliquée dans la dépolymérisation de la lignine et peut être utilisée pour l'oxydation de xénobiotiques tels que des chlorophénols, des colorants, des HAPs, des EDCs, etc. (Hofrichter, 2002; Wesenberg *et al.*, 2003 ; Tsutsumi *et al.*, 2001; Hirano *et al.*, 2000 ; Maciel *et al.*, 2010).

La laccase

Les laccases (benzenediol:oxygen oxidoreductase) sont des métalloprotéines contenant généralement 4 atomes de cuivre dans leur site catalytique. Ces atomes de cuivre sont caractérisés, entre autres, en fonction de leur action dans ce site. L'atome de cuivre de type 1 est responsable de la capture d'un électron provenant du substrat, l'atome de type 2 du transfert de cet électron vers son récepteur, tandis que les 2 atomes de type 3 sont responsables de la liaison de l'oxygène à la protéine et du transfert des électrons vers ce récepteur. La masse moléculaire de ces enzymes N-glycosylées varie entre 60 et 390 kDa (Call et Mucke, 1997) et leur potentiel redox entre +500 et +800 mV (Wesenberg *et al.* 2003). Ces enzymes catalysent l'oxydation d'une grande variété de composés aromatiques donneurs d'hydrogène avec la réduction simultanée de l'oxygène moléculaire en eau.

L'action de la laccase sur le substrat résulte en la formation de radicaux cationiques. Ces radicaux sont impliqués dans des réactions non-enzymatiques telles que la déprotonation, l'attaque nucléophile par les molécules d'eau du milieu, la formation d'oligomères, la rupture des liaisons C-C, l'oxydation du C, la déméthylation, la décarboxylation et la déméthoxylation (Call et Mucke, 1997). Cette enzyme est impliquée avec les peroxydases dans la biosynthèse de la lignine chez les plantes. Les laccases fongiques jouent ainsi un rôle dans la coloration des sopes de champignons, la détoxification des composés phénoliques produits durant la dégradation de la lignine et agissent de façon synergique avec les peroxydases et d'autres enzymes. Ces enzymes ont été utilisées pour l'élimination de nombreux xénobiotiques de différentes matrices environnementales. En ce sens, elles ont été utilisées pour éliminer des colorants (Wesenberg *et al.*, 2003), des HAPs (Pozdnyakova *et al.*, 2006), des chlorophénols (Bollag *et al.* 2003), des alkylphénols (Tsutsumi *et al.* 2001), des phénols (Ryan *et al.* 2007), etc. De plus, ces enzymes ont été utilisées pour des fins de production d'énergie, de blanchiment biologique (Couto et Herrera, 2006), de clarification de breuvages (Minussi *et al.*, 2002) et d'analyses (Couto et Herrera, 2006)

Les laccases possèdent des caractéristiques extrêmement variées selon les micro-organismes producteurs, et on dénombre plusieurs isoenzymes par micro-organisme, ayant des propriétés différentes. Un schéma du mécanisme d'action de la laccase avec un composé phénolique : Bisphénol A est présenté dans la figure 1. 6.

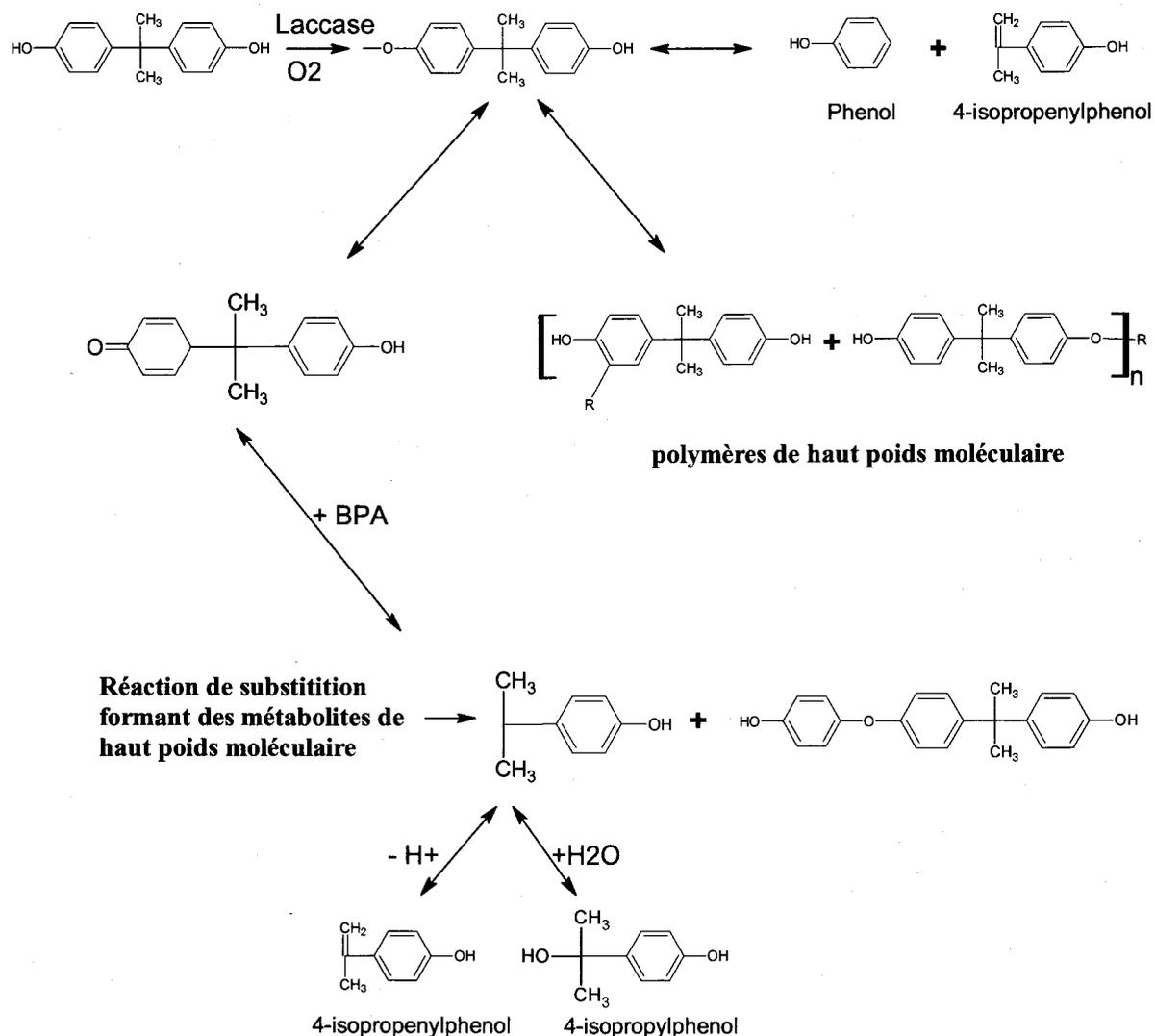


Figure 1. 6 Voie d'oxydation du BPA par la laccase (Huang et Weber, 2005)

Les enzymes ligninolytiques sont des biocatalyseurs très importants car ils sont capables de catalyser un nombre important de réactions et d'agir sur une large gamme de substrats, dont la dégradation peut poser un problème pour l'environnement. En revanche, ces enzymes sont peu stables et perdent leur activité très vite en présence du substrat. La stabilisation de ces enzymes s'avère très importante.

Stabilisation des enzymes ligninolytiques

Le problème le plus important dans l'application des enzymes ligninolytiques est la faible stabilité de ces derniers. Pour cela, plusieurs approches ont été employées pour augmenter la stabilité de la laccase et des peroxydases contre les effets d'inactivation et d'inhibition et pour améliorer l'activité biocatalytique de l'enzyme. Parmi les approches utilisées, on cite l'addition des produits chimiques stabilisants tels que le polyéthylène glycol (PEG), l'alcool polyvinylique, le Ficoll ou l'alkyl bétaïne (Kim et Nicell., 2006c ; Modaressi *et al.*, 2005). La deuxième approche, employée pour la stabilisation des enzymes, est l'addition des médiateurs. L'utilisation des substances oxydables de faible poids moléculaire (médiateurs) dans le cycle biocatalytique de la laccase augmente l'activité de cette enzyme. Cette oxydation implique deux étapes oxydantes. Dans un premier temps, la laccase oxyde le substrat primaire, le médiateur agit comme composé de transfert d'électron. Dans un deuxième temps, le médiateur transfère l'électron à partir de la substance d'intérêt. Ces médiateurs sont connus pour augmenter la gamme de substrat de la laccase (Bourbonnais et Paice, 1996). Les médiateurs : l'acide 2, 2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic) (ABTS), l'acide violuric (VLA), le 1-hydroxy-benzotriazole (1-HBT) et le 2,2,6,6-tetraméthoxypiperidine1-oxyl (TEMPO) augmentent et stabilisent l'activité des enzymes ligninolytiques (Tsutsumi *et al.* 2001 ; Suzuki *et al.*, 2003 ; Saito *et al.*, 2004; Junghanns *et al.*, 2005 ; Tamagawa *et al.*, 2006; Kim et Nicell, 2006a ; Kim et Nicell, 2006b ; Cabana *et al.*, 2007a).

Immobilisation enzymatique

L'immobilisation enzymatique est le processus par lequel des protéines sont confinées physiquement de façon synthétique dans une matrice quelconque afin d'assurer une catalyse continue. Cette immobilisation permet de générer des enzymes réutilisables. En outre, ce procédé permet d'augmenter la stabilité des protéines enzymatiques contre la désactivation et l'inhibition par les constituants de son milieu (solvants organiques, enzymes protéolytiques) (O'Fagain, 2003). De ces faits, l'immobilisation enzymatique s'avère avantageuse pour des applications bio-environnementales.

Diverses formes d'immobilisation sont possibles. Ces modes d'immobilisation peuvent être divisés en fonction du type des liens impliqués en deux groupes : physiques et chimiques.

❖ Immobilisation physique

L'immobilisation physique repose sur des procédés qui relient les enzymes à des supports, tout en faisant intervenir des forces physiques telles que les interactions électrostatiques, les forces de Van der Waals, les interactions protéines-protéines (résultant d'interactions électrostatiques, de Van der Waals, hydrophobes, entre ponts hydrogènes, etc.). De plus, le confinement des protéines dans des matrices définies par des procédés tels que le piégeage enzymatique, sont également des méthodes physiques d'immobilisation.

Les méthodes d'immobilisation physiques par piégeage et adsorption présentent quelques avantages qui se résument de la façon suivante : ces méthodes ne perturbent pas beaucoup la structure tridimensionnelle de la protéine et permettent la conservation des propriétés enzymatiques de l'enzyme libre (Zaborsky, 1974). En revanche, les enzymes immobilisées par des méthodes physiques sont moins stables que ceux immobilisées par des liaisons chimiques covalentes. C'est pour cette raison que l'immobilisation physique permet une régénération du support utilisé (Mateo *et al.*, 1999).

❖ Immobilisation chimique

L'immobilisation chimique repose sur la formation de liens covalents entre les protéines ou entre un groupement fonctionnel présent sur le support solide et les protéines. Les méthodes d'immobilisation chimique fournissent un attachement stable à l'enzyme et peuvent réduire le taux de désactivation et altérer favorablement les propriétés biocatalytiques de l'enzyme. Par contre, ces méthodes disposent de quelques lacunes. Premièrement, de telles liaisons covalentes peuvent aboutir à une diminution de l'affinité suite à une modification de la structure tridimensionnelle (Durante *et al.*, 2004). Deuxièmement, ce type d'immobilisation tend à réduire l'activité de l'enzyme. Ceci peut être expliqué par un problème de diffusion du substrat vers le site actif de l'enzyme, résultant de l'encombrement stérique provoqué par l'immobilisation.

L'immobilisation des enzymes sur des supports fixes constitue une solution efficace pour le problème de l'inhibition des enzymes et leur faible stabilité. Par contre, ce procédé peut être accompagné par certains problèmes à savoir : problèmes de diffusion au travers des gels, mauvaise tenue mécanique des gels, problèmes d'encombrement stérique (inclusion), problèmes stériques, mauvaise orientation de l'enzyme et perte d'activité (adsorption), modification de la structure de l'enzyme et perte d'activité, impossibilité de prévoir le rendement de greffage, supports présentant de mauvaises propriétés mécaniques (greffage, liaisons covalentes). De plus, l'immobilisation de l'enzyme nécessite l'ajout d'un support, ce qui augmente le prix de production de l'enzyme et rend difficile son utilisation. Pour cela, le recours

à d'autres techniques de stabilisation plus efficaces et moins coûteuses est souhaitable. La formulation des enzymes en nano-émulsion pourrait être une bonne solution à condition de minimiser le coût des additifs de formulation et de maximiser l'activité enzymatique.

1.2.4. Utilisation des enzymes dans la bioremédiation

De nouvelles stratégies de bioremédiation basées sur la catalyse enzymatique ont été développées ces dernières années pour le traitement de matrices environnementales (eau, sol, boues) contaminées par différents substances chimiques toxiques (colorants, HAP, explosifs, perturbateurs endocriniens). Plusieurs raisons peuvent expliquer le recours à ces stratégies dans le traitement de solutés contaminés par des substances toxiques comme le BPA :

- L'augmentation de l'utilisation de ces biocatalyseurs dans des procédés d'élimination de polluants organique de différentes concentrations (Karam et Nicell, 1997) ;
- La présence de plusieurs substances toxiques dans l'environnement qui peuvent avoir de nombreux effets écologiques et sanitaires néfastes. Ces substances nécessitent des méthodes rapides et efficaces d'élimination à moindre coût (Karam et Nicell, 1997) ;
- Les produits de dégradation issus des produits toxiques traités par les traitements conventionnels sont souvent plus toxiques que les produits initiaux. Pour cela, il faut chercher d'autres méthodes générant des produits de dégradation plus acceptables d'un point de vue environnementale (Couto et Herrera, 2006 ; Ahuja *et al.*, 2004).
- La création de techniques récentes de génie génétique permettant une production plus rapide et à moindre coût d'enzymes (Karam et Nicell, 1997) ;
- La spécificité de ces catalyseurs permettant de limiter la production de composés indésirables résultant de réactions parallèles et de procédés physico-chimiques traditionnels (Ahuja *et al.* 2004 ; Karam et Nicell, 1997) ;
- Le traitement par ces catalyseurs évite la pollution secondaire du milieu traité, car ces derniers sont biodégradables (Karam et Nicell, 1997).

Le traitement des substances toxiques (perturbateurs endocriniens) par des enzymes possède plusieurs avantages. En effet, ces protéines sont caractérisées par la spécificité aux substrats qu'elles peuvent utiliser, par leur fonction spécifique de catalyseur, par leur capacité d'être utilisées sur une large gamme de conditions environnementales (pH, température, salinité, concentrations, présence de composés toxiques), par leur faible sensibilité à la présence d'inhibiteurs et à la variation des conditions du milieu et par la simplicité et la facilité de contrôle des procédés utilisant des enzymes (Nannipieri et Bollag, 1991; Karam et Nicell, 1997; Ahuja *et*

al., 2004 ; Gianfreda et Rao, 2004). En revanche, l'utilisation de ces catalyseurs est limitée par différents éléments qui se résument du fait que les coûts associés à la production, l'isolement et la purification de ces enzymes limitent leur utilisation. Cependant, de nouvelles techniques de génie génétique ont été utilisées afin de sélectionner des microorganismes surproducteurs d'enzymes. De plus, de nouvelles technologies de purification ont été développées pour faciliter l'isolement et la purification des protéines enzymatiques. Toutes ces techniques ont permis de diminuer le coût de production des enzymes et de rendre leur utilisation plus facile.

Le traitement basé sur les enzymes est plus avantageux que celui basé sur les souches pures. En premier lieu, les enzymes sont douées d'une spécificité plus grande que celle des souches pures. En deuxième lieu, les enzymes sont plus faciles à manipuler que les souches pures. En troisième lieu, la concentration du catalyseur ne dépend pas de la concentration bactérienne (Aitken, 1993; Nicell *et al.*, 1995).

1.2.5. Utilisation des enzymes ligninolytiques dans la clarification des jus

Plusieurs fruits comme les grenades et les pommes contiennent de fortes quantités de composants phénoliques dans leur structure. La partie comestible du fruit contient des quantités considérables de composés phénoliques tels que l'acide gallique, l'acide protocatéchique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide férulique et les acides coumarique, la catéchine, la phloridzine et la quercétine (Poyrazoglu *et al.*, 2002). Les constituants phénoliques donnent de la couleur, l'astringence et l'amertume au jus de fruit (Neifar *et al.*, 2011). Ces composés sont également responsables de la formation de l'aspect trouble du jus de fruits, lors de la concentration et du stockage (Neifar *et al.*, 2011).

L'objectif principal de la clarification est de réduire la quantité des composés phénoliques et de diminuer l'astringence du produit (Alper et Acar, 2004.). L'ultrafiltration (UF) est la technique couramment utilisée pour stabiliser les jus de fruits (Siebert, 1999). L'inconvénient majeur de cette technique est que le jus ultrafiltré n'est pas toujours stable et tend à produire une brume causée par l'élimination de composés phénoliques réactifs par la membrane UF (Stutz 1993). Une technique de prétraitement enzymatique hyperoxygénation de jus brut par la laccase (p-diphénol-oxydoréductase, EC 1.10.3.2) avant l'UF a été introduite comme une alternative au traitement physicochimique (Giovanelli et Ravasini 1993 ; Maier *et al.*, 1994). La combinaison du processus de filtration membranaire et du processus enzymatique pourrait effectivement clarifier et stabiliser les jus de fruits (Stutz 1993). La clarification des jus de fruits par des enzymes purifiées (laccase) ou partiellement purifiées a été déjà étudiée (Maier *et al.*, 1994, Neifar *et al.*, 2011). Cependant, le traitement de clarification par un bouillon d'enzymes ligninolytiques n'a pas

été effectué auparavant. LiP, MnP et laccase sont trois enzymes capables de dégrader les composés phénoliques (Ryan *et al.*, 2007, Hofrichter, 2002). L'utilisation de l'extrait enzymatique de ces trois enzymes ligninolytiques pourrait être efficace dans la clarification des jus de fruits, notamment les jus de grenade et pomme.

1.3. Phanerochaete chrysosporium

1.3.1. Caractéristiques générales

Phanerochaete chrysosporium est un organisme eucaryote sans chlorophylle appartenant au règne des mycètes et à la division des basidiomycètes. Il s'agit d'un champignon de pourriture blanche de bois qu'on peut le trouver dans les forêts de l'Amérique du Nord, l'Europe et l'Asie (Budsall, 1985). Il produit différents spores asexuelles. Il y a différentes souches de *P chrysosporium* qui sont liées (BKM-F-1767 (ATCC 24725), PV1, AFTOL-ID 776, KCTC 6728 et 6293 et d'autres très différentes (*P chrysosporium IFM 47494 et IFM 47473*). La souche utilisée dans notre travail est BKM-F-1767 (ATCC 24725).

1.3.2. Métabolisme de Phanerochaete chrysosporium

Phanerochaete chrysosporium secrète des enzymes ligninolytiques à savoir la lignine peroxydase dont la synthèse est dépendante de la source de carbone, d'azote et de sulfure (Kirk, 1985 ; Hatakka, 1994), la manganèse peroxydase (Palma *et al.*, 1997) et oxydase multi-cuivre (Larrondo *et al.*, 2007). LiP et MnP sont les principaux enzymes constituant le système ligninolytique de *P chrysosporium*. En plus des enzymes ligninolytiques, *P chrysosporium* produit aussi plusieurs métabolites secondaires qui peuvent dégrader différents composés organiques (veratryl alcool, trichlophenol, pentachlorophenol, toluène, DDT, benzène, xylène, acide humique, pesticides, HAP) et plusieurs autres composants toxiques comme cyanide, azide, dioxines (Cameron *et al.*, 2000).

1.3.3. Les gènes de P chrysosporium responsables de la sécrétion des enzymes ligninolytiques

La structure du génome d'un organisme est fortement liée à sa physiologie et reflète l'ensemble de ces propriétés. Le génome de *P chrysosporium* a été étudié par plusieurs chercheurs (Larrondo *et al.*, 2007; Kersten et Cullen, 2007). D'après la banque génomique-v1.0, le génome de *P chrysosporium* contient 26 gènes reliés à l'activité de l'hème des peroxydases, gènes codant pour la production de LiP, 5 gènes pour MnP et six pour l'oxydase multi-cuivre (Martinez *et al.*, 2004). Il a été montré aussi que son génome contient 160 cytochrome P450s (Martinez *et al.*, 2004 ; Yadav *et al.*, 2006). Le génome montre aussi 4 aryl alcool oxydase (AAO) et une

pyranose oxydase et un glucose oxydase (Martinez *et al.*, 2004). Ce génome contient aussi un glyoxal oxydase (GLOX) qui catalyse la réaction d'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques couplée avec la réduction d'O₂ en H₂O₂. Durant la réaction, GLOX est activée par LiP qui a besoin de H₂O₂ pour son mécanisme d'action (Kersten *et al.*, 1995). Le génome de *P. chrysosporium* contient aussi 5 gènes reliés à la synthèse de catalase, et permet la dégradation de peroxyde d'hydrogène en cas de stress oxydatif relié à une hyper production de H₂O₂.

Phanerochaete chrysosporium possède 184 gènes responsables de la dégradation des xénobiotiques, ce qui encourage l'utilisation de ce microorganisme dans la dégradation des composés organiques. Les enzymes ligninolytiques contiennent une hème dont la biosynthèse est reliée à l'expression de 4 gènes de biosynthèse de ferrochelatase, δ- aminolevulinique acide déshydratase, protohème IX farnesyltransferase, δ- aminolevulinic acide synthase avec les annotations génétiques P.C. 61.39.1, P.C. 75.55.1, P.C. 6.34.1. Il ya 12 gènes responsables de l'activité du protohème IX farnesyltransférase. La production d'enzymes ligninolytiques par *P. chrysosporium* dépend de la présence d'oxygène dans le milieu. Il existe 2 gènes responsables du transfert d'oxygène. Après la production des enzymes ligninolytiques dans les cellules, le transfert des protéines natives vers le milieu extracellulaire est assuré par un transporteur ABC (ATP Binding cassette) codé par 58 gènes localisés dans le génome de *P. chrysosporium*. Les différents gènes reliés à la biodégradation de la lignine chez *P. chrysosporium* sont présentés dans le tableau 1. 2.

La connaissance du génome de *Phanerochaete chrysosporium* est très importante pour déchiffrer les différents catalyseurs produits par ce microorganisme. Cependant, la présence du gène de l'enzyme n'indique pas nécessairement la capacité du microorganisme à produire cette enzyme. L'expression du gène est primordiale pour la production de l'enzyme correspondante.

Tableau 1. 2 Gènes reliés à la biodégradation de la lignine chez *Phanerochaete chrysosporium* (source Martinez et al. 2004)

Fonction	Nombre de gènes
Activité des peroxydases à hème	26
Dégradation des xénobiotiques	184
Ferrochelatase	1
δ-Aminolevulinic acid dehydratase	1
Activité de protohème IX farnesyltransferase	12
δ-Aminolevulinic acid synthase	1
Activité d'isocitrate lyase	2
Activité d'alternative oxydase	1
Activité de transfert de gaz	2
Activité de catalase	5
Activité du transporteur ABC	58

1. 4. Les milieux de cultures utilisés pour la production des enzymes ligninolytiques par *Phanerochaete chrysosporium*

Pour produire une forte quantité d'enzymes ligninolytiques, *Phanerochaete chrysosporium* a besoin d'une source alternative de carbone et d'énergie dans son milieu de culture nécessaire à sa croissance et la production d'enzymes ligninolytiques (Tien 1985). Cependant, il est important de noter que la production des enzymes ligninolytiques se fait quand les cultures de *Phanerochaete chrysosporium* sont en métabolisme secondaires (limitation de carbone, d'azote et de soufre). Le pH, la température et l'agitation sont des facteurs importants qui régulent la production d'enzymes ligninolytiques. La présence de carbone, d'azote, d'acide organiques et l'oxygène dissous dans les milieux sont des facteurs critiques de la production d'enzymes. De plus, la production des enzymes ligninolytiques est influencée par la durée de production qui est un paramètre très important dans le processus de récupération des enzymes (Leisola et al., 1987).

1.4.1. Les sources de nutriments

Les conditions du milieu de culture *Phanerochaete chrysosporium* influencent la production des enzymes ligninolytiques. Plus les conditions de milieu sont optimisées, plus la production d'enzymes par l'organisme est élevée. Dans le même contexte, plusieurs recherches ont été réalisées pour optimiser les conditions de milieu de culture favorables à la production d'enzymes ligninolytiques par *Phanerochaete chrysosporium* (Dass *et al.*, 1995, Gassara *et al.*, 2011). D'après ces études, le glucose était la meilleure source de carbone, et le tartrate d'ammonium était la meilleure source d'azote permettant une production maximale d'enzymes. Cependant, le pH optimal était maintenu entre 4,2 et 6,2. D'autres études ont montré que la température optimale est entre 25 et 39°C, alors que l'agitation optimale était entre 0 et 30 rpm (Arora et Gill 2001; Khiyami *et al.*, 2006). La limitation des sources de carbone et d'azote est très importante pour la production d'enzymes ligninolytiques par *Phanerochaete chrysosporium*. Le maintien de faibles concentrations de carbone et d'azote accélère la sécrétion des enzymes ligninolytiques dans le milieu de culture. Il a été reporté, de plus, que la limitation de l'azote dans le milieu induit la production de ces enzymes (Tien et Kirk, 1984). La présence de la lignine dans le milieu de culture comme la paille induit la sécrétion des enzymes par *P chrysosporium*. Ceci explique l'utilisation des déchets agroindustriels riches en lignine comme milieu de culture pour produire les enzymes ligninolytiques par différents microorganismes.

1.4.2. Utilisation des déchets agro-industriels dans la production des enzymes ligninolytiques

Les résidus agro-industriels sont généralement considérés comme les meilleurs substrats pour les processus de fermentation en milieu solides, afin de produire des métabolites à haute valeur ajoutée notamment les enzymes. Un certain nombre de substrats ont été utilisés pour la culture de micro-organismes pour produire des enzymes ligninolytiques, parmi lesquels on cite la bagasse de canne à sucre, son de blé, son de riz, son de maïs, la paille de blé, paille de riz, la paille de l'orge, les déchets de la banane et les déchets d'orange (Tableau 1. 3). Le son de blé détient cependant la clé et a été le plus fréquemment utilisé dans la production de divers enzymes ligninolytiques. Le choix d'un substrat pour la production d'enzymes dans un processus de SSF dépend de plusieurs facteurs, qui sont principalement liés au coût et à la disponibilité du substrat. Dans un processus de SSF, le substrat solide fournit non seulement les éléments nutritifs à la culture microbienne, mais sert aussi à la fixation des cellules. Le substrat qui fournit tous les nutriments nécessaires pour les micro-organismes est considéré comme le support idéal. Toutefois, certains éléments nutritifs peuvent être disponibles à des concentrations sub-optimales, voire absents dans les substrats. Dans ces cas, il deviendra

nécessaire de les compléter par une source extérieure. De plus, la complexité des déchets, notamment les déchets ligninocellulosiques, nécessite parfois le recours au prétraitement (chimique, mécanique et ou thermique), rendant ainsi les nutriments plus facilement accessible pour la croissance microbienne.

De nombreux facteurs sont importants pour la croissance microbienne et la production d'enzymes en utilisant les déchets agroindustriels. Parmi ces facteurs, on peut citer le choix d'un substrat et d'un ou plusieurs micro-organismes adéquats, le prétraitement du substrat, la taille des particules (espace inter-particules et la surface) du substrat, l'humidité et de l'activité de l'eau, le type et la taille de l'inoculum, le contrôle de la température et du pH, la durée de culture, le maintien de l'uniformité dans l'environnement du système SSF, le taux de consommation d'oxygène et le taux d'évolution du dioxyde de carbone. Cependant, l'humidité, l'activité de l'eau et la taille des particules sont les facteurs les plus importants. Généralement, les petites particules fournissent un plus grand rapport air/surface, ce qui favorise la fixation des microorganismes sur le substrat et, par conséquent, il s'agit d'un facteur souhaitable. Toutefois, des particules trop petites peuvent entraîner une agglomération du substrat, ce qui peut interférer avec la respiration microbienne/aération, et aboutir donc à une faible croissance. En revanche, les grosses particules fournissent une meilleure respiration et une aération efficace mais fournissent des surfaces limitées à l'attaque microbienne. Pour cela, une optimisation de la taille des particules s'avère nécessaire. De plus, il demeure commode de fournir un contenu d'eau optimisé et de contrôler l'activité de l'eau (a_w) au cours de la fermentation. Des concentrations inférieures ou supérieures d'eau affectent négativement la croissance microbienne et la production d'enzymes ligninolytiques.

Tableau 1. 3 Substrats utilisés pour la production des enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide

Support	Microorganisme	Type du réacteur	Enzyme	Production	Référence
Bagasse	<i>T. versicolor</i>	fioles	MnP, laccase	5 U/ml de laccase 4,1 U/ml de MnP	Pal <i>et al.</i> , 1995
Son de blé + cosse de neem	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Fioles	Laccase, MnP, LiP	772 U/g de laccase 656 U/g de Lip 982 U/g de MnP	Verma et Madamwar, 2002

Support	Microorganisme	Type du réacteur	Enzyme	Production	Référence
Déchet de banane	<i>P. ostreatus</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i>	foies	Laccase, LiP	1,7106 U/mg de laccase 0,1632 U/mg de LiP	Reddy <i>et al.</i> , 2003
Maïs	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	foies	Laccase	180 U/ml de laccase	Tychanowicz <i>et al.</i> , 2006
Son de blé	<i>P. pulmonarius</i>	foies	Laccase	8,600 U/g	D'SOUZA <i>et al.</i> , 2006
Son de blé	<i>Fomes sclerodermeus</i>		Laccase, MnP	6,3 U g ⁻¹ de MnP 270 U g ⁻¹ de laccase	Papinutti <i>et al.</i> , 2003
Paille de blé	<i>P. chrysosporium</i>	foies	LiP, MnP		Castillo <i>et al.</i> , 1997
Paille de blé	<i>P. chrysosporium</i>	foies	LiP, MnP	2600 U/L de LiP, 1375 U/L de MnP	Xu <i>et al.</i> , 2001
Paille de blé	<i>P. pulmonarius</i>	foies	Laccase	8,600 U/g substrate	D'SOUZA <i>et al.</i> , 2006
Bois	<i>Bjerkandera sp. strain BOS55</i>	foies	LiP, MnP	660 nmol ml ⁻¹ min. ⁻¹ de LiP 1320 nmol ml ⁻¹ min. ⁻¹ de MnP	Mester <i>et al.</i> , 1998
Bois	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	foies	MnP, laccase	126 U/L de laccase 50 U/L de peroxydase	Ferraz <i>et al.</i> , 2003
Éponge de nylon	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-	rotating drum bioreactor	MnP Lip laccase	(1350 U/l of MnP 364 U/l of LiP 56 U/l of laccase	Dominguez <i>et al.</i> , 2001
Bois	<i>Trametes trogii</i>	foies	Laccase MnP	901 Ug ⁻¹ de laccase, 20Ug ⁻¹ de MnP	Levin <i>et al.</i> , 2008
Son d'orge	<i>Trametes versicolor</i>	Réacteur (immersion)	Laccase	600 U/L de laccase	Rodriguez Couto <i>et al.</i> , 2003

Support	Microorganisme	Type du réacteur	Enzyme	Production	Référence
Son d'orge	<i>Trametes versicolor</i>	Tray reactor	Laccase	3500 U/L de laccase	Rodriguez Couto <i>et al.</i> , 2003
Éponge de nylon	<i>Trametes versicolor</i>	Immersion reactor	Laccase	229 U/L de laccase	Rodriguez Couto <i>et al.</i> , 2003
Éponge de nylon	<i>Trametes versicolor</i>	Expanded-bed reactor	Laccase	126 U/L de laccase	Rodriguez Couto <i>et al.</i> , 2003
Éponge de nylon	<i>Trametes versicolor</i>	Tray reactor	Laccase	343 U/L de laccase	Rodriguez Couto <i>et al.</i> , 2003
nylon	<i>P. chrysosporium</i>	250-ml Erlenmeyer flasks	MnP Protéase	510 U dm ⁻³ de MnP	Cabaleiro <i>et al.</i> , 2002
Son de l'orge	<i>P. chrysosporium</i>	immersion	Laccase	987 U/l de MnP 356 U/l of LiP	Rivela <i>et al.</i> , 2000

1.4.3. Stimulateurs de la production d'enzymes ligninolytiques par *Phanerocheate chrysosporium*

Les enzymes ligninolytiques de *P. chrysosporium* sont produites durant la phase du métabolisme secondaire du microorganisme (Keyser *et al.*, 1978), au cours duquel plusieurs autres substances sont produites. Ces substances peuvent stimuler ou inhiber la production des enzymes ligninolytiques par *P. chrysosporium*. L'addition de certaines substances stimulatrices augmente la production de ces enzymes. En effet, il a été rapporté que l'addition du veratryl alcool (VA) stimule la production et l'activité des enzymes ligninolytiques (Gassara *et al.*, 2010). L'addition de 0,4 mM de veratryl alcool dans le milieu de culture augmente la sécrétion de ces enzymes de plus de deux fois (Cancel *et al.*, 1993). Il a été montré aussi que le VA stimule l'oxydation des composants ligneux par LiP (Valli *et al.*, 1990). La stimulation de la production de LiP est due à la protection de LiP de l'inactivation dépendante (Valli *et al.*, 1990). Le VA joue alors le rôle à la fois d'un protecteur et d'un stimulateur des enzymes ligninolytiques. Dans le même ordre d'idée, il a été montré que l'ajout du Tween 80 dans le milieu de culture stimule la production de ces enzymes par *P. chrysosporium* (Venkatadri et Irvine, 1990). Cette stimulation

est due à la libération des acides gras saturés et insaturés suite à la dégradation du Tween 80 et la protection des enzymes ligninolytiques de l'inactivation mécanique. De même, il a été montré que l'addition de PEG dans le milieu de culture augmente l'activité des enzymes ligninolytiques (Grgic et Perdih, 2003). Le PEG est un polymère soluble dans l'eau, biocompatible, non toxique aux microorganismes, utilisé souvent comme additif dans la formulation des protéines pour faciliter leur cristallisation (Kerwin *et al.*, 2002). En général, le PEG cause la redistribution des particules intra-membranaires des cellules, ce qui facilite le transport actif des enzymes ligninolytiques depuis la cellule jusqu'au milieu de culture (Petkau *et al.*, 1975). Dans le même contexte, l'ajout des composés ligneux stimule la dégradation de la lignine et la production de ces enzymes.

Kapich *et al.* (2004) a réalisé la production des enzymes ligninolytiques par *P. chrysosporium* ME446 dans un milieu de culture contenant (1%) de glucose, 0.3% de peptone, 0.1% de liqueur de maïs et 2 % de composants lignino-cellulosiques séparément (paille de blé finlandais, paille de blé allemand, la paille de blé espagnole, de la paille de blé d'Afrique du Sud et noyau ligneux). La paille de blé espagnole a permis la production maximale de MnP (585 ± 46.5 U/L), tandis que l'activité maximale de LiP a été obtenue en ajoutant 2% de noyau ligneux dans le milieu de culture (802.3 ± 15.8 U/L). Les résultats montrent que la dégradation des substrats ligneux améliore la production des enzymes ligninolytiques. Il y a plusieurs recherches qui ont souligné l'utilisation de différents déchets agroindustriels comme la paille, le son de blé, les déchets de maïs, les déchets des sucreries pour produire des enzymes ligninolytiques (Jiménez *et al.* 2007 ; Huang *et al.* 2008). De plus, il a été confirmé que la présence d'acide humique dans le milieu améliore la production des enzymes (LiP et MnP) par *Phanerochaete chrysosporium* (Dehorter et Blondeau, 1992). Cette stimulation peut être due aux propriétés surfactives de l'acide humique, qui peut jouer un rôle essentiel dans la régulation des machineries physiologiques de *P chrysosporium*, y compris la production des enzymes ligninolytiques.

PARTIE 2 PROBLÉMATIQUES

2.1 Problématique des contaminants émergents

Les contaminants « émergents » sont des substances qui existaient dans l'environnement depuis longtemps, mais leur présence n'avait pas été décelée auparavant et leur étude et surveillance est relativement récente. Parmi ces contaminants émergents dans l'environnement, on peut citer les surfactants, les produits pharmaceutiques, pesticides, les métaux traces ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les retardateurs des flammes et les toxines algales. Ces contaminants émergents sont déversés dans la nature (air, sol eau) et

ayant des effets néfastes multiples sur les organismes vivants, dont deux méritent d'être soulignés ici du fait de leurs ampleurs et de leurs conséquences : effet carcinogène et effet perturbateur endocrinien.

Le BPA est l'un des principaux contaminants émergents dans l'environnement. Il s'agit d'un composé généralement employé dans la fabrication des résines époxydes et des plastiques. En raison de la production à grande échelle et des utilisations répandues au Canada, le BPA est déchargé dans l'atmosphère par l'air, la terre et l'eau. Les données actuelles indiquent que le niveau d'exposition au bisphénol A est en deçà de la dose journalière temporaire admissible, établie par Santé Canada. BPA est également un perturbateur endocrinien et les études ont confirmé son estrogenicité et ses effets sur le comportement reproductif des animaux et des organismes aquatique. Les eaux usées des stations municipales du Canada contiennent de fortes concentrations de BPA atteignant 91,27 µg/kg (Lee *et al.*, 2002). De même, on a trouvé des concentrations de BPA atteignant 40 000 µg/kg (poids sec) dans les boues d'épuration des stations municipales échantillonnées à l'échelle du Canada (Lee et Peart, 2002). Pour toutes ces raisons, le BPA doit être éliminé des eaux usées et des boues d'épurations.

En revanche, le système actuel de traitement des eaux usées au Canada n'est pas efficace dans l'élimination totale des contaminants émergents comme BPA. Ce système est basé sur les méthodes de traitement physicochimiques qui utilisent des substances chimiques (ozone, chlore, fer...) ou des forces physiques (UV, filtration...). Ces méthodes sont incapables d'éliminer complètement BPA et provoquent une pollution secondaire du milieu traité. Cependant, le traitement biologique offre une solution efficace et fiable à ce problème. Néanmoins, la dégradation enzymatique est le procédé le plus efficace et le plus utilisé. En effet, ce procédé ne demande pas l'ajout de nutriments pour la croissance microbienne, ainsi qu'il permet d'éviter l'accumulation de la biomasse. Qui plus est, cette technique est efficace même en utilisant de faibles quantités d'enzymes et ne nécessite pas un processus de contrôle des conditions de traitement.

2.2 Problématique du coût élevé de production d'enzymes

Bien que l'utilité du traitement enzymatique soit de plus en plus approuvée, le procédé reste très couteux à cause du coût élevé de la matière première et de la faible stabilité des enzymes (Aitken et Heck., 1998). Les microorganismes sont équipés du matériel génétique nécessaire pour la synthèse des enzymes. Cependant, les champignons sont les producteurs d'enzymes les plus robustes, en particulier les enzymes ligninolytiques qui sont primordiales pour la dégradation des composés organiques toxiques (Gianfreda et Rao, 2004 ; Lee *et al.*, 2005,

Maciel, 2010). *Phanerochaete chrysosporium* peut dégrader divers xénobiotiques tels que les hydrocarbures polyaromatiques, les composés aromatiques chlorés, et les perturbateurs endocriniens (Mao *et al.*, 2011).

Normalement, ce mycète a été développé dans des effluents d'industries de textile ou de pulpe. Cependant, de nouveaux règlements stricts organisant la disposition et l'utilisation sûre du compost des eaux usagées, ont stimulé des efforts supplémentaires permettant l'utilisation de ces matières premières comme substrats de croissance pour la production d'enzymes. D'ailleurs, selon le nouveau plan d'action environnemental québécois, au moins 60 % de pertes doivent être valorisées. Par conséquent, notre projet de recherche proposé adressera trois thèmes : a) production économique des enzymes ; b) gestion soutenable des pertes ; c) dégradation du bisphénol-A. Normalement, les enzymes produites sont purifiées et utilisées pour la remédiation et pour d'autres buts. D'ailleurs, la technologie proposée dans notre projet de recherche traitera de la production d'un cocktail d'enzymes (brutes) en se basant sur une fermentation à l'état solide. Ce cocktail sera extrait et concentré par ultrafiltration, puis formulé sous formes de produits liquides et solides pour diverses applications. Par conséquent, le coût d'enzymes sera sensiblement réduit.

PARTIE 3. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

3. 1. Hypothèses

D'après la littérature en général et celle rapportée aux travaux scientifiques et techniques pour la production des enzymes ligninolytiques en particulier, on peut poser les hypothèses suivantes:

3.1.1. Hypothèse 1

La présence de la lignine dans le milieu de culture améliore la sécrétion des enzymes ligninolytiques par *P chrysosporium* (Kapich *et al.*, 2004). Ceci explique l'utilisation des déchets agroindustriels riches en lignine comme milieu de culture pour produire les enzymes ligninolytiques. Les déchets solides de jus de pomme sont des déchets riches en lignine et cellulose (la lignine provient surtout des écales de riz ajoutés aux pommes broyées pour faciliter la filtration par les filtres de presse). De même, les déchets de micro brasserie constitués essentiellement de malte sont très riches en lignine et cellulose. Dans le même contexte, les boues de l'industrie de pâte à papier contiennent de fortes quantités de lignine. **L'utilisation de**

ces déchets comme substrat de fermentation pourrait aboutir à la production de grandes quantités d'enzymes ligninolytiques.

3.1.2. Hypothèse 2

L'ajout de Tween 80, Vertaryl alcool et sulfate de cuivre séparément dans le milieu de culture stimule la production de ces enzymes par *P. chrysosporium* (Venkatadri et Irvine, 1990). Le sulfate de cuivre pourrait stimuler la production de la laccase chez *P. chrysosporium* qui n'est pas capable de produire naturellement cette enzyme (Gnanamania *et al.*, 2006). L'ajout de sulfate de cuivre pourrait probablement assurer l'expression du gène de production de laccase chez *Phanerochaete chrysosporium* (Alvarez *et al.*, 2009). **L'ajout des trois composants dans le milieu pourrait avoir un effet synergique sur la stimulation des enzymes ligninolytiques.**

3.1.4. Hypothèse 3

L'utilisation d'enzymes libres dans des applications de biotechnologie environnementale s'avère très limitée. En effet, une telle approche nécessite l'utilisation d'une grande quantité d'enzymes libres pour le traitement d'effluents liquides. De plus, ces enzymes, sous leur forme soluble, sont sensibles à l'effet de différents dénaturants physiques, chimiques et biologiques présents dans ces effluents réels. Ainsi, elles s'avèrent impossible à confiner dans un espace restreint de telle sorte à les utiliser de manière continue. L'application des enzymes libres dans la dégradation des contaminants émergents comme le BPA dans l'eau s'avère non efficace. Pour cela, la stabilisation de ces enzymes semble être indispensable. **La formulation de ces enzymes en nanoencapsulation pourrait empêcher l'inactivation des enzymes ligninolytiques et assurer une meilleure décontamination des eaux contenant du BPA.**

3.2. Objectifs de recherche

En tenant compte des hypothèses ci-dessus et de la synthèse bibliographique, les objectifs spécifiques de ces travaux de recherche se résument de la façon suivante :

L'objectif principal de notre projet de recherche est de développer de nouvelles stratégies permettant d'atteindre une rentabilité optimale du procédé de production d'enzymes par la souche fongique (*Phanerochaete chrysosporium*) et une efficacité optimale du procédé de dégradation du BPA par ce cocktail d'enzymes déjà formé et par une formulation spécifique (micro-encapsulation).

- 1) Cribler les déchets assurant une meilleure production des enzymes ligninolytiques : (pomace, déchet de poisson, déchet de microbrasserie, boue municipale, déshydratée, boue de pâte à papier), la production des enzymes est faite par fermentation en milieu solide ;
- 2) Optimiser la méthode d'extraction et du pH du tampon utilisée pour extraire les enzymes des différents milieux de culture solide, quantifier la production de protéase et étudier son effet sur la production des enzymes ligninolytiques ;
- 3) Optimiser des conditions de fermentation en utilisant un plan d'expériences basé sur le plan composite centré : les paramètres à optimiser sont l'humidité, la concentration de veratryl alcool et de sulfate de cuivre ;
- 4) Évaluer l'effet des paramètres physicochimiques (taille des particules, l'ajout d'une source d'azote organique) sur la production de laccase et de peroxydase et la croissance de *Phanerochaete chrysosporium* ;
- 5) Mise en échelle du procédé de fermentation : production d'enzymes dans un fermenteur en milieu solide 15 L ;
- 6) Comparer la production des enzymes en milieu liquide (boues d'ultrafiltration de l'industrie de jus de pomme) avec celle en milieu solide ;
- 7) Tester le bouillon enzymatique produit dans la dégradation du BPA : l'extrait enzymatique va être testé à différentes concentrations dans la dégradation de BPA et faire une formulation de l'extrait enzymatique par micro-encapsulation : faire une micro-capsule stable et la tester dans la dégradation du bisphénol.
- 8) Tester le bouillon enzymatique produit dans la clarification des jus de fruits (jus de pomme et de grenade).
- 9) Évaluer l'effet du procédé de production des enzymes sur l'environnement, surtout en termes d'émission de gaz à effet de serre
- 10) Réaliser une analyse technico-économique du procédé de production des enzymes par fermentation à l'état solide de déchets de jus de pomme (apple pomace).

3.3 Originalité du travail

La réalisation de ce procédé permet à la fois une bonne gestion des déchets et la production des enzymes ligninolytiques à faible coût. En outre, la formulation des enzymes en microgel est une pratique prometteuse pour stabiliser des enzymes tout en minimisant leur coût de production. De même, la clarification des jus par un bouillant d'enzymes ligninolytiques est

nouvellement soulignée dans ce travail, afin d'enlever les substances phénoliques qui peuvent changer la couleur et le goût du jus.

PARTIE 4. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Avant de commencer le projet, il était nécessaire de faire une revue de la littérature approfondie pour comprendre le mécanisme de dégradation de BPA par voie biologique. Cette revue est présentée en détails dans le chapitre II de cette thèse.

Les résultats du travail expérimental de ce projet de thèse sont présentés en cinq parties :

La première étape du projet était la production des enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide de déchets industriels dans des fioles. Cette étape comprenait 3 sous-parties différentes qui étaient : 1) criblage des milieux de cultures favorables pour la croissance de *Phanerochaete chrysosporium* et la production d'enzymes ligninolytiques ; 2) optimisation des conditions de fermentation notamment la concentration des inducteurs et l'humidité du milieu de culture ; 3) Quantification de la teneur en lignine dans les déchets agro-industriels. La deuxième étape de ce projet de thèse était la production des enzymes ligninolytiques dans des fermenteurs. Cette étape comprenait deux sous-parties : 1) la mise en échelle du procédé de fermentation dans un fermenteur de 12 L et l'optimisation de l'aération et l'agitation dans ce fermenteur ; 2) Comparaison entre la production des enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide et celle par fermentation en culture liquide. La troisième étape de ce projet de thèse était la formulation d'enzymes par micro-encapsulation pour augmenter leur stabilité. La quatrième étape de ce projet était l'application des enzymes ligninolytiques dans la clarification des jus de fruits et la dégradation de bisphénol A. La cinquième étape de ce projet était l'évaluation de l'effet de ce procédé de fermentation sur l'environnement, en termes d'émission de gaz à effet de serre et aussi la réalisation d'une analyse technico-économique du procédé.

4.1 Production des enzymes ligninolytiques dans des fioles

4.1.1 Criblage des déchets agroindustriels assurant une meilleure production d'enzymes ligninolytiques

L'utilisation des enzymes ligninolytiques dans différentes applications, notamment la bioremediation et les applications agro-industriels, est souvent limitée en vue de leur coût de production élevé. Le coût élevé de ces enzymes est souvent relié au coût du substrat de fermentation qui représente 40-60% du coût de production total (Hacking *et al.*, 1987). Notre étude visait à l'utilisation des déchets agro-industriels comme substrat de fermentation pour la production d'enzymes ligninolytiques. Ces déchets ont été choisis en raison de leur omniprésence, haute biodégradabilité et richesse en nutriments. La production d'enzymes

ligninolytiques par des cultures à l'état solide de *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (ATCC 24725) a été étudiée en utilisant les déchets suivants : les résidus de poisson, les rejets de microbrasserie, les déchets de jus de pomme (Pomace) et les boues de pâte à papier. Différents inducteurs enzymatiques, tels que le veratryl alcool, Tween-80 et CuSO_4 à des concentrations de 2 mmole/kg, 0,5% v/W et 3 mmole/kg, respectivement, ont également été testés. L'addition du veratryl alcool et du Tween-80 a conduit à des activités maximales de manganèse peroxydase (MnP) de $17,36 \pm 0,5$ U/gss, $540,2 \pm 5,1$ U/gss, $631,25 \pm 14$ U/gss, $507,5 \pm 26,87$ U/gss (unités/gramme de substrat sec), respectivement, pour les différents déchets. Des maximums d'activités de lignine-peroxydase (LiP) de $141,38 \pm 3,39$, $14,1 \pm 0,5$ U/gss ont été obtenus avec les déchets de jus de pomme et les rejets de microbrasserie, respectivement. La production de la laccase était négligeable dans tous les déchets. Les activités maximales de MnP obtenus quand le tween-80 et le CuSO_4 ont été ajoutées aux milieux ont été $17,4 \pm 0,6$, $291 \pm 2,8$, $213,5 \pm 3$ et $213,2 \pm 3,2$ U/gss dans les résidus de poisson, les rejets de microbrasserie, les déchets de jus de pomme et les boues de pâte à papier, respectivement. L'ajout de CuSO_4 au milieu de culture améliore la production de laccase. Des activités maximales de laccase de $738,97 \pm 9,2$, $719,97 \pm 14,6$, $308,8 \pm 12,1$, $94,44 \pm 1,2$ U/gss ont été obtenues dans les rejets de microbrasserie, les déchets de jus de pomme, les boues de pâtes à papier et les résidus de poisson, respectivement. Au total, les déchets de microbrasserie et de l'industrie de jus de pomme ont servi d'excellentes sources de production de MnP, LiP et laccases. L'ajout de veratryl alcool a amélioré la production des peroxidases (LiP et MnP). De plus, l'addition de CuSO_4 a amélioré la production de laccase. Ce travail a été expliqué en détails dans le chapitre III de cette thèse.

4.1.2 Optimisation des conditions de fermentation par la méthode de surface des réponses

Après le criblage des substrats assurant la meilleure production des enzymes ligninolytiques (déchets de microbrasserie et de jus de pomme). Ces deux déchets ont été utilisés comme milieu de culture de *P. chrysosporium* pour optimiser les conditions de fermentation dans des fioles. L'optimisation de la production des enzymes ligninolytiques, lignine peroxydase (LiP), manganèse peroxydase (MnP) et laccase a été réalisée moyennant la méthodologie de surface des réponses RSM. L'effet des trois paramètres dans la fermentation (les concentrations des inducteurs veratryl alcool, sulfate de cuivre et l'humidité) a été étudié. Parmi ces trois paramètres, l'humidité et la concentration de veratryl alcool ont un effet positif significatif sur la production de MnP et LiP et la viabilité de *Phanerochaete chrysosporium* dans les déchets solides de jus de pomme et les déchets de microbrasserie ($p < 0.05$). Toutefois, le sulfate de

cuivre exerce un effet négatif sur ces trois réponses. Ceci pourra être dû à l'utilisation du veratryl alcool par la LiP comme substrat et sa transformation en veratryl aldéhyde (Gill et Arora, 2003). De plus, le veratryl alcool peut être utilisé par *Phanerochaete chrysosporium*, ce qui augmente sa croissance et stimule son métabolisme secondaire. En outre, l'effet négatif du sulfate de cuivre peut être dû à la toxicité du sulfate de cuivre aux champignons, même à des concentrations faibles (Baldrian, 2003). De plus, l'humidité et le sulfate de cuivre ont eu un effet positif significatif sur la production de (p < 0.05). Par contre, le veratryl alcool a eu un effet positif non significatif (p < 0.05) sur la production de cette même enzyme. Les valeurs optimales de MnP, LiP et le Log 10 de la viabilité de *P.chrysosporium* dans les déchets de jus de pomme (1287.5U MnP/gss, 305 U LiP/gss, et 10,38 Log 10 de viabilité) et les déchets de microbrasserie (792 U MnP/gss et 9.83 Log 10 viabilité) ont été obtenus avec 80 % d'humidité, 3 mmole/ kg de VA et 0.5 mmole/ kg de sulfate de cuivre. La production maximale de LiP dans les déchets de microbrasserie (7.87 U/g) a été obtenue avec 70 % d'humidité 2 mmole/kg de VA et 1 mmole/kg de sulfate de cuivre. Néanmoins, la production maximale de laccase dans les déchets de jus de pomme (789 U/g) et les déchets de microbrasserie (841 U/g) a été obtenue avec 80 % d'humidité, 3 mmole/kg de VA et 1,5 mmole/kg de sulfate de cuivre. Au final, l'optimisation des concentrations des inducteurs (veratryl alcool, sulfate de cuivre) et l'humidité des substrats a permis l'augmentation significative (p < 0,05) de la production des enzymes ligninolytiques (MnP, LiP et laccase), à la fois dans des déchets solides de jus de pomme et de microbrasserie. De plus la production totale des enzymes ligninolytiques dans les déchets solide de jus de pomme (2381,5 U/gss) est nettement supérieure à celle dans les déchets de microbrasserie (1640,87 U/gss). Pour cette raison, les déchets solides de jus de pomme seront utilisés pour la suite des expériences, notamment dans la mise en échelle du procédé de fermentation. Les résultats relatifs à ce travail sont présentés en détails dans le chapitre III.

4.1.3 Quantification de la teneur en lignine dans les déchets agroindustriels.

L'objectif principal de ce projet de thèse est la production des enzymes ligninolytiques. D'après les résultats de la première sous-partie de ce projet, les déchets agroindustriels riches en lignine (les déchets solides de jus de pomme et les déchets de microbrasserie) permettent les meilleures productions d'enzymes ligninolytiques. Par la suite, la quantification de la lignine dans les déchets est une étape primordiale dans ce projet. La quantification de la lignine a été étudiée depuis les années cinquante par différentes méthodes (Van Soest 1967; Alves *et al.*, 2009). Toutefois, les estimations de la teneur de lignine varient largement entre les méthodes. La méthode Klason est la méthode standard de quantification de la lignine dans le bois et les différents matériaux lignino-cellulosiques (Lai et Sarkanen 1971; Kirk et Obst, 1988). Cette

méthode est basée sur la quantification de la lignine insoluble dans les acides minéraux. La lignine est ensuite analysée par gravimétrie après hydrolyse des fractions de cellulose et d'hémicellulose par l'acide sulfurique. Cette méthode de quantification de la lignine est largement utilisée pour sa précision. Cependant, l'étape de l'acidolyse des matériaux lignocellulosiques utilisant le soxhlet traditionnel est très lente (4 h). L'objectif principal de cette étape est de remplacer l'étape d'acidolyse traditionnelle par la digestion à microonde. Ceci a été réalisé dans une tentative d'augmenter la sélectivité de cette étape pour cliver les liaisons entre la lignine et les carbohydrate (cellulose et hémicellulose) et de réduire le temps nécessaire pour quantifier la lignine. Les conditions de la digestion par micro-ondes (la pression, la température et le temps) ont été optimisées par la méthodologie de surface des réponses. Les résultats ont montré que la température et la pression ont eu un effet positif significatif ($p < 0,05$) sur la digestion à micro-ondes et la quantification de lignine. Les meilleures conditions de digestion se présentent comme suit : pression = 30 bar, température = 170 ° C, temps = 15 min. Lorsque les conditions de digestion aux micro-ondes ont été optimisées, la teneur en lignine dans les déchets solides de jus de pomme a été (33% p/p) plus élevée que le Klason lignine (27% p / p). La digestion par micro-ondes a été plus précise ($p < 0,05$) que celle utilisant le reflux traditionnel. Le travail réalisé dans cette partie a été présenté en détails dans le chapitre III.

4.2 Production des enzymes ligninolytiques dans des fermenteurs

4.2.1 Production des enzymes ligninolytiques dans un fermenteur en culture solide de 12 L

Après la fermentation des déchets solides de jus de pomme dans des fioles, la mise en échelle du procédé a été réalisée afin d'augmenter la production des enzymes ligninolytiques. Une optimisation de l'agitation et l'aération dans le fermenteur a été réalisée simultanément. Cette optimisation a été réalisée à cause de l'importance de ces deux paramètres dans la fermentation à l'état solide. En effet, l'agitation au cours de la fermentation permet l'élimination des produits métaboliques volatiles, la prévention de l'agglomération des particules du substrat, l'amélioration du transfert de la chaleur et de l'oxygène et des conditions de fermentation pour la croissance des microorganismes. De plus, l'aération permet de fournir une quantité appropriée d'oxygène pour la croissance microbienne et d'éliminer le dioxyde de carbone. Cependant, l'aération assure également une fonction critique dans le transfert de chaleur et d'humidité entre les solides et la phase gazeuse (Shojaosadati et Babaeipour, 2002). Il est essentiel de noter que l'aération excessive peut produire des contraintes de cisaillement (qui a un effet nocif sur la morphologie champignon filamenteux). La nécessité d'une aération suffisante et l'agitation du substrat réduit la possibilité d'employer le volume maximal de bioréacteurs, indépendamment de

leur conception. Ainsi, l'optimisation de l'agitation et l'aération est nécessaire pour optimiser la croissance du microorganisme et la production de métabolites primaires et secondaires.

L'effet de différents types d'agitation (1: agitation continue (C) 2: agitation continue, discontinue, continue (C / D / C); 3: agitation discontinue, continue, discontinue (D / C / D) et d'aération (0,87, 1,25, 1,66 VVM) sur la production d'enzymes ligninolytiques des cultures solides de *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 a été étudié. Les productions maximales de MnP ($1690,3 \pm 87,6$), LiP ($387,9 \pm 14,3$) et de la laccase ($898,9 \pm 53,3$ U /gss) ont été obtenues après 195, 147, 219 h de fermentation, respectivement, en utilisant 1,66 VVM comme débit d'air et (C / D / C) comme mode d'agitation. La production d'enzymes a été influencée par l'aération et les valeurs les plus élevées ont été obtenues en utilisant 1,66 VVM comme débit d'air, suivie par 1,25 VVM et 0,83 VVM, respectivement. Cette production était également influencée par l'agitation et les valeurs maximales obtenues en utilisant l'agitation C / D / C, suivie par l'agitation D / C / D et l'agitation continue, respectivement. Le travail réalisé dans cette partie a été présenté en détails dans le chapitre IV.

4.2.2 Production des enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état liquide des boues d'ultrafiltration

Pour comparer la production des enzymes ligninolytiques en culture solide avec celle en culture liquide, les milieux de fermentation liquides utilisés ont été la boue d'ultrafiltration provenant du procédé de production de jus de pomme et un milieu synthétique (Tien et Kirk, 1984). Les boues d'ultrafiltration contiennent 80 g /L de solides totaux. Il s'agit d'un déchet très chargé dont la gestion présente réellement un problème pour l'entreprise de jus de pomme (LASSONDE, Inc). Pour cette raison, son utilisation comme milieu de culture riche (assurant le développement des microorganismes et la production de produit à valeur ajoutée) constitue un grand défi. Il permet à la fois la résolution du problème de la gestion du déchet et la production d'enzymes à faible coût. Cependant, l'objectif majeur de cette partie de ce projet de thèse est de comparer la production des enzymes en milieu liquide avec celle en culture solide.

Différents paramètres physico-chimiques à savoir la viscosité, le potentiel zêta, la taille des particules et les paramètres biologiques, tels que la viabilité et la production d'enzymes ont été étudiés au cours des fermentations des boues d'ultrafiltration et du milieu synthétique. La production d'enzymes ligninolytiques était plus élevée dans la boue d'ultrafiltration de l'entreprise de jus de pomme (45 U / L de laccase, 220 U / L de MnP et 6,5 U / L de LiP) que dans le milieu synthétique (17 U / L de laccase, 37 U / L de MnP et 6 U / L). Ces activités maximales ont été obtenues pendant la fin de la phase stationnaire et le début de la phase

déclin. Il a été également constaté que la production d'enzymes était fortement corrélée avec la viabilité *P. chrysosporium* à la fois dans un milieu synthétique et la boue d'ultrafiltration. Par ailleurs, les paramètres physico-chimiques, tels que la taille des particules, le potentiel zêta et la viscosité étaient fortement corrélés à la viabilité de *P. chrysosporium* et à la production d'enzymes ligninolytiques. Les activités maximales de MnP, LiP et laccase dans la boue d'ultrafiltration (1,75 U / gss, 0,05 U / gss, 0,37 U / gss) sont 10 000 fois, 40 000 et 6000 plus faibles que les activités obtenues dans une culture de déchets solide de jus de pomme (1287.5U / gss, 305 U / gss, 789 U/gss, respectivement). Ces résultats peuvent s'expliquer par l'absence de lignine dans la boue d'ultrafiltration. Par contre, les déchets solides de jus de pomme (apple pomace) contiennent les écaillés de riz (riches en lignine), qui sont ajoutés aux pommes broyées pour faciliter le processus de filtration. La teneur plus élevée en lignine dans le milieu de culture est plus favorable pour la production d'enzymes ligninolytiques. De plus, les milieux de cultures solides sont plus riches en nutriments que les milieux liquides, ce qui favorise la croissance des microorganismes et la production des métabolites primaires et secondaires. Le travail réalisé dans cette partie a été présenté en détails dans le chapitre IV.

4.3. Formulation des enzymes ligninolytiques

Le problème majeur de l'application des enzymes ligninolytiques dans la bioremédiation (eau sol...) et les pratiques agroindustrielles (clarification des jus, bières...) est leur faible stabilité, surtout quand elles sont libres. Pour augmenter la stabilité des enzymes, la microencapsulation est une option pratique.

Les enzymes ligninolytiques (LiP, MNP et la laccase) produites par *Phanerochaete chrysosporium* ont été piégées dans trois structures d'hydrogel à savoir les réseaux semi-interpénétrés de poly (acrylamide) / gélatine (P (AAM) / Gel), poly (acrylamide) / pectine (P (AAM) / Pec) et poly (acrylamide)/ CMC (P (AAM) / CMC). La stabilité thermique et les propriétés physico-chimiques (granulométrie, le potentiel zêta et de la viscosité) de ces formulations ont été ensuite évaluées. Les résultats de cette étude ont montré que le piégeage des enzymes a augmenté de façon significative la stabilité thermique des enzymes, à haute température (75 °C) et à basse température (4 °C). Lorsque la température a été augmentée à 75 °C, l'activité maximale a diminué jusqu'à 0%, 7,9%, 0% pour la laccase, MNP et LiP libres, respectivement, jusqu'à 94, 97, 93% pour la laccase, MNP et LiP, piégés dans un hydrogel de P (AAM) / pectine, 94, 98, 88% pour la laccase, MNP et LiP piégés dans un hydrogel de P (AAM) / gélatine et à 87%, 91, 87% pour des laccase, MNP et LiP piégés dans P (AAM) / CMC. Il a été également démontré que lorsque la taille des particules et la viscosité de la formulation

augmentaient, la stabilité des enzymes augmentait. Cependant, il n'y avait pas de relation claire entre le potentiel zêta de la formulation et l'activité enzymatique. Au final, la formulation réalisée dans notre étude a augmenté considérablement la stabilité thermique des enzymes ligninolytiques et a empêché leur inactivation. Ceci est dû au phénomène de piégeage qui a permis d'enfermer les enzymes dans des micro-espaces formés par les structures matricielles. De plus, en utilisant cette méthode, les enzymes ne sont pas liées chimiquement aux polymères des matrices, ce qui leur a permis de préserver leur conformation tridimensionnelle originale et protéger leurs sites actifs. Le travail réalisé dans cette partie a été présenté en détails dans le chapitre V.

4.4 Application des enzymes ligninolytiques

4.4.1 Clarification des jus de fruits

Les composés phénoliques présents dans les jus de fruits (grenade et fruits rouge), lesquels sont responsables à la formation du trouble et du brunissement lors du stockage, ont été éliminés par un processus enzymatique. Les enzymes ligninolytiques (MnP, LiP, Laccase) libres et encapsulées, produites par fermentation de déchets solides de jus de pommes par *Phanerochaete chrysosporium*, ont été testées pour clarifier un jus à base de grenade et de fruits rouge. L'effet de ces traitements enzymatiques sur la teneur en composés phénoliques totaux, la clarté et la couleur des jus a été évalué. Les résultats de cette étude ont démontré que la réduction des composés polyphénoliques et l'amélioration de la clarté du jus de grenade et des fruits rouges par le traitement avec les enzymes encapsulées (plus de 60% dans tous les traitements) ont été plus significatifs ($p > 0,05$) que celles obtenus par le traitement par des enzymes libres (45%). Ainsi, les enzymes ligninolytiques (LiP, MnP et la laccase) sont en mesure de clarifier les jus de fruits avec succès et peuvent remplacer ou être utilisées avec la filtration, afin de rendre le processus de clarification plus économique pour les industriels. Le travail réalisé dans cette partie a été présenté en détails dans le chapitre V.

4.4.2 Dégradation de bisphénol A

Les enzymes ligninolytiques sont connues par leur capacité de détruire plusieurs composés phénoliques, comme les contaminants émergents (le bisphénol A, nonylphénol...) (Hirano *et al.* 2000, Tsutsumi *et al.*, 2001). A titre indicatif, les eaux usées des stations municipales du Canada contiennent de fortes concentrations du BPA atteignant 91,27 µg/kg (Lee *et al.*, 2002). C'est pour cette raison que la bioremédiation des eaux fortifiées par BPA (10 ppm) a été réalisée par un extrait enzymatique libre (MnP, LiP, Laccase) et des formulations d'enzymes

ligninolytiques (P (AAM) / Gel, P (AAM) / Pec et P (AAM) / CMC). Les résultats de cette étude ont montré une forte dégradation de BPA (90% de la concentration initiale de 10 ppm) après 8 h de traitement par des enzymes ligninolytiques encapsulées dans un hydrogel de polyacrylamide et pectine. La dégradation du bisphénol A par les enzymes libres (26%) était inférieure à celle obtenue par des enzymes encapsulées. La présence de pectine dans la formulation des enzymes a amélioré de manière significative ($p > 0,05$) l'activité des enzymes pour dégrader le bisphénol A. L'étude de la cinétique de dégradation de BPA a montré que la vitesse maximale de dégradation V_m a augmenté considérablement, lorsque les enzymes ont été encapsulées. Cependant, La constante de Michaelis Menten K_m n'a pas été changée, après l'encapsulation des enzymes. Ainsi, l'encapsulation a protégé les enzymes de l'inhibition non compétitive. Les sous-produits probables de la dégradation de BPA par les enzymes ligninolytiques étaient le 2,2-méthylènediphénol ($C_{13}H_{12}O_2$), le Bis (4- hydroxyphényl)méthane ($C_{13}H_{12}O_2$) et le 4-benzylresorcinol. Ces sous-produits de dégradation sont minéralisés selon le mécanisme de dégradation suggéré dans cette étude. Une étude supplémentaire est primordiale pour déterminer d'une manière précise le mécanisme de dégradation de BPA par les enzymes ligninolytiques. Cette partie a été présentée en détails dans le chapitre V de ce projet.

4.5 Évaluation de l'impact environnemental et économique du procédé de production des enzymes ligninolytiques

4.5.1 Impact environnemental du procédé de production des enzymes

Pour évaluer l'impact environnemental du procédé de production des enzymes, nous avons estimé les émissions de gaz à effet de serre durant la gestion des déchets solides de jus de pomme moyennant 5 scénarios différents. Les scénarios évalués se présentent de la façon suivante : a) incinération; b) enfouissement; c) utilisation comme additif dans l'alimentation animale; d) valorisation en produisant des enzymes ; et e) compostage. Pour déterminer le bilan des émissions de GES, nous avons adopté la méthode de l'analyse du cycle de vie (ACV). Les résultats trouvés dans cette étude montrent que la production d'enzymes (906 tonnes de CO_2 éq par année) et l'alimentation animale (963 tonnes de CO_2 éq par année) sont les approches qui génèrent le moins de GES, suivi de l'incinération (1122 tonnes de CO_2 éq par année), du compostage (1273 tonnes de CO_2 éq par année), et de l'enfouissement (1841 tonnes de CO_2 éq par année).

Ces résultats sont en faveur l'utilisation des déchets solides de jus de pomme dans l'alimentation animale et la production d'enzyme, afin de respecter l'environnement et diminuer la production de gaz participant au réchauffement de la planète. Qui plus est, même d'un point

de vue économique, ces deux modes de gestion semblent être plus avantageux que les autres, à l'instar de l'incinération et l'enfouissement. En effet, l'enfouissement des déchets nécessite l'achat de site d'enfouissement, et l'incinération consomme beaucoup d'énergie pour la combustion des déchets. Pour cela, une étude économique demeure souhaitable, afin de déterminer le mode de gestion le plus économique et le plus respectueux de l'environnement. Le travail réalisé dans cette partie a été présenté en détails dans le chapitre VI.

4.5.2 Analyse technico-économique du procédé de production des enzymes ligninolytiques

L'analyse technico-économique du procédé de production des enzymes ligninolytiques a été enfin réalisée pour expliquer l'intérêt économique de l'utilisation d'apple pomace comme substrat de fermentation. Pour cette raison, 4 scénarios ont été utilisés au cours de cette analyse. Les trois premiers scénarios tiennent compte de la fermentation de déchets solides de jus de pomme. Cependant, la méthode d'extraction et le tampon d'extraction des enzymes a changé d'un scénario à un autre. Dans le cas du scénario 1, l'extraction des enzymes a été réalisé par centrifugation après l'ajout du tampon phosphate. Alors que dans le cas du scénario 2, l'extraction des enzymes a été réalisée par filtration après l'ajout du tampon phosphate. De même, dans le cas du scénario 3, l'extraction des enzymes a été faite par centrifugation après l'ajout de l'eau. Par contre, le quatrième scénario a pris en considération la fermentation du son de blé et les enzymes ont été récupérées par centrifugation après l'ajout du tampon phosphate. Ce scénario a été considéré comme scénario de référence. Les résultats de cette étude ont montré que l'extraction des enzymes par centrifugation permet la réduction du coût de production des enzymes ligninolytiques de 74,6 % par rapport à la méthode d'extraction par filtration. Cet effet est dû à l'adsorption des enzymes sur le filtre ce qui empêche leur extraction. De plus, l'utilisation d'apple pomace comme matière première réduit le coût de production des enzymes de 19% par rapport au procédé de fermentation de référence, utilisant le son de blé comme matière première. L'utilisation de l'eau comme tampon d'extraction des enzymes à la place du tampon phosphate a engendré l'augmentation du coût de production des enzymes ligninolytiques de 10 %. Ainsi, d'après cette analyse technico-économique, l'utilisation d'apple pomace comme milieu de fermentation l'extraction des enzymes ligninolytiques par centrifugation après l'ajout de tampon phosphate, réduit considérablement le coût de production des enzymes ligninolytiques, ce qui permet l'augmentation du bénéfice des industriels. Le travail réalisé dans cette partie a été présenté en détails dans le chapitre VI.

PARTIE 5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

5.1. Conclusions

Cette étude a permis de développer un procédé de fermentation en culture solide de déchets agroindustriels pour produire des enzymes ligninolytiques. Les rejets agroindustriels (déchets solides de micro-brasserie, de boues d'industrie de pâte à papier, les déchets solides de l'industrie de jus de pommes, les déchets de poissons) peuvent causer un problème de pollution à l'environnement, suite à une mauvaise gestion dû aux divers traitements (enfouissement, incinération ...). De ce fait, dans le souci de rentabiliser de façon utile et économique la réutilisation de ces rejets, ces derniers sont recyclés au cours des travaux de cette thèse comme produits à haute valeur ajoutée (PAV). En effet, ces rejets, compte tenu de leur potentiel nutritif élevé et de leurs propriétés physiques (humidité, taille de particules) sont utilisés comme source de nutriments pour la production d'enzymes ligninolytiques. La méthodologie de plan d'expérience a été utilisée pour optimiser les conditions de fermentation (humidité, concentrations de veratryl alcool (VA) et de sulfate de cuivre comme inducteurs) et les conditions de digestion par microonde (temps, température et temps) pour quantifier la lignine dans les déchets. Le procédé de fermentation a été réalisé aussi dans un fermenteur de 12 L, dans le quel l'aération et l'agitation ont été optimisées. Les enzymes ligninolytiques ont été ensuite formulées dans différents hydrogels :1) polyacrylamide et pectine; 2) polyacrylamide et gélatine; 3) polyacrylamide + carboxyméthyl cellulose, pour augmenter leur stabilité. Ces formulations d'enzymes ont été testées pour dégrader un contaminant émergent présent dans l'eau (BPA) et dans la clarification des jus. L'étude d'impact de notre procédé sur l'environnement ainsi qu'une analyse technico-économique ont été enfin réalisées. À partir des résultats déjà obtenus, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- 1) Les déchets de microbrasserie et de l'industrie de jus de pomme ont été d'excellentes sources de production pour MnP, LiP et laccases.
- 2) L'ajout de veratryl alcool a amélioré la production des peroxidases (LiP et MnP) et l'addition de CuSO_4 a amélioré la production de laccase.
- 3) Après optimisation des concentrations des inducteurs (veratryl alcool, sulfate de cuivre) et l'humidité des déchets, la production totale des enzymes ligninolytiques dans les déchets solides de jus de pomme (2381,5 U/gss) a été nettement supérieure à celle dans les déchets de microbrasserie (1640,87 U/gss).

- 4) Les meilleures conditions de digestion par micro-onde pour quantifier la lignine dans les déchets solides de jus de pomme ont été : pression = 30 bar, température = 170 ° C, temps = 15 min.
- 5) La production d'enzymes a été influencée par l'aération et l'agitation. Les valeurs les plus élevées ont été obtenues en utilisant 1,66 VVM comme débit d'air, suivie par 1,25 VVM et 0,83 VVM, respectivement. Les valeurs maximales de production ont été obtenues en utilisant l'agitation Continue / Discontinue / Continue, suivie par l'agitation Discontinue / Continue / Discontinue et l'agitation continue, respectivement.
- 6) Les activités maximales de MnP, LiP et laccase en milieu liquide : la boue d'ultrafiltration (220 U / L, 6,5 U / L, 45 U / L) sont 10 000, 40 000 et 6000 fois plus faibles que les activités obtenues dans une culture de déchets solide de jus de pomme (1287.5U / gss, 305 U / gss, 789 U/gss, respectivement).
- 7) La formulation a augmenté de façon significative la stabilité thermique des enzymes à haute température (75 °C) et à basse température (4 °C).
- 8) Les enzymes ligninolytiques (LiP, MnP et la laccase) sont en mesure de clarifier les jus de fruits avec succès et peuvent être remplacées ou être utilisées avec la filtration, afin de rendre le processus de clarification plus économique pour les industriels.
- 9) L'encapsulation des enzymes a amélioré leur activité pour dégrader le bisphénol A et clarifier les jus de fruits
- 10) De tous les procédés étudiés, la production d'enzymes (906,81 tonnes de CO₂ éq par année) est le procédé le moins polluant de l'environnement en termes de rejet de GES, suivi par l'alimentation animale (963,38 tonnes de CO₂ éq par année), l'incinération (1122,10 tonnes de CO₂ éq par année), le compostage (1273,78 tonnes de CO₂ éq par année), et l'enfouissement (1841 tonnes de CO₂ éq par année).
- 11) L'utilisation des déchets solides de jus de pomme comme matière première, réduit le coût de production des enzymes de 32% par rapport au procédé de fermentation de référence, utilisant le son de blé comme matière première.

5.2. Recommandations

Les prochaines recherches sur la bioconversion des déchets solides de jus de pomme en enzymes ligninolytiques et leur formulation et application dans la bioremédiation et la

dégradation des contaminants émergents pourraient avantageusement tenir compte des recommandations suivantes :

- 1) Remplacer les inducteurs de production d'enzymes ligninolytiques comme le veratryl alcool par d'autres inducteurs moins coûteux comme le guaiacol et la lignine ;
- 2) Améliorer la production d'enzymes ligninolytiques par la co-cultivation de *P. chrysosporium* et *Trametes versicolor* (améliorer l'assimilation des déchets lignocellulosiques et la production des enzymes) ;
- 3) Tester d'autres hydrogels dans la formulation des enzymes : le polypropylène glycol pourra être testé à la place du polyacrylamide afin de minimiser le coût de formulation des enzymes ligninolytiques ;
- 4) Étudier plus en détails le mécanisme de dégradation de bisphénol A et évaluer la toxicité des différents sous-produits ;
- 5) Produire des enzymes ligninolytiques à échelle industrielle et assurer leur commercialisation ;
- 6) Analyser les émissions de gaz à effet de serre par des analyseurs de gaz à la sortie des fermenteurs installés en industrie.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahuja SK, Ferreira GM, Moreira AR (2004) Utilization of enzymes for environmental applications. *Crit Rev Biotechnol* 24: 125-154.
- Aitken MD (1993) Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. *Chem Eng J* 52: B49–B58.
- Aitken MD, Heck, PE (1998) Turnover capacity of *Coprinus cinereus* peroxidase for phenol and monosubstituted phenols. *Biotechnol Progr* 14: 487–492.
- Akhtar S, Khan AA, Husain Q (2005a) Potential of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent. *Chemosphere* 60:291–301.
- Akhtar S, Khan AA, Husain Q (2005b) Partially purified bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important Biores Technol 96:1804–1811.
- Alic M, Akileswaran L, Gold MH (1997) Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochim Biophys Acta* 1338:1–7.
- Alper N, Acar J (2004) Removal of phenolic compounds in pomegranate juices using ultrafiltration and laccase-ultrafiltration combinations. *Nahrung* 48: 184–187.
- Alvarez JM, Canessa P, Mancilla RA, Polanco R, Santibáñez PA, Vicuna R(2009) Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispora* is mediated by an ACE1-like copper-fist transcription factor. *Fungal Genet Biol* 46: 104–111.
- Arora DS, Gill PK (2001) Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enz Microbial Technol* 28:602–605.
- Ashoka C, Manjunath K, Sullia SB (2000) Biological treatment of combined textile dye effluent. In: *Ecology of Fungi*, DJ Bhat, S Raghukumar (eds.), pp. 63 – 67.
- Bollag JM, Chu HL, Rao MA, Gianfreda L (2003) Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures *J Environ Qual* 32 : 63–69.
- Bonnarme P, Jeffries W (1990) Mn(II) regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase from lignin degrading white rot fungi. *Appl Environ Microbiol* 56, 210–217.
- Bourbonnais R, Paice MG (1996) Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi. Tech Assoc Pulp Pa. Ind J* 79:199–204.
- Brown JA, Alic M, Gold MH (1991) Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. *J Bacteriol* 173:4101–4106.
- Burdsall, H. H., Jr. (1985). A contribution to the taxonomy of the genus *Phanerochaete* (Corticaceae, Aphyllophorales). – *Mycol. Mem.* 10. J. Cramer, Braunschweig.
- Burton, AR, Gidley. MJ, Fincher, GB (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology* 6: 724–732.

- Cabaleiro DR, Rodríguez-Couto S, Sanromán A, Longo MA (2002) Comparison between the protease production ability of ligninolytic fungi cultivated in solid state media. *Process Biochem* 37:1017–1023.
- Cabana, H, Jiwan JL, Rozenberg R, Elisashvili V, Penninckx M, Agathos SN, Jones JP, (2007a) Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere* 67: 770-778.
- Call HP, Mücke I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems (LignozymR process). *J Biotechnol* 1997; 53:163-202.
- Cameron MD, Timofeevski S, Aust SD (2000) Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:751–758.
- Cancel AM, Orth AB, Tien M (1993) Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 59:2909–2913.
- Castillo MdP, Ander P, Stenström J (1997) Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentation. *Biotechnol Tech* 11:701–706.
- Couto SR, Herrera JLT (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechno Adv* 24: 500-513.
- Dass SB, Dosoretz CG, Reddy CA, Grethlein HE (1995) Extracellular proteases produced by the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic and nonligninolytic conditions. *Arch Microbiol* 163:254–258.
- Dehorter B, Blondeau R (1992) Extracellular enzyme activities during humic acid degradation by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *FEMS Microbiol Lett* 94:209–215.
- Dominguez A, Rivela I, Rodríguez Couto S, Sanromán MA (2001) Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. *Proc Biochem* 37 549–554.
- DSouza DT, Tiwari R, Sah AK, Raghukumar C (2006) Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme Microb Technol* 38:504–511.
- Duarte-Vazquez MA, Whitaker JR, Rojo-Dominguez A, Garcia- Almendra´rez BE, Regalado C (2003) Isolation and thermal characterization of an acidic isoperoxidase from turnip roots. *J Agric Food Chem* 51:5096–5102.
- Durand A (2003) Bioreactor designs for solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13: 113-125.
- Durante D, Casadio R, Martelli L, Tasco G, Portaccio M, De Luca P, Bencivenga U, Rossi S, Di Martino S, Grano V (2004) Isothermal and nonisothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *J Mol Catal B-Enzym* 27: 191-206.
- Fenice M, Giovannozzi-Sermanni G, Federici and F, D'Annibale A (2003) Submerged and solid-state production of laccase and manganese-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive-mill wastewater-based media. *J Biotechnol* 100, 77–85.

- Ferraz A, Cordova AM, Machuca A (2003) Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. *Enzyme Microb Technol* 32:59–65.
- Gassara F, Brar SK, Tyagi RD, Verma M, Surampalli RY (2010) Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Eng J* 49: 388–394.
- Gassara F, Brar SK, Tyagi, RD, John RP, Verma M, Valero JR (2011) Parameter optimization for production of ligninolytic enzymes using agro-industrial wastes by response surface method. *Biotechnol Bioproc Eng* 16: 343-351.
- Gervais P, Molin P (2003) The role of water in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13: 85-101.
- Gianfreda L, Rao MA (2004) Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb Technol* 35: 339-354.
- Giovanelli G, Ravasini G (1993) Apple juice stabilization by combined enzyme membrane filtration process. *Lebensm.-Wiss. Technol* 26: 1–7.
- Gnanamania A, Jayaprakashvel M, Arulmani M, Sadulla S (2006) Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. *Enzyme Microbial Technol* 38:1017–1021.
- Gold MH, Alic M (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol Rev* 57:605–622.
- Gold MH, Youngs HL, Gelpke MDS (2000) Manganese peroxidase. In: Sigel A, Sigel H (eds) *Metal ions in biological systems*. Marcel Dekker Inc, New York, pp 559–586.
- Grgic I, Perdih A (2003) Stimulation of ligninolytic enzyme production in *Phanerochaete chrysosporium* by polyoxyalkanes. *Appl Environ Microbiol* 94:360–368.
- Hammel KE, Jenson KA, Mozuch MD, Landucci LL, Tien M, Pease EA (1993) Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *J Biol Chem* 268: 12274–12281.
- Hatakka A (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev* 13:125–135.
- Hirano T, Honda Y, Watanabe W, Kuwahara M (2000) Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:1958–2962.
- Hofrichter M (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb Technol* 30:454–466.
- Huang D, Zeng G, Peng Z, Zhang P, Hu S, Jiang X, Feng C, Chen Y (2008) Biotransformation of rice straw by *Phanerochaete chrysosporium* and related lignolytic enzymes. *Int J Biotechnol* 10:86–92.
- Huang QG, Weber WJ (2005) Transformation and removal of bisphenol A from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling reactions: efficacy, products, and pathways. *Environ. Sci Technol* 39: 6029–6036.
- Husain M, Husain Q (2008) Applications of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: a review. *Crit Rev Environ Sci Technol* 38:1–41.

- Husain Q (2006) Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. *Crit Rev Biotechnol* 60:201–221.
- Iwashita, K (2002) Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *J. Biosci. Bioeng.*, 94 : 530-535.
- Jiménez L, Pérez A, Torre MJDL, Moral A, Serrano L (2007) Characterization of vine shoots, cotton stalks, *Leucaena leucocephala* and *Chamaecytisus proliferus*, and of their ethyleneglycol pulps. *Bioresour Technol* 98:3487–3490.
- Junghanns C, Moeder M, Krauss G, Martin C, Schlosser D, (2005) Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology* 151: 45-57.
- Kaneko S, Cheng M, Murai H, Takenaka S, Murakami S, Aoki K (2009) Purification and characterization of an extracellular laccase from *Phlebia radiata* strain BP-11-2 that decolorizes fungal melanin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:939-942.
- Kapich AN, Prior BA, Botha A, Galkin S, Lundell T, Hatakka A (2004) Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME446. *Enz Microbial Technol* 34:187–195.
- Karam J, Nicell JA (1997) Potential applications of enzymes in waste treatment. *J Chem Technol Biotechnol* 69: 141-153.
- Kersten P, Cullen D (2007) Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics Biology* 44: 77–87.
- Kersten PJ, Witek C, Vanden Wymelenberg A, Cullen D (1995) *Phanerochaete chrysosporium* glyoxal oxidase is encoded by two allelic variants: structure, genomic organization, and heterologous expression of glx1 and glx2. *J Bacteriol* 177:6106–6110.
- Kerwin BA, Chang BS, Gregg CV, Gonnelli M, Li T, Stambini GB (2002) Interactions between PEG and type I soluble tumor necrosis factor receptor: modulation by pH and by PEGylation at the N terminus. *Protein Sci* 11:1825–1833.
- Keyser P, Kirk TK, Zeikus JG (1978) Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J Bacteriol* 135:790–797.
- Khiyami MA, Pometto AL III, Kennedy WJ (2006) Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in plastic composite support biofilm stirred tank bioreactors. *J Agric Food Chem* 8:1693–1698.
- Kim YJ, Nicell JA (2006a) Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. *Bioresour Technol* 97: 1431-1442.
- Kim YJ, Nicell JA (2006b) Laccase-catalyzed oxidation of aqueous triclosan. *J Chem Technol Biotechnol* 81: 1344-1352.
- Kim YJ, Nicell JA (2006c) Laccase-catalyzed oxidation of bisphenol A with the aid of additives. *Process Biochem* 41: 1029-1037.

- Kirk T K, Connors W J, Zeikus G (1976) Requirements for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. *Applied and Environmental Microbiol* 32: 192–194.
- Kirk TK (1985) The discovery and promise of lignin-degrading enzymes. In: The Marcus Wallenberg Foundation symposia proceedings: 2, New horizons for biotechnological utilization of the forest resource. Lectures given at the Marcus Wallenberg symposium in Falun, Sweden, pp 27–42.
- Larrondo LF, Canessa P, Vicuña R, Stewart P, VandenWymelenberg A, Cullen D (2007) Structure and transcriptional impact of divergent repetitive elements inserted within *Phanerochaete chrysosporium* strain RP-78 genes. *Mol Genet Genomics* 277: 43–55.
- Lee HB, Peart TE (2002) Organic contaminants in Canadian municipal sewage sludge. Part I. Toxic or endocrine-disrupting phenolic compounds. *Water Qual Res J Can* 37: 681-696.
- Lee HB, Peart TE, Gris G, Chan J (2002) Endocrine-disrupting chemicals in industrial wastewater samples in Toronto, Ontario. *Water Qual Res J Can* 37:459-472.
- Lee HB, Peart TE, Svoboda ML (2005) Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatographymass spectrometry. *J Chromatogr A* 1094:22-129.
- Leisola MSA, Kozulic B, Meussdoerfer F, Fiechter A (1987) Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 262:419–424
- Levin L, Herrmann C, Victor Papinutti L (2008) Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Bioch Eng J* 39: 207-214.
- Liu L, Lin Z, Zheng T, Lin L, Zheng C, Lin Z, Wang S, Wang Z (2009) Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme Microbial Technol* 44: 2009, 426-433.
- Maciel MJM, Silva AC, Ribeiro HCT 2010. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology* 13: ISSN: 0717-3458.
- Maier G, Frei M, Wucherpfennig K, Dietrich H, Ritter G (1994) Innovative processes for production of ultrafiltrated apple juices and concentrates. *Fruit Process* 5: 134–138.
- Mao L, Colosi LM, Gao S, Huang Q (2011) Understanding ligninase-mediated reactions of endocrine disrupting chemicals in water: reaction rates and quantitative structure-activity relationships 15;45(14):5966-5972.
- Martinez AT, Speranza M, Ruiz-Duenas FJ., Ferreira P, Camarero S, Guillen F (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microb* 8: 195–204.
- Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Sollewijn Gelpke MD, Huang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya P, Detter JC, Larimer F, Coutinho PM, Henrissat B, Berka R, Cullen D, Rokhsar D (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology* 22:695–700.

- Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, (1999) Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotech. Bioeng* 68: 98-105.
- Mester T, Field JA (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isoenzyme produced by *Bjerkandera sp.* strain BOS55 in the absence of manganese. *J Biol Chem* 273: 15412-15417.
- Mielgo I, Lopez C, Moreira MT, Feijoo G, Lema, JM (2003) Oxidative degradation of azo dye by manganese peroxidase under optimized conditions. *Biotech Prog* 19: 25.
- Minussi, RC, Pastore GM, Duran N (2002) Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 13: 205-216.
- Modaressi K, Taylor KE, Bewtra JK, Biswas N (2005) Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: Protective effect of PEG on enzyme activity. *Water Res* 39: 4309-4316.
- Mohan SV, Prasad KK, Rao NC, Sarma PN (2005) Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase catalyzed process. *Chemosphere* 58:1097-1105.
- Nannipieri, P, Bollag JM, (1991) Use of enzymes to detoxify pesticide contaminated soils and waters. *J Environ Qual* 20: 510-517.
- Neifar M, Elleouze-Ghorbel R, Kamoun A, Baklouti S, Mokni A, Jaouani A, Ellouze Chaabouni S (2011) Effective clarification of pomegranate juice using laccase treatment optimized by response surface methodology followed by ultrafiltration. *Journal of Food Process Engineering*, 34: 1199-1219.
- Nicell JA, Saad KW, Buchanan ID (1995) Phenol polymerization and precipitation of aqueous 4-chlorophenol. *J Chem Biotech*, 60: 203-215.
- O'Fagain C, (2003) Enzyme stabilization - recent experimental progress. *Enzyme Micro. Technol* 33 : 137-149.
- Osma JF, Saravia V, Toca Herrera JL, Rodriguez Couto S (2007) Mandarin peelings: the best carbon source to produce laccase by static cultures of *Trametes pubescens*. *Chemosphere* 67, 1677-1680.
- Pal M, Calvo AM, Terron MC, Gonzalez AE (1995) Solid state fermentation of sugar cane bagasse with *Flammulina velutipes* and *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11: 541-545.
- Palma JM, Pastori GM, Bueno P, Distefano S, del Río LA (1997) Purification and properties of cytosolic copper, zinc superoxide dismutase from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Free Radical Res* 26:83-91.
- Papinutti VL, Diorio LA, Forchiassin F (2003) Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: 157-160.
- Papinutti VL, Forchiassin F Lignocellulolytic (2007) enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation *J Food Eng* 81, 54-59.
- Passardi F, Bakalovic N, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M, Penel C, Dunand C (2007) Prokaryotic origins of the nonanimal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics* 89:567-579.

- Petkau A, Chelack WS, Pleskach SD, Meeker BE, Brady CM (1975) Radioprotection of mice by superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 65:886–893.
- Poyrazoglu E, Gokmen V, Artik N (2002) Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey *J Food Compos Anal* 15: 567–575
- Pozdnyakova NN, Rodakiewics-Nowak J, Turkovskaya OV, Haber J (2006) Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons catalyzed by blue laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 in the presence of synthetic mediators. *J Mol Catal B Enzym* 41, 8–15.
- Rahardjo YSP, Tramper J, Rinzema A (2006) Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechno Adv* 24: 161-179.
- Reddy GV, Babu PR, Komaraiah P, Roy KRRM, Kothari IL (2003) Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem* 38: 1457–1462.
- Regalado C, Garcia-Almendarcz BE, Duarte-Vazquez MA (2004) Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem Rev* 3:243–256.
- Rivela I, Rodríguez Couto S, Sanromán A(2000) Extracellular ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a new solid-state bioreactor *Biotechnol Lett* 22: 1443–144.
- Rodríguez Couto S, Moldes D, Liebanas A, Sanroman M A (2003) Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions. *Biochem Eng J* 15: 21–26.
- Rosales E, Rodríguez Couto S, Sanromán A (2007) Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on crushed orange peelings. *Enzyme Microb Technol* 40, 1286–1290.
- Ryan D, Leukes W, Burton S (2007) Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*. *Bioresou. Technol* 98, 579-587.
- Saito T, Kato K, Yokogawa Y, Nishida M, Yamashita N, (2004) Detoxification of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. *J Biosci Bioeng* 98: 64-66.
- Schlosser D, Hofer C (2002) Laccase-catalyzed oxidation of Mn²⁺ in the presence of natural Mn³⁺ chelators as a novel source of extracellular H₂O₂ production and its impact on manganese peroxidase. *Appl Environ Microbiol* 68: 3514–3521.
- Schuller DJ, Ban N, van Huystee RB, McPherson A, Poulos TL (1996) The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* 4:311–321.
- Siebert, KJ, (1999) Protein-polyphenol haze in beverages. *Food Technol* 53: 54–57.
- Singhania, R.R., Patel, K., Soccol, C.L., Pandey, A (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* 44:13–18
- Siripong P, Oraphin B, Sanro T, Duanporn P (2009). Screening of Fungi from Natural Sources in Thailand for Degradation of Polychlorinated Hydrocarbons. *American-Eurasian J Agric Environ Sci.*5 (4): 466-472.
- Stutz C (1993) The use of enzymes in ultrafiltration. *Fruit Process* 7: 248–252.

- Suzuki H, Hirai H, Murata H, Nishida T, (2003) Removal of estrogenic activities of 17-estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res* 37: 1972-1975.
- Tamagawa Y, Yamaki R, Hirai H, Kawai S, Nishida T, (2006) Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere* 65: 97-101.
- Tien M (1985) Marcus Wallenberg foundation symposia proceeding: 2; New horizons. Lectures given at the 1985 Marcus Wallenberg Symposium in Falun, Sweden.
- Tien M, Kirk TK (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science* 221:661-663.
- Tien M, Kirk TK (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 2280-2284.
- Tsutsumi Y, Haneda T, Nishida T (2001) Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 42, 271-276.
- Tychanowicz GK, De Souza DF, Souza CGM, Kadowaki MK, Peralta RM (2006) Copper improves the production of laccase by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Brazil Arch Biol Technol* 49:699-704.
- Valli K, Wariishi H, Gold MH (1990) Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. *Biochem* 29:8535-8539.
- Venkatadri R, Irvine RL (1990) Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 56:2684-2691.
- Verma P, Madamwar D (2002) Decolourisation of synthetic dyes by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiologica* 47: 283-286.
- Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv* 22:161-187.
- Work Assoc 34: 572-576.
- Xu FJ, Chen ZH, Li ZH (2001) Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam exploded straw as substrate. *Biores Technol* 80: 149-151.
- Yadav JS, Doddapaneni H, Subramanian V (2006) P450ome of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters. *Biochem Soc Trans* 34:1165-1169.
- Zaborsky OR, (1974) Immobilized Enzymes. CRC Press, Boca Raton, FL. 176 p.

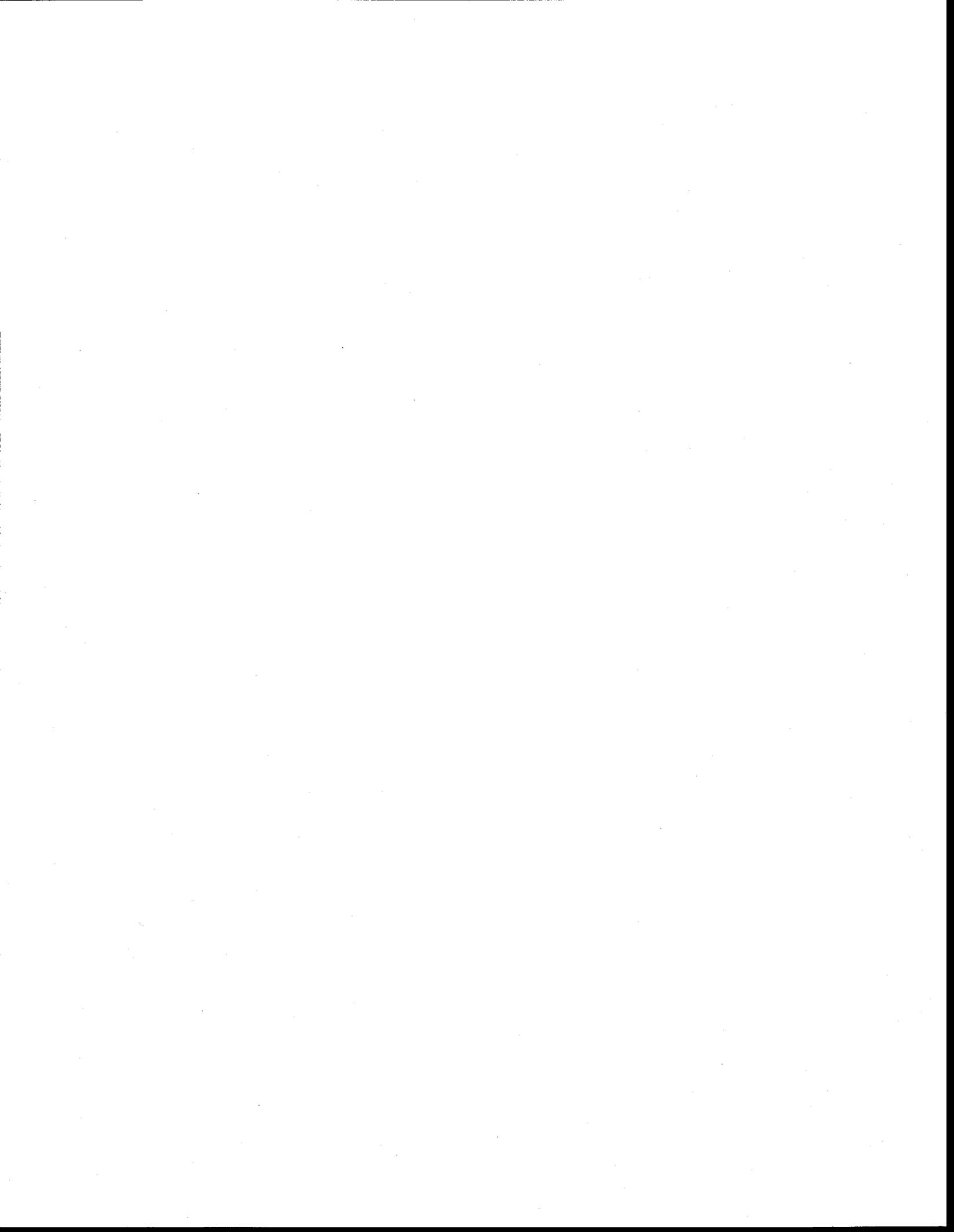
CHAPITRE II

DÉGRADATION BIOLOGIQUE DU BISPHÉNOL A DANS LES EAUX USÉES

Fatma Gassara, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, et J.R. Valéro

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

Environ. Rev. 19: 1–18 (2011), publié



RÉSUMÉ

La présence des substances toxiques dans l'eau peut avoir des effets néfastes sur les organismes vivants, à la suite d'une exposition directe ou indirecte des organismes à ces substances. Bisphénol A (BPA) est un parmi les produits chimiques qui sont périodiquement déchargés dans les eaux usées. Ce produit est un précurseur industriel primaire dans la fabrication de polycarbonates et de résines époxy. Ce composé est déchargé dans l'environnement (eau, sol et air) par différentes voies lors des processus de fabrication (en particulier pendant le chauffage, la manipulation et le transport des produits). Plusieurs types de traitement (physique, chimique et biologique) sont employés afin de dégrader le BPA présent dans les eaux usées. Cette revue met l'accent particulièrement sur sa dégradation par des procédés biologiques. Ces méthodes sont plus efficaces que les procédés physicochimiques. En effet, le traitement biologique offre une solution efficace et fiable pour l'élimination du BPA présent dans les eaux usées sans pollution secondaire. La dégradation enzymatique est le procédé le plus efficace et le plus utilisé ainsi qu'il ne demande pas l'ajout de nutriments pour la croissance microbienne. De plus, il permet d'éviter une accumulation de biomasse. En outre, cette technique est efficace même en utilisant de faibles quantités d'enzymes, et ne nécessite pas un processus de contrôle des conditions de traitement. Bien que l'utilité du traitement enzymatique soit de plus en plus approuvée, le procédé reste très coûteux compte tenu du prix élevé de la matière première et de la faible stabilité des enzymes. Dans ce contexte, la recherche d'une solution permettant la production des enzymes à un coût économique s'avère indispensable afin d'assurer l'élimination complète du BPA des eaux usées.

Mots clés : Bisphénol A, traitement enzymatique, traitement microbien, eaux usées, enzymes,

ABSTRACT

The presence of toxic substances in water lead to varied adverse impacts on living organisms through direct or indirect exposure. Bisphenol-A (BPA) is a toxic chemical which has been periodically discharged into the wastewater treatment plants. BPA is an industrial precursor used for the manufacture of polycarbonates and epoxy resins. This compound has been discharged in the environment (water, soil and air) by various means during the manufacturing processes (in particular during heating, handling and transport of products). Several treatment methods, such as physical, chemical and biological have been traditionally used to ensure higher removal of BPA from wastewater, albeit with lower removal or secondary pollution. In this context, this mini-review is an attempt to explore different aspects of research in the field of biological removal of BPA from wastewater. The biological treatment is generally more effective than the physico-chemical treatment as the former causes lower secondary pollution. Of various biological modes of treatment, enzymatic degradation is the most effective as it does not require addition of nutrients for the microbial growth. Thus, it prevents the accumulation of biomass in water. Moreover, this technique is effective even while using small quantities of enzymes and it does not require a process control of the treatment conditions. Although the utility of the enzymatic treatment is approved more and more, the process remains highly expensive due to the higher cost of the raw material and lower stability of enzymes. In this context, there is a need to find a solution for the economical production of enzymes to ensure the complete removal of BPA from wastewater in an eco-friendly manner.

Keywords: Bisphenol A, biological treatment, enzymes, removal, wastewater

INTRODUCTION

Les eaux usées et les boues d'épuration contiennent une grande variété de composés dissous minéraux et organiques. La majeure partie de ces polluants est éliminée par précipitation, coagulation - floculation, adsorption ou biodégradation. Cependant, il semble que certains produits pharmaceutiques et de soins ne sont pas éliminés par les filières classiques de traitement des eaux à potabiliser et d'épuration des eaux usées. Parmi ceux-ci, les perturbateurs endocriniens sont retrouvés dans divers milieux. Ces composés semblent avoir un effet négatif important sur l'homme et l'environnement en général. En effet, il est constaté que ces molécules génèrent des cancers, des problèmes de reproduction et de dérèglements hormonaux pouvant aller jusqu'à la féminisation d'espèces. Parmi ces perturbateurs endocriniens, on cite le bisphénol A (BPA) dont les études ont confirmé ses effets oestrogéniques ainsi que ses effets sur le comportement reproductif des animaux et des organismes aquatiques. BPA est un composé généralement employé dans la fabrication des résines époxydes et des plastiques. En raison de sa production à grande échelle et des utilisations répandues au Canada, le BPA est déchargé dans l'atmosphère par l'air, la terre et l'eau. Les données actuelles indiquent que le niveau d'exposition au BPA est en deçà de la dose journalière temporaire admissible établie par Santé Canada. Les eaux usées des stations municipales du Canada contiennent de fortes concentrations de BPA atteignant 91,27 µg/kg (Lee *et al.* 2002). Des concentrations de BPA atteignant 40 000 µg/kg (poids sec) ont aussi été relevées dans les boues d'épuration des stations municipales échantillonnées à l'échelle du Canada (Lee et Peart 2002). Pour toutes ces raisons, ce composé doit être éliminé des eaux usées et des boues d'épurations. Différentes méthodes d'élimination de ce perturbateur endocrinien peuvent être employées. Premièrement, le BPA a été éliminé par des méthodes physicochimiques utilisant des substances chimiques (ozone, chlore, fer...) ou des forces physiques (UV, filtration...) pour dégrader ou éliminer le BPA présent dans le milieu traité. Ces méthodes sont incapables d'éliminer complètement ce produit et provoquent une pollution secondaire du milieu traité. Deuxièmement, le BPA peut être éliminé par des méthodes biologiques faisant intervenir des microorganismes (bactéries, champignons, levures) ou directement par des enzymes. Cette revue présente les différentes méthodes de dégradation biologique du BPA présent dans les eaux usées tout en signalant leurs avantages et leurs désavantages.

DÉGRADATION MICROBIENNE DU BPA PRÉSENT DANS LES EAUX USÉES

Bactéries

Le traitement microbiologique est l'un des procédés les plus utilisés dans le traitement de matrices environnementales (eau, sol, boues) contaminées par différents produits chimiques toxiques (colorants, HAP, explosifs, etc.). Plusieurs raisons peuvent expliquer le recours à ce traitement. D'abord, Il existe de nombreuses bactéries capables de dégrader des produits chimiques. Ces microorganismes sont largement présents dans le milieu aquatique, le sol et les boues (Ike *et al.* 2000). Ensuite, ce traitement facile ne nécessite pas trop d'investissement, car les bactéries sont omniprésentes dans le milieu naturel. Enfin, les bactéries utilisées sont généralement non spécifiques, ce qui leur permet d'agir sur plusieurs substances toxiques à la fois. En revanche, leur utilisation est toutefois limitée par différents éléments. D'une part, les bactéries sont sensibles aux conditions environnementales (pH, température, salinité, concentrations, présence de composés toxiques), ce qui nécessite un contrôle rigoureux du procédé. D'autre part, la non spécificité de ces bactéries, permet de favoriser la production de composés «indésirables», résultant des réactions parallèles des procédés physico-chimiques traditionnels. De plus, les composés formés par biocatalyse peuvent s'avérer plus toxiques que les produits initiaux (Yoshihara *et al.* 2002).

L'intérêt de la dégradation microbiologique des perturbateurs endocriniens s'est accru durant ces dernières années. Dans cette optique, le BPA est l'un des perturbateurs endocrinien qui possède une grande activité ostrogénique (Krichman *et al.* 1993) et une toxicité élevée (Alexander *et al.* 1988). C'est pour cette raison que la dégradation de ce composé est devenue de plus en plus importante. Dans le même contexte, plusieurs études ont identifié des bactéries capables de dégrader BPA (Ike *et al.* 2000; Kang et Kondo 2002a; Sasaki *et al.* 2005; Sakai *et al.* 2007; Lobos *et al.* 1992; Spivack *et al.* 1994). Cela a rendu possible l'utilisation du procédé microbien dans le traitement des eaux usées et des boues d'épuration contaminées par ce perturbateur endocrinien. Le tableau 2.1 présente en détaille les souches bactériennes pures utilisées dans la dégradation du BPA dans les eaux usées.

Streptomyces sp

Streptomyces sp est une bactérie isolée de l'eau de rivière, des sols..Elle est douée d'une activité de dégradation de BPA en conditions aérobiques. Kang et konodo, 2004 ont réalisé une dégradation du 1mg/l de BPA par une suspension de *Streptomyces sp* à 30°C durant 10 jours.

La demi-vie du BPA est de 3 à 4 jours et son taux de dégradation est supérieur à 90 % après 10 jours.

D'après cette étude, *Streptomyces sp* est une des rares bactéries isolées de l'eau de rivière, possédant une forte activité de dégradation de BPA. Toutefois, cette activité est limitée pour des concentrations élevées de ce contaminant. De plus, la dégradation du BPA, par cette bactérie, reste un traitement très lent et peu efficace. De fait, on ne peut pas utiliser cette souche toute seule pour la purification de l'environnement aquatique contaminé par BPA.

Sphingomonas paucimobilis FJ-4

Sphingomonas paucimobilis FJ-4 est isolée d'une boue obtenue du traitement des eaux usées d'une industrie de fabrication d'époxy résine. Selon Ike *et al.* 2000, l'incubation de 87 µM de BPA avec cette souche, durant 14 jours, permet la dégradation de 100% de la molécule initiale. Cependant, cette souche dégrade uniquement 70 à 80% du carbone total dérivé du BPA et synthétise deux produits qui ne peuvent pas être dégradés, même si on prolonge la durée de dégradation d'un mois. Ces deux métabolites sont le 2,3-bis (4-hydroxyphenyl)-1,2-propanediol et le *p*-hydroxyphenacyl alcohol. La voie de dégradation du bisphénol A par la souche *Sphingomonas paucimobilis* FJ-4 est présentée en détails dans la figure 2. 1.

Au total, *Sphingomonas paucimobilis* FJ-4 est douée d'une grande activité de dégradation du BPA. Néanmoins, cette activité est insuffisante pour métaboliser les produits intermédiaires de dégradation, qui ont tendance à s'accumuler et à provoquer une pollution secondaire du milieu de dégradation. A cette fin, le recours à d'autres bactéries capables de dégrader les produits d'accumulation, demeure indispensable. Qui plus est, le procédé de dégradation faisant intervenir cette souche reste très lent. De ce point de vue, l'utilisation de *Sphingomonas paucimobilis* FJ-4 dans le traitement des eaux usées contaminées par BPA est un projet non rentable. La figure présente en détaille la voie de dégradation du BPA par *Sphingomonas paucimobilis* FJ-4.

Pseudomonas sp. et Pseudomonas putida

Pseudomonas sp et *Pseudomonas putida* sont deux bactéries isolées de plusieurs origines, l'eau de rivière, les sols (Kang et Konodo, 2002a).... Ces deux souches sont douées d'une forte activité de dégradation de BPA (100% après contact de 15 jours). Toutefois, ces deux souches sont inhibées par de fortes concentrations de BPA. En plus, cette méthode est lente même dans le traitement de faibles concentrations de BPA. Par conséquent, une eau contaminée par de fortes quantités de BPA sera intraitable par ces deux souches.

Sphingomonas sp. strain AO1

Sphingomonas sp. strain AO1 est une nouvelle espèce bactérienne caractérisée par une homologie de séquence ADNr 16S et une hybridation ADN-ADN au niveau du génome. Cette souche isolée d'un sol situé à Tsu kuba au Japon (Sasaki *et al.* 2005), peut se développer dans un milieu contenant la molécule du BPA et s'en servir comme une source de carbone.

Sasaki *et al.* 2005 ont évalué la capacité de cette espèce à dégrader BPA, le mécanisme de dégradation et les enzymes impliquées dans ce mécanisme. D'après ces auteurs, cette souche est capable de dégrader complètement $115 \mu\text{g ml}^{-1}$ de BPA, au bout de 6 heures. Ils ont montré que les produits de dégradation sont les mêmes que ceux trouvés par d'autres bactéries déjà étudiées (Mv1, *Pseudomonas paucimobilis* FJ-4 ...). La voie de dégradation est montrée dans la figure 2. 1. Cependant, le mécanisme de dégradation du BPA, à travers cette espèce, implique le système cytochrome P450 (un système d'enzymes induit dans l'hydroxylation, l'halogénéation et l'époxydation des xénobiotiques) dans la première étape de dégradation. La voie de dégradation du bisphénol A par la souche *Sphingomonas sp.* strain AO1 est présentée en détails dans la figure 2. 2.

Sphingomonas sp. strain AO1 est une bactérie qui peut être utilisée avec succès dans les procédés d'épuration des eaux usées. En effet, ce microbe est capable de dégrader complètement le BPA sans accumulation de produits de dégradation, contrairement aux autres bactéries possédant une activité insuffisante pour mener une dégradation complète de la molécule. De plus, le procédé de dégradation basé sur cette espèce, est l'un des plus rapides de tous les traitements bactériens du BPA.

Sphingomonas sp. strain BP7

Sphingomonas sp. strain BP7 est l'une des rares bactéries isolées de l'eau de mer, présentant une activité de dégradation du BPA. Elle est capable d'utiliser cette molécule comme seule source de carbone nécessaire pour son énergie.

En se référant à Sakai *et al.* (2007) et Yamanaka *et al.* (2008), l'incubation de $876 \mu\text{M}$ de BPA, avec cette souche, pendant 30 jours, à 27°C , permet la dégradation de 95% de la molécule initiale. Les principaux produits de dégradation sont le HAP et le p-hydroxybenzoic acid (HBA). Le HBA est minéralisé plus rapidement que HAP, et qui tend à s'accumuler dans le milieu et participe à l'inhibition de la croissance de la souche. La voie de dégradation du BPA par *Sphingomonas sp.* strain BP7 est présentée en détails dans la figure 2. 3.

L'utilisation de *Sphingomonas sp.* strain BP7 dans la dégradation du BPA, présente plusieurs avantages. En effet, cette souche est douée d'une activité importante de dégradation de ce composé. De plus, ce microorganisme possède une membrane imperméable aux substances chimiques, qui lui permet de résister à la toxicité du BPA. En revanche, l'utilisation de cette souche souffre de quelques limites. D'un côté, elle est incapable de dégrader complètement le BPA et d'un autre côté le procédé de dégradation basé sur cette souche est très lent. Dans ce cas, et pour accélérer la dégradation, on peut utiliser d'autres bactéries en parallèle avec *Sphingomonas sp.* strain BP7. Il est aussi possible d'ajouter des nutriments qui accélèrent la dégradation de 4-HAP, caractérisant l'étape limitante de dégradation.

Bactérie gram-1 souche MV1

La souche Mv1 est un bacille gram négatif aérobie qui se développe sur le BPA comme source unique de carbone et d'énergie. Cette souche est isolée d'une boue obtenue d'une station de traitement des eaux usées d'une industrie de fabrication de plastique (Lobos *et al.* 1992; Spivack *et al.* 1994). Le BPA est métabolisé par la souche Mv1, grâce à une voie mettant en jeu différents réarrangements oxydatives du groupement méthyle aliphatique de la molécule.

D'après Lobos *et al.* 1992; Spivack *et al.* 1994, le contact de 1,5 mM de BPA avec la souche Mv1, pendant trois heures, permet la dégradation de 80 à 90 % du BPA initial.

L'analyse du carbone total issu de la dégradation du BPA montre que 60% du carbone est minéralisé en CO₂, 20% étant associé aux cellules bactériennes et 20 % étant transformé en substances organiques solubles. Les résultats présentés sur la figure 2. 4 montrent que la part la plus importante du BPA est dissociée en acide 4-hydroxybenzoïque et en 4- hydroxy acétophénone qui sont directement minéralisés en CO₂ ou bien consommés par les cellules bactériennes.

L'utilisation de la souche Mv1 dans la biodégradation du BPA, présente plusieurs avantages. D'abord, cette souche est largement présente dans les stations d'épuration des eaux des industries de fabrication de plastique, là où le BPA est rejeté en quantités importantes. Ensuite, d'après la voie de dégradation proposée par Spivack *et al.* 1994, il n'y a pas d'accumulation de produits présentant un danger pour la santé et l'environnement. Enfin, cette souche est douée d'une activité importante de dégradation du BPA, par rapport aux autres souches.

En revanche, l'utilisation de cette bactérie est limitée par différents éléments. Premièrement, la souche Mv1 est incapable de dégrader complètement le BPA. C'est pour cette raison que le traitement de ce perturbateur endocrinien, par cette souche Mv1, ne peut pas être employé dans

l'épuration des eaux usées. Par contre, on peut utiliser cette bactérie en parallèle avec d'autres souches ou un procédé chimique, afin d'assurer une élimination complète du BPA et de son activité oestrogénique. Deuxièmement, la biodégradation du BPA, par cette bactérie, est accompagnée d'une accumulation de plusieurs analogues de BPA et qui sont, par la suite, partiellement dégradés par Mv1. Ces analogues peuvent constituer une source de pollution secondaire des milieux naturels. Troisièmement, l'isolement de cette souche est accompagné par quelques difficultés qui se manifestent, surtout, du fait que Mv1 est fragile à la toxicité des produits chimiques (BPA) présents dans le milieu (Sakai *et al.* 2007). La voie de dégradation du bisphénol A par la souche Mv1 est présentée en détails à la figure 2.4.

Achromobacter xylosoxidans B-16

Achromobacter xylosoxidans B-16 est une bactérie isolée récemment à partir d'un compost de déchets solides municipaux d'un réacteur de format de laboratoire. Il s'agit d'une bactérie gram négatif qui peut se développer sur le BPA, comme source unique de carbone, en aérobie.

Zhang *et al.* 2007 ont étudié la capacité de cette souche à dégrader le BPA et l'effet des conditions environnementales sur cette dégradation. Selon ces auteurs, une incubation de 88µM de BPA, avec cette souche, pendant 4,5 jours, à 30°C et à pH 7, permet l'élimination de 25 % de la molécule de départ. La dégradation est influencée par plusieurs facteurs (la taille de l'inoculum, la concentration du substrat, la température et le pH). Les principaux produits de dégradation, présentés dans la figure 2. 5 sont l'acide p-hydroxybenzoïque, le p-hydroquinone et le p-hydroxybenzaldéhyde.

Achromobacter xylosoxidans B-16 est douée d'une activité de dégradation du BPA. Néanmoins, cette activité est insuffisante pour dégrader complètement ce contaminant. De plus, l'activité de dégradation et la croissance cellulaire de cette souche sont inhibées par de fortes concentrations de ce composé. En outre, l'opération de dégradation est très lente et nécessite trop de contrôle des conditions environnementales. Pour toutes ces raisons, cette souche ne peut pas être utilisée dans l'épuration des eaux usées et des boues contaminées par le BPA. La figure 2.5 présente en détails la voie de dégradation du BPA par *Achromobacter xylosoxidans B-16*.

Champignons

L'intérêt scientifique pour l'utilisation des champignons et de leurs enzymes dans des applications environnementales bioénergétiques, analytiques et de synthèse, s'est accru de façon remarquable au cours de ces dernières années (Couto et Herrera 2006). Cet intérêt est motivé par la présence de ces microorganismes dans un grand nombre d'environnements

naturels, par le système d'enzymes oxydatives unique sécrété par ces champignons de façon constante et par leur croissance rendue possible en utilisant des substrats peu onéreux (Gianfreda et Rao 2004). Dans le même contexte, l'élimination des substances chimiques perturbatrices du système endocrinien par les champignons et leurs enzymes a été présentée dans de nombreuses études. Ces substances chimiques peuvent avoir des effets négatifs sur la santé des organismes présents dans les milieux récepteurs. Cet effet est dû à la capacité de ces substances chimiques à imiter les hormones endogènes des êtres vivants. Les perturbateurs endocriniens de type alkylphénoliques (nonylphénol, bisphénol..), les esters d'acide phtalique (dibutylphtalate, diethylphtalate et le di-(2-éthylhexyl) phtalate), les oestrogènes naturelles et synthétiques (17-estradiol, estriol et le 17-éthynylestradiol) et les phytoestrogènes (sitostérol et la génistéine) ont été éliminés par différentes souches fongiques. Différents champignons ont démontré une grande efficacité d'élimination de ces substances dans des solutions aqueuses et dans des sols, via des systèmes lignolytiques et non-lignolytiques. La transformation de ces polluants, par ces souches fongiques et leurs enzymes, est stimulée par des connaissances émergentes en biochimie et en physiologie microbienne, relatives à ces organismes et aux propriétés biocatalytiques de leurs enzymes. Finalement, compte tenu de la diversité de conditions pouvant être rencontrées dans des matrices environnementales réelles et ce, comparativement aux conditions testées en laboratoire, il est impératif de développer des biotechnologies robustes et fiables se basant sur ces souches fongiques et leurs enzymes, pour le traitement de ces matrices contaminées par des perturbateurs du système endocrinien.

Stereum hirsutum et Heterobasidium insulare

Deux basidiomycètes dégradant la lignine *Stereum hirsutum* et *Heterobasidium insulare* ont été utilisés par Lee *et al.* (2005), pour dégrader du BPA. Ces deux souches fongiques ont été incubées dans une solution aqueuse contenant 200 ppm de BPA à 30 °C pendant 14 jours. Les résultats obtenus suggèrent que les deux souches résistent au BPA, et leur structure micellaire est complètement développée après 8 jours. Il faut une durée de 7 à 14 jours pour dégrader complètement BPA. L'activité oestrogénique des produits de dégradation est beaucoup plus faible que celle du BPA. Selon Lee *et al.* 2005, la présence de BPA n'a pas induit la sécrétion d'enzymes lignolytiques LMEs dans les milieux de culture de *Stereum hirsutum* et *Heterobasidium insulare*, suggérant que d'autres enzymes puissent être impliquées dans la transformation de BPA. Cette observation a été corroborée par l'identification des métabolites produits pendant la fermentation. Les produits détectés, les plus abondants, étaient l'acide 2-hydroxy-3-phenyl propanoic, 1-ethenyl-4-methoxybenzene, l'acide phénylacétique et son dérivé hydroxylé à la position C2. Ces composés sont obtenus à partir de la partie phénolique de BPA

à travers, respectivement, une dehydroxylation, une carboxylation, et une hydroxylation sur la chaîne latérale. Ces métabolites n'ont été jamais détectés en utilisant les enzymes lignolytiques. L'activité oestrogénique de l'effluent contenant le BPA traité, a été suivie en utilisant l'analyse d'E-écran qui est basée sur la prolifération des cellules Mcf-7 (Soto *et al.* 1995). Avec *S. hirsutum*, une réduction de 40% de l'activité oestrogénique a été obtenue après une incubation d'un jour dans une solution contenant 100 µM de BPA. Toute l'activité oestrogénique a été éliminée après 3 jours. Par contre, toute l'activité oestrogénique de la même solution a été enlevée après une culture d'un jour avec *H. insulare* (Lee *et al.* 2005).

Pleurotus ostreatus O-48

Pleurotus ostréatus est une souche fongique caractérisée par sa capacité à dégrader la lignine. Cette souche dégrade également des hydrocarbures polycycliques (fluorène, anthracène, Pyrène).

Hirano *et al.* (2000) ont réalisé une dégradation du BPA, en faisant croître des mycéliums d'un basidiomycète (*Pleurotus ostréatus*) dans un milieu contenant 0,5% de glucose, 0,2% de peptone, 0,01% d'extrait de levure et 0,4 mM de BPA. Une dégradation de 80% de BPA a été observée au bout de 12 jours. Les principaux produits de dégradation sont 4-isophénylphénol, 4-isopropylphénol et l'hexestrol.

La dégradation du BPA, par ce champignon, est suivie de l'accumulation d'un produit possédant une activité oestrogénique plus élevée que celle du BPA, dont l'élimination est indispensable. Cette souche ne peut donc pas être utilisée seule dans le traitement des eaux usées et des boues d'épuration; elle doit être accompagnée d'une autre souche, ou d'un traitement physicochimique qui détruit les produits de dégradation toxiques. La voie de dégradation du BPA par *Pleurotus ostréatus* est présentée en détails dans la figure 2. 6.

Phanerochaete chrysosporium ME-446 et Trametes versicolor IFO-6482

Phanerochaete chrysosporium ME-446 et *Trametes versicolor* IFO-6482 sont deux champignons dégradant la lignine et produisant deux enzymes ; une laccase et une manganèse peroxydase. Tsutsumi *et al.*, 2001, ont étudié la dégradation du BPA par un mélange de deux champignons . *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 et *Trametes versicolor* IFO-6482 ont été incubées dans une solution contenant 220 µM de BPA pendant 7 jours. Les résultats obtenus montrent que les deux champignons résistent au BPA et se développent normalement. De plus, une dégradation complète du BPA a été observée après 7 jours.

Algues

Les microalgues sont des microorganismes qui ont été utilisés dans des processus de traitement d'élimination de l'azote et du phosphore présents dans les eaux usées (Oswad 1988). Elles peuvent être utilisées également dans l'élimination de différents polluants, comme les métaux lourds (Nagase *et al.* 1997; Nagase *et al.* 2001). Certaines espèces de microalgues sont capables d'éliminer les phénols toxiques comme BPA sans addition d'aucune source de carbone. Ces espèces peuvent se développer phototrophiquement sur le BPA et utiliser le CO₂ comme source de carbone.

Hirooka *et al.* (2003) ont étudié la capacité d'une espèce d'algues *Chlorella fusca* à éliminer le BPA à des concentrations standards de rejet dans l'environnement (40 µM) dans des conditions phototrophiques. Les résultats trouvés montrent que cette algue est capable de dégrader 85% de BPA, après une durée d'incubation, en présence de la lumière de 120 min. Par contre, le taux de dégradation est beaucoup plus faible en absence de lumière (22±3%). Ceci prouve bien que cette espèce nécessite la lumière pour dégrader le BPA.

Ishihara et Nakajima (2003) ont étudié l'élimination des polluants marins, notamment le BPA, en utilisant des algues marines. Les résultats montrent que l'incubation de 24 µM de BPA, avec 0,5 g d'algues de *Nannochloropsis sp.*, pendant 6 jours, à 20%, est accompagnée par l'élimination de 87% du BPA initial (53% accumulé dans les cellules d'algues et 34% dégradé). Le traitement de la même quantité de BPA dans les mêmes conditions que précédemment par 0,5 g de *Chlorella gracilis* a permis l'élimination de 66% du BPA initial (25% accumulé dans les cellules d'algues et 41% dégradé). Les deux espèces d'algues sont capables d'éliminer le BPA en l'accumulant durant la période d'incubation.

La décomposition du BPA, en utilisant les algues, est l'une des méthodes possibles de dégradation. En effet, les algues sont capables d'éliminer BPA présent dans l'eau tout en utilisant le CO₂ comme source de carbone, contrairement aux bactéries qui nécessite l'ajout d'une source de carbone organique pour maintenir la croissance et la capacité d'éliminer les composants phénoliques, comme le BPA. Par contre, cette méthode possède quelques limitations. Premièrement, elle nécessite beaucoup de temps pour éliminer complètement le BPA. Deuxièmement, le BPA éliminé du milieu est transféré aux cellules algales. Par conséquent, la toxicité du BPA persiste, elle est uniquement transférée d'un milieu à un autre.

Culture mixte de microorganismes

Les enzymes lignolytiques sont des enzymes capables de dégrader le BPA et plusieurs autres contaminants émergents (Huang et Weber, 2005, Cajthaml *et al.* 2009). Ces enzymes

lignolytiques sont produites par les champignons de la pourriture blanche de bois (Erkurt et al. 2010, Gassara *et al.* 2010). La co-culture des microorganismes permet l'amélioration de la production de ces enzymes dégradant le BPA.

La culture mixte des microorganismes consiste à faire croître deux ou plusieurs microorganismes sur le même milieu de culture et dans les mêmes conditions de croissance. Ce type de culture possède plusieurs avantages. Une culture mixte de champignons peut assurer une assimilation plus efficace du substrat, une augmentation de la productivité des métabolites souhaités, une meilleure adaptation à l'évolution conditions environnementales, et une plus grande résistance à la contamination par des micro-organismes indésirables (Salmon et Bull, 1984). Les avantages des cultures mixtes sont plus importants dans les cultures solides. En effet, la culture mixte des microorganismes sur des milieux solides facilite la colonisation des microorganismes, la pénétration et la dégradation du substrat. La dégradation du substrat se fait par une association symbiotique où chaque espèce constitue sa propre niche pour la culture et la dégradation des substrats en produisant ces propres enzymes et agit en synergie avec les enzymes produites par l'autre espèce. Dans le cas des déchets lignocellulosiques, la complexité du substrat préconise l'incorporation d'un certain nombre d'enzymes produits par différents micro-organismes pour permettre au processus de biodégradation de se produire.

La culture mixte des microorganismes est un moyen d'améliorer l'hydrolyse des résidus lignocellulosiques. Plusieurs tentatives ont été faites pour améliorer la production des enzymes lignolytiques par culture mixte des champignons. La production de la laccase par *T. versicolor* a été augmentée en cultivant cette souche avec *Trichoderma harzianum* et des bactéries (Baldrian, 2004). De plus, il a été reporté que la fermentation submergée de son de blé par des monocultures *C. unicolor* produit 98U ml⁻¹ de laccase alors que les monocultures de *P. robustus* ne produit que 5U ml⁻¹ d'activité enzymatique. Cependant, la culture mixte de ces deux champignons dans les mêmes conditions de culture a produit presque 2 fois plus d'activité de laccase. En outre, l'induction de nouvelles enzymes a été observée dans les co-cultures de *Pleurotus ostreatus* avec *Trichoderma longibrachiatum* (Velazquez-Cedeno *et al.* 2004) et les co-cultures de *Trametes. sp* AH28-2 avec une souche de *Trichoderma* (Zhang *et al.* 2006). La Laccase a été considérablement stimulée dans la co-culture de *P. ostreatus* avec *Ceriporiopsis subvermispora*. Alors que l'activité de la manganèse peroxydase a été fortement stimulée dans les co-cultures de *P. ostreatus* avec *C. subvermispora* ou avec *Physisporinus rivulosus* (Chi *et al.* 2007). *Phanerocheate chryso sporium* a été cocultivé avec *Pleurotis ostreatus* sur des

déchets de son de blé et cosse de margousier (neem). Cette culture mixte des microorganismes sur des déchets lignocellulosiques a permis de produire de grandes quantités d'enzymes lignolytiques (772 U/g de laccase, 982 U/g de manganèse peroxydase et 656 U/g de lignine peroxydase) (Verma et Madamwar, 2002). La production d'enzymes lignolytiques dans la culture mixte est deux à trois fois plus que celle dans la monoculture. L'amélioration de la production d'enzymes lignolytiques au cours de la culture mixte de *P. ostreatus* et *P. chrysosporium* a indiqué le rôle de synergie des microorganismes dans la dégradation des déchets lignocellulosiques (Sutherland *et al.* 1983).

La culture mixte des microorganismes semble être utile pour une surproduction d'enzymes lignolytiques. La surproduction des enzymes permettra une bonne dégradation des contaminants émergents par l'action de plusieurs enzymes lignolytiques à savoir : la Lignine peroxydase, manganèse peroxydase, laccase, versatile peroxydase parmi d'autres qui peuvent travailler ensemble en synergie et dégrader convenablement les contaminants émergents comme bisphénol A.

DÉGRADATION ENZYMATIQUE DU BPA PRÉSENT DANS LES EAUX USÉES

Généralités

De nouvelles stratégies de biorestauration basées sur la catalyse enzymatique ont été développées ces dernières années pour le traitement de matrices environnementales (eau, sol, boues) contaminées par différentes substances chimiques toxiques (colorants, HAP, explosifs, perturbateurs endocriniens...). Plusieurs raisons peuvent expliquer le recours à ces stratégies dans le traitement de solutés contaminés par des substances toxiques comme BPA : en effet, l'augmentation de l'utilisation de ces biocatalyseurs dans des procédés d'élimination de polluants organiques de différentes concentrations (Karam et Nicell 1997). En plus, la présence de plusieurs substances toxiques dans l'environnement peut avoir de nombreux effets écologiques et sanitaires néfastes. Ces substances nécessitent des méthodes rapides et efficaces d'élimination à moindre coût (Karam et Nicell 1997). En outre, les produits intermédiaires de dégradation sont souvent plus toxiques que les produits initiaux. Pour cela, il faut chercher d'autres méthodes générant des produits de dégradation plus acceptables de point de vue environnemental (Couto et Herrera 2006; Ahuja *et al.* 2004). De plus, la création de techniques récentes de génie génétique permet une production plus rapide et à moindre coût d'enzymes (Karam et Nicell 1997). Ainsi, la spécificité de ces catalyseurs permet de limiter la production de composés indésirables résultants des réactions parallèles des procédés physico-

chimiques traditionnels (Ahuja *et al.* 2004; Karam et Nicell 1997). De même, le traitement par ces catalyseurs évite la pollution secondaire du milieu traité, car ces derniers sont biodégradables (Karam et Nicell 1997).

Le traitement des substances toxiques (perturbateurs endocriniens) par des enzymes possède plusieurs avantages. En effet, ces protéines sont caractérisées par la spécificité aux substrats qu'elles peuvent utiliser, par leur fonction spécifique de catalyseur, par leur capacité d'être utilisées sur une large gamme de conditions environnementales (pH, température, salinité, concentrations, présence de composés toxiques), par leur faible sensibilité à la présence d'inhibiteurs et à la variation des conditions du milieu, et par la simplicité et la facilité de contrôle des procédés utilisant des enzymes (Ahuja *et al.* 2004; Gianfreda et Rao 2004; Karam et Nicell 1997; Nannipieri et Bollag 1991). En revanche, l'utilisation de ces catalyseurs est toutefois limitée par différents éléments qui se résument par les coûts associés à la production, l'isolement et la purification de ces enzymes limitant leur utilisation. De plus, de nouvelles technologies de purification ont été développées pour faciliter l'isolement et la purification des protéines enzymatiques. Toutes ces techniques ont permis de diminuer le coût de production des enzymes et de rendre leur utilisation plus facile.

Le traitement basé sur les enzymes est plus avantageux que celui basé sur les souches pures. D'une part, les enzymes sont douées d'une spécificité plus grande que celle des souches pures. D'autre part, les enzymes sont plus faciles à manipuler que les souches pures. Enfin, la concentration du catalyseur ne dépend pas de la concentration bactérienne (Nicell *et al.* 1995; Aitken 1993).

Enzymes impliquées dans la dégradation du BPA

Il existe plusieurs systèmes enzymatiques doués d'une activité de dégradation du BPA. Ces systèmes enzymatiques sont d'origines différentes : bactérienne, végétale et fongique. Toutefois, les principales enzymes impliquées dans les procédés d'élimination des substances chimiques toxiques, notamment le BPA, sont les enzymes lignolytiques (LMEs). Ces enzymes forment un système oxydative unique ayant la capacité d'oxyder la lignine sécrétée par des champignons responsables de la pourriture blanche du bois (white rot fungi, WRF). La lignine est un polymère hétérogène, complexe et stable. La structure hétérogène de la lignine prouve que les enzymes lignolytiques possèdent la capacité d'oxydoreduction des substrats de structures chimiques variées possédant des potentiels redox élevés. Cette capacité oxydative non-spécifique ainsi que leur potentiel redox élevé représentent des caractéristiques

intrinsèques de ces protéines, favorisant leur utilisation dans des biotechnologies environnementales.

Ce système enzymatique est généralement constitué de deux peroxydases, la lignine (LiP) et la manganèse (MnP) peroxydase et d'une phénoloxydase, la laccase (Pointing 2001). Le tableau 2. 2 présente en détaille les WRF et leurs enzymes utilisées dans la dégradation du BPA présent dans les eaux usées.

La peroxydase

Les peroxydases sont des enzymes contenant un groupement prosthétique composé de protoporphyrine possédant un atome de fer (hème). Elles sont responsables de l'oxydation de nombreux substrats et elles utilisent le peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'électron. La figure 2. 7 présente le cycle catalytique général de ces peroxydases. La peroxydase, sous sa forme originale, avec son hème sous la forme ferrique (Fe(III)), se lie au peroxyde d'hydrogène pour former le composé I. Ce dernier est appauvri de 2 électrons : l'un est formé avec un atome d'oxygène du peroxyde d'hydrogène. Cette disposition produit un composé radicalaire cationique. C'est ce composé I qui est responsable de l'oxydation d'une molécule de substrat (ce substrat varie selon le type de la peroxydase). Cette étape oxydative implique le transfert d'un électron et d'un proton et résulte en un site catalytique ayant la forme du composé II. Une seconde molécule de substrat est par la suite oxydée, ce qui résulte en la production d'une molécule d'eau et la réduction de l'enzyme en sa forme originale.

La lignine peroxydase (LiP) est une peroxydase N-glycolysée possédant une masse moléculaire entre 38 et 47 kDa et un potentiel redox de l'ordre de +1450 mV (Wesenberg et al. 2003). Cette enzyme catalyse l'oxydation de nombreux composés aromatiques phénoliques. La LiP est capable de catalyser les réactions suivantes : l'oxydation de l'alcool benzylique, le clivage de chaînes latérales, l'ouverture de cycles aromatiques, la déméthoxylation et la déchlorination (Gold et Alic. 1993). La LiP a été utilisée dans des applications bio-environnementales pour l'élimination de HAPs et des perturbateurs endocriniens (Gianfreda et Rao 2004; Kimura *et al.* 2004)

La manganèse peroxydase (MnP) est la peroxydase la plus sécrétée par les WRF (Hofrichter 2002), ayant un poids moléculaire se situant entre 32 et 62,5 kDa et un potentiel redox typique de l'ordre de +1510 mV (Wesenberg *et al.* 2003). Cette enzyme oxyde le Mn(II) en Mn(III). Le Mn³⁺ ainsi formé est un oxydant puissant. Il peut diffuser facilement dans la structure de la lignine et agir comme médiateur redox. Ainsi, cette enzyme est impliquée dans la dépolymérisation de la lignine et peut être utilisée pour l'oxydation de xénobiotiques tels que des

chlorophénols, des colorants, des HAPs, des EDCs, etc. (Hofrichter 2002; Wesenberg *et al.* 2003 ; Tsutsumi *et al.* 2001; Hirano *et al.* 2000).

La laccase

Les laccases sont des métalloprotéines contenant généralement 4 atomes de cuivre dans leur site catalytique. Ces atomes de cuivre sont caractérisés, entre autres, en fonction de leur action dans ce site. L'atome de cuivre de type 1 est responsable de la capture d'un électron provenant du substrat, l'atome de type 2 du transfert de cet électron vers son récepteur tandis que les 2 atomes de type 3 sont responsables de la liaison de l'oxygène à la protéine et du transfert des électrons vers ce récepteur. La masse moléculaire de ces enzymes N-glycosylées varie entre 60 et 390 kDa (Call et Mucke 1997) et leur potentiel redox entre +500 et +800 mV (Wesenberg *et al.*, 2003). Ces enzymes catalysent l'oxydation d'une grande variété de composés aromatiques donneurs d'hydrogène, avec la réduction simultanée de l'oxygène moléculaire en eau.

L'action de la laccase sur le substrat résulte de la formation de radicaux cationiques. Ces radicaux sont impliqués dans des réactions non-enzymatiques telles que la déprotonation, l'attaque nucléophile par les molécules d'eau du milieu, la formation d'oligomères, la rupture des liaisons C-C, l'oxydation du C, la déméthylation, la décarboxylation et la déméthoxylation (Call et Mucke 1997).

Ces enzymes ont été utilisées pour l'élimination de nombreux xénobiotiques de différentes matrices environnementales. En ce sens, elles ont été utilisées pour éliminer des colorants (Wesenberg *et al.* 2003), des HAPs (Pozdnyakova *et al.* 2006), des chlorophénols (Bollag *et al.* 2003), des alkylphénols (Tsutsumi *et al.* 2001), des phénols (Ryan *et al.* 2007), etc. De plus, ces enzymes ont été utilisées pour des fins de synthèse chimique (Burton 2003), de production d'énergie (Tayhas et Palmore 2004), de blanchiment biologique (Couto et Herrera 2006), de clarification de brevages (Minussi *et al.* 2002) et d'analyses (Couto et Herrera 2006).

Procédés de dégradation enzymatique

Dégradation du BPA par des enzymes libres

Dégradation du BPA par des enzymes lignolytiques d'origine fongique

Afin de déterminer l'impact des enzymes lignolytiques (LMEs) sécrétés pendant la fermentation de WRF en présence de BPA, MnP et laccase ont été employés *in vitro* pour le traitement de ce produit chimique cible. Le traitement de BPA a été en effet réalisé *in vitro* en utilisant le MnP sécrété par le WRF *P. ostreatus* O-48. On a éliminé BPA d'une solution de concentration 0,4 mM en utilisant 10 U. ml⁻¹ de MnP, 2 mM de MnSO₄ et 2 mM de H₂O₂ à un pH de 4,5 et à température ambiante (Hirano *et al.* 2000). Remarquablement, l'élimination de cet ECD a été accentuée par la modification des spectres UV de la solution contenant BPA après un traitement d'une heure.

MnP partiellement épuré de *Phanerochaete chrysosporium* Me-446 et a été employé pour l'élimination de BPA d'une solution de 0,22 mM (Tsutsumi *et al.* 2001). Le traitement aqueux, qui s'est produit à pH 4,5 et à 30° C en utilisant 100 U. l⁻¹ de MnP et 50 µM de MnSO₄, a eu comme conséquence une transformation complète de BPA après une heure. De même que MnP, l'action de la laccase libre a été étudiée pour l'élimination de BPA *in vitro*. Des laccases de plusieurs souches de WRF ont été examinées pour l'élimination de BPA : *Trametes Versicolor*, *Trametes villosa*, la souche I-4 isolée d'un sol et *Corioloopsis polyzona* (Cabana *et al.* 2007a; Tsutsumi *et al.* 2001; Kim et Nicell 2006a; Fukuda *et al.* 2004; Saito *et al.* 2003). Ces différentes préparations de laccase ont été employées pour éliminer BPA des solutés de concentrations allant de 0,022 à 2,2 mM, ces concentrations sont plus élevées que celles des effluents des stations de traitement d'eaux usées, mais pourraient être représentatives des niveaux en aval d'une unité de production déchargeant BPA. Des transformations rapides de BPA ont été réalisées en utilisant 10 à 1500 U. l⁻¹ de laccase. Selon les conditions de traitement, tout le BPA présent dans les solutions testées pourrait être enlevé après un temps de contact de 4 h. On a évalué la spécificité enzyme /substrat (affinité) représentée par Km et l'efficacité catalytique représentée par k_{cat} des laccases produites par *Trametes villosa* et la souche I-4. La laccase de la souche I-4 possède une efficacité catalytique et une spécificité enzyme /substrat pour BPA plus importantes que celles de *Trametes villosa* (Fukuda *et al.* 2004; Saito *et al.* 2003). BPA a été éliminé en utilisant la laccase libre de *C. polyzona* et de *T. versicolor* (Cabana *et al.* 2007; Kim et Nicell. 2006a). En conclusion, un criblage étendu de vingt fluides contenant des enzymes de différentes cultures de WRF a été effectué en vue de leur capacité d'éliminer les

perturbateurs endocriniens (EDCs) (BPA, NP, DEHP, E1, E2 et E3) (Fujita *et al.* 2003). Les auteurs n'ont pas rapporté les activités enzymatiques détectées et les concentrations en enzymes pour les préparations utilisées. Le criblage a été effectué pour un temps de contact supérieur à 24 h. La conversion de BPA la plus élevée a été réalisée avec des cultures de WRF de *hirsuta* 1567 et de *Pycnoporus coccineus* 866. La voie de dégradation du BPA par la laccase libre est présentée en détails dans la figure 2. 8.

Finalement, on peut dire que malgré les résultats encourageants, l'utilisation d'enzymes libres dans des applications de biotechnologie environnementale s'avère très limitée. En effet, une telle approche nécessite l'utilisation d'une grande quantité d'enzymes libres pour le traitement d'effluents liquides. De plus, ces enzymes, sous leur forme soluble, sont sensibles à l'effet de différents dénaturants physiques, chimiques et biologiques présents dans ces effluents réels, et s'avèrent impossibles à confiner dans un espace restreint pour pouvoir les utiliser de manière continue.

Plusieurs approches ont été employées pour augmenter la stabilité de la laccase contre les effets d'inactivation et d'inhibition, et pour améliorer l'activité biocatalytique de l'enzyme. Parmi les approches utilisées, on cite l'addition des produits chimiques stabilisants tels que le polyéthylène glycol (PEG), l'alcool polyvinylique, le Ficoll ou l'alkyl bétaïne (Kim et Nicell. 2006c; Modaressi *et al.* 2005). Toutes ces substances augmentent la conversion de BPA, dans des conditions non-dénaturantes ; par conséquent, on aura une diminution de la quantité de laccase nécessaire pour réaliser la même conversion de BPA. Cette conversion accrue est due à deux phénomènes distincts renforçant l'activité des enzymes et augmentant leur stabilité (Modaressi *et al.* 2005). La présence de PEG n'a pas amélioré les paramètres cinétiques de la laccase de *T. versicolor*. Ceci indique que l'augmentation de l'élimination de BPA en présence de PEG a été liée à la protection de l'enzyme et à l'association BPA-PEG (Kim et Nicell 2006c; Modaressi *et al.* 2005). Kim et Nicell 2006c ont amplifié le taux de transformation de BPA en utilisant PEG comme agent protecteur de l'activité de l'enzyme. L'utilisation des substances chimiques stabilisantes est accompagnée d'une pollution secondaire du milieu traité par ces substances.

La deuxième approche, employée pour la stabilisation des enzymes, est l'addition des médiateurs. L'utilisation des substances oxydables de faible poids moléculaire (médiateurs) dans le cycle biocatalytique de la laccase augmente l'activité de cette enzyme. Cette oxydation implique deux étapes oxydantes. Dans un premier temps, la laccase oxyde le substrat primaire, le médiateur et les actes de cette substance, comme composé de transfert d'électron. Dans un deuxième temps, le médiateur transfère l'électron à partir de la substance d'intérêt. Ces

médiateurs sont connus pour augmenter la gamme de substrat de la laccase (Bourbonnais et Paice 1990). L'action des médiateurs l'acide 2, 2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic) (ABTS), l'acide violuric (VLA), le 1-hydroxy-benzotriazole (1-HBT) et le 2,2,6,6-tetraméthoxypiperidine-1-oxyl (TEMPO) a été examiné dans le traitement de BPA (Junghanns et al. 2005; Cabana et al. 2007a; Tsutsumi et al. 2001; Kim et Nicell 2006a; Kim et Nicell 2006b; Suzuki et al. 2003; Tamagawa et al. 2006; Saito et al. 2004).

Les résultats sont fonction de la source de laccase, de la concentration du BPA et de la concentration du médiateur. Par exemple, en utilisant des solutions de médiateur de 100 µM, l'action de la laccase de *T. versicolor* pour l'élimination de BPA a été améliorée par l'addition d'ABTS et de VLA, alors que l'action correspondante de la laccase de *P. ostreatus* était améliorée par l'ajout de 1-HBT (Tsutsumi et al. 2001; Kim et Nicell 2006a). D'autre part, parmi plusieurs médiateurs examinés à une concentration de 10 µM, l'ABTS est le seul médiateur qui ait augmenté de manière significative la transformation de BPA par la laccase de *C. polyzona* (Cabana et al. 2007a).

Dégradation du BPA par des enzymes d'origine bactérienne

BPA est éliminé efficacement par polymérisation et précipitation basées sur l'utilisation d'une peroxydase de *Coprinus cinereus*.

Sakurai et al. (2001) ont étudié la dégradation de 100 mg/l de BPA présent dans une solution liquide contenant H₂O₂ (H₂O₂/BPA= 1,1) de pH 7 et à une température de 25°C par une peroxydase de *Coprinus cinereus* de concentration 1,5 U/ml. Les résultats ont montré que BPA est complètement dégradé après 30 min. La figure 2. 9 prouve que les produits de dégradation ne présentent pas d'activité oestrogénique. L'efficacité et la rapidité du traitement peuvent être améliorées par une optimisation des conditions initiales. La dégradation du BPA basée sur cette enzyme est une méthode très efficace, et rapide, qui peut être employée dans le traitement des eaux usées contaminées par BPA. Néanmoins, il faut bien choisir les conditions initiales de traitement, afin d'optimiser la rentabilité.

Dégradation du BPA par des enzymes d'origine végétales

BPA peut être éliminé des eaux usées par une polymérisation utilisant des enzymes d'origine végétale. Parmi ces enzymes impliquées dans la dégradation du BPA, on mentionne la peroxydase de raifort : Horseradish Peroxydase (HRP) (Cooper et Nicell 1996; Dec et Bollag 1990; Klibanov et al. 1983; Nicell et al. 1992; Tatsumi et al. 1994; Vasudevan et Li 1996; Sakuyama et al. 2003) et la peroxydase de soja : soybean peroxidase (SBP) (Caza et al. 1999; Flock et al. 1999).

La peroxydase de raifort HRP est une enzyme qui catalyse la réduction de H_2O_2 en H_2O en présence de donneurs d'hydrogène comme les phénols. Cette protéine est formée d'une seule chaîne polypeptidique possédant 308 résidus aminoacides, un groupement prosthétique, 2 ions Ca^{2+} qui maintiennent la conformation de l'enzyme. Sakuyama *et al.* (2003) ont étudié l'oxydation de BPA par HRP de (*Amoracia rusticana*) et l'activité oestrogénique des produits de dégradation. Les résultats montrent que le traitement de 2 mM de BPA par 66,7 U/ml de HRP à pH 8 et à 20°C permet la disparition totale du produit initial après une heure et de l'activité oestrogénique après 2 heures. La figure 2. 10 montre que les produits de dégradation sont des polymères de 4-isopropénylphénol. Ces résultats confirment que cette méthode de dégradation est efficace et rapide, ce qui suggère la possibilité de l'utilisation de cette peroxydase dans le traitement des eaux usées contenant BPA.

Caza *et al.*, 1999 ont étudié la dégradation du BPA par la peroxydase de soja (SBP) tout en réalisant une optimisation des conditions du traitement. Les résultats montrent que SBP est capable d'éliminer efficacement BPA en présence et en absence de H_2O_2 , le pH optimal est de 6,5, le rapport H_2O_2 / BPA optimal est de 1,2.

La dégradation de BPA par des enzymes végétales possède plusieurs avantages. En effet, cette méthode a une efficacité et une vitesse de conversion élevées. De plus, ces enzymes sont largement présentes chez les végétaux (soja, raifort, pois). En revanche, l'utilisation de ces enzymes cache quelques insuffisances. Premièrement, les enzymes végétales sont rapidement inactivées par les produits de dégradation de BPA. Ceci prouve la nécessité d'ajout d'additifs qui stabilisent ces enzymes ou le recours aux techniques d'immobilisation. Deuxièmement, les procédés de production et d'isolement de ces enzymes sont coûteux. Finalement, les peroxydases végétales possèdent des propriétés variables avec le climat, ce qui décourage l'utilisation industrielle de ces enzymes.

Biodégradation du BPA par des enzymes immobilisées

Afin d'augmenter l'utilité industrielle des laccases pour le traitement des eaux résiduaires, y compris la possibilité de leur réutilisation et l'amélioration de leur stabilité, des efforts ont été déployés afin d'immobiliser l'enzyme sur des supports solides tout en se basant sur des mécanismes chimiques et physiques (Duran *et al.* 2002).

La conversion de BPA présente dans une solution aqueuse a été catalysée par une laccase de *Trametes sp.* immobilisée sur un support en verre d'alkyl amine de porosité contrôlée dans un réacteur à lit garni à l'échelle de laboratoire (Ida *et al.* 2002). Les débits entre 0,25 et 1mlmin⁻¹

ont eu comme conséquence une élimination proportionnelle au temps de séjour hydraulique (Ida et al. 2003).

Pour un débit de 2 ml l^{-1} , la conversion était 1,7 fois moins que celle observée aux débits faibles. Ceci est probablement dû aux limitations de transfert de masse. Aucune perte apparente d'activité n'a été exhibée après cinquante injections de BPA, par la colonne emballée (Ida et al. 2003), ce qui prouve que l'utilisation de laccase immobilisée est beaucoup plus avantageuse que celle de la forme libre de l'enzyme. Le même groupe de japonais a couplé un dispositif d'électrolyse pour fournir l'oxygène additionnel au système, s'assurant que ce substrat n'a pas limité la conversion de BPA par la laccase immobilisée. L'accouplement du dispositif d'électrolyse, avec la colonne laccase-immobilisée, a augmenté de manière significative la conversion de BPA (Ida et al. 2002). Ce déplacement plus élevé pourrait être dû à l'enlèvement de la limitation en l'oxygène, ou à une transformation additionnelle par oxydation électrochimique des composés phénoliques (Comninellis et Pulgarin 1993). En outre, l'unité d'électrolyse a fourni la flexibilité au système grâce à sa réponse prête aux chocs de charges de BPA (Ida et al. 2003).

La laccase de *T. versicolor* immobilisée sur une membrane de Nylon-poly (glycidylmethacrylate) a été utilisée dans un réacteur non-isotherme pour traiter l'eau polluée par le BPA (Diano et al. 2007). Les conditions non-isothermes ont profondément affecté les propriétés catalytiques de l'enzyme par la variation des paramètres cinétiques de Michaelis-Menten, menant à un perfectionnement global du taux de transformation de BPA. En se basant sur les valeurs de k_m , il a été montré que l'affinité de la laccase au BPA dans les conditions non-isothermes est supérieure à celle dans des conditions isothermes. En outre, l'affinité pour le BPA a augmenté quand la différence entre les côtés chauds et froids de la membrane a augmenté. En conclusion, les valeurs de K_m (dans des conditions isothermes ou non-isothermes) ont diminué avec l'élévation de la température moyenne du bioréacteur (Diano et al. 2007). Ces résultats ont été expliqués par une augmentation du flux de BPA par la membrane dans des conditions non-isothermes.

Une technique consistant à emprisonner de l'enzyme dans une matrice physiquement définie telle qu'un tube de dialyse a été développée, afin d'utiliser les enzymes de manière continue sans perte d'activité. La laccase de *C. versicolor* IFO 4937, un WRF, a été confinée à l'intérieur d'un tube de dialyse à différents diamètres de ports (Hoshino et al. 2003). Ce système a permis le rétablissement de l'enzyme pour d'autres applications et l'élimination des produits chimiques de haut poids moléculaires produits par l'action de la laccase sur le BPA. Les résultats obtenus

par Hoshino *et al.* (2003), ont démontré l'influence du diamètre des ports de la membrane sur le taux de conversion de BPA. Il est bien connu que, pour une pression donnée, le flux de l'eau à travers un tube de dialyse soit influencé par le diamètre des ports de la membrane (Kilduff et Weber 1992). Dans ce contexte, l'optimisation du diamètre de la membrane de dialyse s'avère être obligatoire afin de maximiser la dégradation de BPA et garder l'activité de l'enzyme.

En outre, pour surmonter l'inconvénient de l'immobilisation des enzymes sur un support (rapport : poids enzyme/support très bas), la laccase de *C. polyzona* a été insolubilisé en formant des agrégats réticulés d'enzymes (CLEA). Ceux-ci ont été employés dans un réacteur à lit fluidisé pour l'élimination de BPA présent dans une solution contenant 5 mg l⁻¹ de ce composé à pH 5 et à température ambiante (Cabana *et al.* 2007b). Après un temps de séjour hydraulique de 150 minutes, une conversion de 90% de BPA a été réalisée. Ce système a eu une affinité au BPA plus élevée que celle des laccases de la souche I-4 et de *T. villosa* libres (Fukuda *et al.* 2004; Saito *et al.* 2003).

L'immobilisation des enzymes sur des supports fixes constitue une solution efficace pour le problème de l'inhibition des enzymes et leur faible stabilité. Par contre, ce procédé peut être accompagné par certains problèmes à savoir: problèmes de diffusion au travers des gels, mauvaise tenue mécanique des gels, problèmes d'encombrement stérique (inclusion), problèmes stériques, mauvaise orientation de l'enzyme et perte d'activité (adsorption), modification de la structure de l'enzyme et perte d'activité, impossibilité de prévoir le rendement de greffage, supports présentant de mauvaises propriétés mécaniques (greffage, liaisons covalentes). De plus, l'immobilisation de l'enzyme nécessite l'ajout d'un support, ce qui augmente le prix de production de l'enzyme et rend difficile son utilisation. Pour cela, le recours à d'autres techniques de stabilisation plus efficaces et moins coûteuses est souhaitable. La nano-encapsulation des enzymes pourrait être une bonne solution car elle fournit un rapport air/surface par unité de volume élevé, augmentant ainsi l'efficacité de la dégradation de BPA par les enzymes nano-encapsulés. De plus, quand les enzymes sont encapsulés, il y aura moins d'effet sur leur stabilité à cause de la décharge lente des enzymes qui minimise leur exposition aux conditions environnementales néfastes.

Dégradation enzymatique du BPA dans un milieu organique

Les solvants organiques sont souvent nécessaires pour dissoudre des concentrations élevées de perturbateurs endocriniens, grâce à leur hydrophobicité élevée. Cependant, les enzymes ligninolitiques (LMES) présentent une faible activité et une faible stabilité dans les milieux organiques (Rogalski *et al.* 1995). Pour surmonter cette limitation, des micelles renversées (RM)

ont été employées comme véhicule des enzymes ligninolytiques. Ces véhicules enzymatiques rendent l'utilisation de enzymes ligninolytiques dans les matrices organiques possible. La présence d'une couche aqueuse autour du LME et d'une couche d'agent tensioactif protège les enzymes ligninolytiques contre l'inactivation par la phase organique du milieu (Shipovskov *et al.* 2003).

Un système d'émulsion de micelles renversées (RM) contenant les laccases de WRF *C.versicolor* ou de *Trametes. ps* a été préparé par une équipe de chercheurs japonais en utilisant des solutions de bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate de sel de sodium (AOT) en isooctane (Okazaki *et al.* 2002; Michizoe *et al.* 2005). Les conditions de formation de RM (degré d'hydratation, nature du solvant organique) ont affecté la conversion de BPA (Okazaki *et al.* 2002; Michizoe *et al.* 2005). Le nouvel environnement entourant la laccase a modifié les propriétés biocatalytiques de l'enzyme. Par exemple, le pH optimal pour la conversion de BPA, qui était 3 dans le milieu aqueux devient 5 dans le système de RM (Okazaki *et al.* 2002). Les auteurs ont expliqué la variation du pH optimal par l'attraction des protons par le champ potentiel négativement chargé de l'agent tensio-actif d'AOT (Okazaki *et al.* 2002). Ce faisant, ils ont réalisé une dégradation du BPA par le système laccase de *C. versicolor*-RM en présence du médiateur 1-HBT, les résultats obtenus prouvent que l'ajout du médiateur ne présente aucun intérêt (Okazaki *et al.* 2002).

Le même groupe japonais a étudié l'oxydation des solutions de 0,1 mM de BPA dans des milieux organiques en utilisant la lignine peroxydase (LIP) de *P. chrysosporium* dans un système de RM (Okazaki *et al.* 2004). Les auteurs ont employé des conditions de traitement (100 mM d'AOT, 0,1 μ M de H₂O₂, une teneur en eau de 50%, 3 μ M de LiP, un pH de 5, une température de 40° C, solvant organique : isooctane) permettant d'avoir une activité optimale de LIP dans l'élimination du BPA. En utilisant ces conditions, une transformation de 50% de BPA a été obtenue après un temps de traitement de 2 h. Michizoe *et al.* (2005) ont obtenu un déplacement complet de BPA, en utilisant la même concentration de laccase dans un système de RM.

Dégradation du BPA par combinaison de l'action de la laccase et des boues activées

En raison de son efficacité élevée démontrée pour l'élimination de BPA, la laccase a été employée dans un processus complexe de traitement des eaux usées. Par exemple, la laccase a permis l'élimination de BPA de l'effluent d'une unité de production. Cette conversion a pu améliorer l'efficacité globale du bio traitement de l'effluent. Basé sur cette logique, l'impact de

l'action de la laccase de *Trametes sp.*, en combinaison avec les boues activées, a été étudié dans un traitement d'élimination de BPA (Nakamura et Mtui 2003). Les traitements basés sur l'action d'une seule composante (laccase ou boues activées) n'ont pas fourni une réduction significative de la demande chimique d'oxygène des effluents. Cependant, quand le traitement de la laccase et le traitement de boues activées ont été combinés, une élimination considérable de la demande chimique d'oxygène a été obtenue (Nakamura et Mtui 2003). Ces résultats étaient en fonction du temps de traitement de la laccase. Par exemple, après une incubation de 3h en boues activées, des taux d'élimination de la demande chimique d'oxygène de 20%, de 25% et de 65% ont été atteints pour des traitements préparatoires avec la laccase de 1, de 2 ou de 6 h respectivement (Nakamura et Mtui 2003). Le processus basé sur la combinaison laccase/boue activée est prometteur pour le traitement de BPA de vrais effluents industriels.

Evaluation de la toxicité des produits de dégradation

Afin d'accomplir cet aperçu du déplacement de BPA catalysé par des enzymes, il est important d'évaluer l'activité oestrogénique des produits de dégradation obtenus après des traitements par MnP et par la laccase. Tous les travaux qui ont porté sur la variation de l'activité oestrogénique des solutions contenant le BPA traitées par la laccase, précisent que l'élimination du BPA est corrélé avec la réduction de l'activité oestrogénique de la solution traitée, suggérant que les métabolites produits par le processus basé sur la laccase possèdent une activité oestrogénique faible ou absente (Cabana *et al.* 2007a; Tsutsumi *et al.* 2001; Tamagawa *et al.* 2006; Tamagawa *et al.* 2005; Fukuda *et al.* 2004). Par contre, Tsutsumi *et al.* (2001) ont démontré que l'élimination de l'activité oestrogénique d'une solution contenant 0,88 mM de BPA par MnP, n'est pas directement liée à l'élimination de l'EDC et ont ajouté que les produits chimiques de dégradation possèdent une activité oestrogénique. Globalement, ces résultats peuvent refléter la perte de similitudes structurales des produits chimiques avec des oestrogènes : par exemple, en raison de leur volume, ils ne pourraient plus agir avec des récepteurs d'hormone (figure 2. 11).

Effet des conditions de traitement sur l'efficacité de la biodégradation

L'attention a été également portée aux conditions de la réaction de transformation de BPA, en utilisant la laccase disponible dans le commerce de *T. versicolor* et les laccases sécrétées par *T. villosa* et *C. polyzona* (Cabana *et al.* 2007a; Kim et Nicell 2006a; Kim et Nicell 2006b; Fukuda *et al.* 2004; Kim et Nicell 2006c; Kim 2004). Parmi les conditions de pH et de température examinés, les meilleurs résultats ont été obtenus à un pH entre 5 et 6 et une température entre 45 et 60° C. La divergence entre l'élimination de BPA dépendante du pH et de la stabilité de laccase suggère que les changements de l'efficacité de la conversion soient

principalement dus aux variations des interactions entre le site catalytique de la laccase et BPA (Kim et Nicell 2006a).

Effet du substrat et des constituants du milieu de dégradation sur l'enzyme

Plusieurs travaux ont étudié l'action du BPA sur les enzymes catalysant sa réaction de dégradation. Il a été démontré que la laccase libre de *T. versicolor* a perdu son activité plus rapidement, en réagissant avec le BPA comparé à la même laccase incubée en absence de déclencheur de la réaction. Cette inactivation est liée à l'interaction des radicaux bis phénolique avec l'enzyme (Kim et Nicell 2006a).

Ces résultats diffèrent des autres données indiquant que la stabilité de la laccase avait été améliorée par la présence de produits chimiques phénoliques qui pourraient être oxydés par la laccase, mais qui sont des substrats pauvres (Mai et al. 2000). Il pourrait être intéressant de déterminer l'effet stabilisateur potentiel de BPA sur la laccase dans des conditions non-réactives (par exemple en l'absence de l'oxygène) ; il est bien connu que les substrats normaux des enzymes et de leurs analogues structuraux pourraient agir en tant que stabilisateurs (Agathos et Demain 1986).

Concernant l'impact des composés généralement présents dans les eaux usées sur la laccase catalysant la réduction de BPA, les anions réducteurs tels que nitrites, de sulfite, de sulfure et de thiosulfate tendent à diminuer la conversion de BPA par la laccase de *T. versicolor* (Kim et Nicell 2006a). Les anions sulfite et sulfure ont agi en tant que concurrents à la laccase pour la consommation de l'oxygène dissous. Le méthanol organique dénaturé (5 et 10% p/p), l'acétone (5 et 10% p/p) et le formaldéhyde (1 et 2 % p/p) ont diminué de manière significative la conversion de BPA. Cette réduction de l'efficacité d'élimination peut être due aux interactions hydrophobes entre les composés et les résidus organiques d'acides aminés, ayant pour résultat la dénaturation de la laccase.

Réciproquement, le phénol, le caprolactame et l'isoprène aux concentrations de 1000 μ M et l'urée à une concentration de 50 μ M n'ont pas influencé la conversion de BPA (Kim et Nicell 2006a). La présence des ions métal Fe^{3+} et Cu^{2+} a également diminué de manière significative la conversion de BPA. Ces métaux pourraient interrompre le transport d'électron dans le site catalytique de la laccase et empêcher ainsi, la conversion de BPA (Torres *et al.* 2003). Les chlorures de calcium, de cobalt et de zinc ont eu un impact négatif sur la laccase catalysant la transformation de BPA, ce fait est probablement dû à l'effet chao tropique de ces sels (Cabana *et al.* 2007b).

Le cyanure, un réactif souvent utilisé dans les industries de plastiques, a également diminué la conversion de BPA par la laccase, en tendant à dissocier l'ion de cuivre de l'emplacement catalytique qui a comme conséquence la dénaturation de l'enzyme.

Pour rendre le procédé enzymatique économiquement faisable, on peut diminuer l'inactivation de l'enzyme par l'ajout de médiateurs qui permettent de stabiliser l'enzyme et d'améliorer son rendement, ou bien à travers l'immobilisation de l'enzyme. De même, on peut agir à la baisse sur le coût de production, par le recours aux techniques de génie génétique permettant de sélectionner des souches surproductrices d'enzyme et le coût d'isolement, grâce à l'utilisation des nouvelles techniques de purifications.

CONCLUSION

Des études ont confirmé que le Bisphénol A (BPA) est un perturbateur endocrinien ayant des effets oestrogéniques sur le comportement reproductif des animaux et des organismes aquatiques. Pour cela, son élimination de l'environnement est primordiale. Différentes méthodes ont été appliquées pour la dégradation de ce produit chimique.

Premièrement, le BPA a été éliminé par des méthodes physicochimiques qui utilisent des substances chimiques (ozone chlore fer...) ou des forces physiques (UV, filtration...) pour dégrader ou éliminer le BPA présent dans le milieu traité. Ces méthodes sont simples, rapides et économiquement faisables. Par contre, ce type de traitement n'est pas très sélectif en termes de nombre de polluants éliminés lors du traitement. De plus, l'oxydation chimique devient très coûteuse lorsqu'il s'agit de fortes concentrations de BPA. En outre, ce type de traitement est souvent accompagné par une pollution secondaire du milieu provoqué par la substance chimique employée dans le traitement (ozone, chlore, K_2FO_4 ...).

Deuxièmement, le BPA peut être éliminé par un traitement microbien qui utilise des souches pures de bactéries, de champignons ou d'algues. Ce procédé est facile et ne nécessite pas beaucoup d'investissement, puisque les souches pures sont largement présentes dans l'environnement (eau de rivière, boues, mer, eaux usées). En revanche, cette méthode manque d'efficacité et de rapidité. Elle nécessite trop de contrôle des conditions environnementales qui influencent la croissance des souches et leur capacité à dégrader le BPA. Les produits de dégradation issus de ce type de traitement sont parfois plus toxiques que le BPA (Par exemple l'hexestrol issu de la dégradation de ces composés par *Pleurotus ostreatus* O-48).

Finalement, le BPA a été éliminé par des enzymes de différentes origines (bactérienne, fongique, végétale...). La catalyse enzymatique est le traitement le plus rapide et le plus efficace

des trois types de procédés. En effet, les enzymes possèdent une spécificité au BPA plus grande que celle des traitements physicochimique et microbien. De plus, elles sont plus faciles à manipuler que les souches pures de microbes, et la concentration de l'enzyme ne dépend pas de la croissance bactérienne. En outre, les produits de dégradation issus de cette méthode sont plus acceptables du point de vue environnemental que ceux obtenus par les deux autres types de traitement. Toutefois, la catalyse enzymatique est limitée parce que d'une part, les enzymes sont rapidement inactivées par les substances toxiques présentes dans le milieu et que d'autre part les procédés d'isolement et de production d'enzymes sont très coûteux, ce qui décourage leur utilisation à l'échelle industrielle. Pour résoudre ce problème, la recherche d'une solution permettant la production des enzymes à un coût économique s'avère indispensable afin d'assurer l'élimination complète du BPA des eaux usées.

REMERCIEMENTS

Les auteurs souhaitent remercier le conseil de Recherche en Science Naturelle et Génie du Canada (CRSNG) (Subventions découvertes A4984 et 355254, STP235071, Chaire de Recherche de Canada) et l'INRS-ETE pour leur soutien financier. Les opinions exprimées dans cet article sont seulement des auteurs.

RÉFÉRENCES

- Agathos S. N., and Demain A. L. 1986. Substrate amino acid-mediated stabilization of gramicidin S synthetase activity against inactivation in vivo. *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 465-468.
- Ahuja, S.K., Ferreira G.M., and Moreira, A.R. 2004. Utilization of enzymes for environmental applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24 : 125-154.
- Aitken, M.D. 1993. Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. *Chem. Eng. J.* 52: B49-B58.
- Baldrian, P. 2004. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63: 560-563
- Bollag, J.M., Chu, H.L., Rao M.A., and Gianfreda L. 2003. Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. *J. Environ. Qual.* 32: 63-69.
- Cabana, H., Jiwan, J.L., Rozenberg, R., Elisashvili, V., Penninckx, M., Agathos S.N., and Jones J.P. 2007a. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Corioloopsis polyzona*. *Chemosphere* 67: 770-778.
- Cabana H., Jones J.P., and Agathos S.A. 2007b. Elimination of endocrine disrupting chemicals using lignin modifying enzymes from white rot fungi: a review. *Eng. Life Sci.* 7: 429-456.
- Cabana H., Jones J.P., and Agathos S.A. 2007c. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *J. Biotechnol.* 7: 23-31.
- Call, H.P., and Mucke I. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *J. Biotechnol.* 53: 163-202.
- Caza N., Bewtra, J.K., and Biswas N., and Taylor K.E. 1999. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase, *Water Res.*, 33: 3012-3018.
- Cajthaml, T., Kresinova, Z., Svobodova, K., Moder, M. 2009. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere.* 75:745-750.
- Chi, Y., Hatakka A., and Majjala, P. 2007. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 59: 32-39.
- Comninellis C.H., et Pulgarin, C. 1993. Electrochemical oxidation of phenol for wastewater treatment using SnO₂ anodes. *J. Appl. Electrochem.* 23: 108-112.
- Cooper, V.A., and Nicell, J.A., 1996. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Res.* 30 (4): 954-964
- Couto, S.R., and Herrera J.L.T. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol. Adv.* 24: 500-513.

- Dec, J., and Bollag J.M., 1990. Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 543–550.
- Diano N., Grano, V., Fraconte, L., Caputo, P., Ricupito, A., and Attanasio A. 2007. Nonisothermal bioreactors in enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors: BPA as a model of pollutant. *Appl. Catal. B-Environ.* 69: 252-261.
- Duran, N., Rosa, M.A., D'Annibale A., and Gianfreda L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb Technol.* 31: 907-931.
- Durante, D., Casadio, R., Martelli, L., Tasco, G., Portaccio, M., De Luca, P., Bencivenga, U., Rossi, S., Di Martino, S., and Grano V. 2004. Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of wastewaters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *J. Mol. Catal.B-Enzym.* 27: 191-206.
- Erkurt, E.A., Erkurt, H.A., and Unyayar, A. 2010. Decolorization of Azo Dyes by White Rot Fungi. *Hdb Env Chem.* 9: 157–167, DOI 10.1007/698_2009_48,
- Flock, C., Bassi, A., and Gijzen, M. 1999. Removal of aqueous phenol and 2-chlorophenol with purified soybean peroxidase and soybean hulls. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 74: 303–309.
- Fukuda, T., Uchida, H., Takashima, Y., Uwajima, T., Kawabata T., and Suzuki, M. 2001. Degradation of bisphenol a by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 704-706.
- Fujita, M., Ike, M., Kusunoki, K., Ueno, T., Serizawa K., and Hirao T. 2002. Removal of color and estrogenic substances by fungal reactor equipped with ultrafiltration unit. *Water Sci. Technol.* 2: 353-358.
- Fukuda, T., Uchida, H., Suzuki, M., Miyamoto, H., Morinaga, H., and Nawata, H. 2004. Transformation products of bisphenol A by a recombinant *Trametes villosa* laccase and their estrogenic activity. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79: 1212-1218.
- Gassara, F., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Verma, M., Surampalli, R.Y. 2010. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Eng J* 49: 388–394.
- Gianfreda, L., and Rao, M.A. 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb. Technol.* 35: 339-354.
- Gold, M.H., and Alic, M. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* 57: 605-622.
- Hirano T., Honda, Y., Watanabe T., and Kuwahara, M. 2000. Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1958–1962.
- Hirooka, T., Akiyama, Y., Tsuji, N., Nakamura, T., Nagase, H., Hirata, K., and Miyamoto, K. 2003. Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions. *J. Eiosci. Bioeng.* 95: 200–203.
- Hofrichter, M. 2002. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* 30: 454-466.

- Hoshino K., Yamazaki H., and Kagaya, S. 2003. Treatment of endocrine disruptors in wastewater by using a white-rot fungal laccase immobilized into dialysis tubing, in *Wastewater treatment using enzymes* (Ed: A. Sakurai). Research Signpost. 149-161.
- Huang, Q., and Weber, J.W. 2005. Transformation and Removal of Bisphenol A from Aqueous Phase via Peroxidase-Mediated Oxidative Coupling Reactions: Efficacy, Products, and Pathways. *Environ. Sci. Technol.* 39 (16): 6029–6036.
- Iida, Y., Morii, T. and Satoh, I. 2003. Degradation of bisphenol A by using immobilized laccase column. *T. mat. res. soc. Jpn.* 28 : 1255-1258.
- Iida, Y., Kikuchi, T., Morii, T., and Satoh, I. 2002. Bioconversion of bisphenol A by immobilized laccase column in combination with an electrolytic device. *Chem. Sensors.* 18: 127-129.
- Ike, M., Jin, C.S., and Fujita, M. 2000. Biodegradation of bisphenol A in the aquatic environment. *Water Sci. Technol.* 42: 31–38.
- Ishihara, K., and Nakajima N. 2003. Improvement of marine environmental pollution using eco-system: decomposition and recovery of endocrine disrupting chemicals by marine phyto- and zooplanktons. *J. Mol. Catal. B.* 23: 419–424.
- Jones, J. P. 2007. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus. *Coriopsis polyzona*. *Chemosphere.* 67: 770-778.
- Junghanns, C., Moeder, M., Krauss, G., Martin C., and Schlosser, D. 2005). Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology.*, 151, 45-57.
- Kang, J.H., Ri, N., and Kondo, F. 2004. *Streptomyces* sp. strain isolated from river water has high bisphenol A degradability. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 178–180.
- Kang, J.H., and Kondo F., 2002a. Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 265–269.
- Karam, J., and Nicell J.A., 1997. Potential applications of enzymes in waste treatment. *J.Chem. Technol. Biotechnol.* 69: 141-153.
- Kilduff, J., and Weber, W.J. 1992. Transport and separation of organic macromolecules in ultrafiltration processes. *Environ. Sci. Technol.* 26: 569–577.
- Kim, Y.J., 2004. Impact of dissolved wastewater constituents on laccase-catalyzed treatment of bisphenol A. *Korean J. Environ. Health.* 30: 161-166.
- Kim, Y.J., and Nicell, J.A. 2006a. Impact of reaction conditions on the laccase- catalyzed conversion of bisphenol A. *Bioresour.Technol.* 97: 1431-1442.
- Kim, Y.J., and Nicell J.A. 2006b. Laccase-catalysed oxidation of aqueous triclosan. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 1344-1352.
- Kim, Y.J. and Nicell, J.A. 2006c. Laccase-catalyzed oxidation of bisphenol A with the aid of additives. *Process. Biochem.* 41: 1029-1037.
- Klibanov, A.M., Tu, T.M., and Scott, K.P. 1983. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion wastewaters. *Science.* 221: 259–261.
- Krishnan, A., Stathis, V.P., Permuth, S.F., Tokes, L. and Feldman, D. 1993. Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinol.* 132: 2279-2286.

- Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka T., and Shimazaka, K., 2004. Screening of dairy yeast strains for probiotic application. *J Dairy Sci.* 87: 4050–4056.
- Lee, S.M., Koo, B.W., Choi, J.W., Chai, D.H., An, B.S., Jeung, E.B., and Choi, I.G. 2005. Degradation of bisphenol A by white rot fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 201–207.
- Lobos, J.H., Leib, T.K., and Su, T.M. 1992. Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a gram-negative aerobic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1823–1831.
- Mai, C., Schormann, W., Milstein, O., and Huttermann, A. 2000. Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 510–514.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., and Guisan, J.M. 1999. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotech. Bioeng.* 68: 98–105.
- Michizoe, Y., Ichinose, H., Kamiya, N., Maruyama, T., and Goto, M. 2005. Biodegradation of phenolic environmental pollutants by a surfactant-laccase complex in organic media. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 642–647.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., and Duran, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 13: 205–216.
- Modaressi, K., Taylor, K.E., Bewtra, J.K. and Biswas, N. 2005. Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: Protective effect of PEG on enzyme activity. *Water Res.* 39: 4309–4316.
- Nagase, H., Inthorn, D. Isaji, Y., Oda, A., Hirata, K. and Miyamoto, K., 1997. Selective cadmium removal from hard water using NaOH treated cells of the cyanobacterium *Tolypothrix tenuis*. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 151–154.
- Nagase, M., Ando, K., Nagase, T., Kaname, S., Sawamura T., and Fujita, T. 2001. Redox-sensitive regulation of LOX-1 gene expression in vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281: 720–725.
- Nakamura, Y., and Mtui, G., 2003, Biodegradation of endocrine-disrupting phenolic compounds using laccase followed by activated sludge treatment. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 8: 294–298.
- Nannipieri, P., and Bollag, J.M. 1991. Use of enzymes to detoxify pesticide contaminated soils and waters. *J. Environ. Qual.* 20: 510–517.
- Nicell, J.A., Bewtra, J.K., Taylor, K.E., Biswas, N. and St Pierre, C.C. 1992. Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from wastewater. *Water Sci. Technol.* 25: 157–164.
- Nicell, J.A., Saadi, K.W., and Buchanan, I.D. 1995. Phenol polymerization and precipitation of aqueous 4-chlorophenol. *J. Chem. Biotech.* 60: 203–215.
- O'Fagain, C. 2003. Enzyme stabilization - recent experimental progress. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 137–149.
- Okazaki, S.Y., Michizoe, J., Goto, M., Furusaki, S., Wariishi, H. and Tanaka, H. 2002. Oxidation of bisphenol A catalyzed by laccase hosted in reversed micelles in organic media, *Enzyme Microb. Technol.* 31: 227–232.

- Pointing, S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 20-33.
- Pozdnyakova, N.N., Rodakiewicz-Nowak, J., Turkovskaya, O.V., and Haber, J. 2006. Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons and their derivatives catalyzed directly by the yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 41: 8-15.
- Rogalski, J., Jozwik, E., Hatakka, A., and Leonowicz, A. 1995. Immobilization of laccase from *Phlebia radiata* on controlled porosity glass. *J. Mol. Catal. A-Chem.* 95: 99-108.
- Ryan, D., Leukes, W., and Burton, S. 2007. Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*. *Bioresour. Technol.* 98: 579-587.
- Saito T., Kato, K., Yokogawa, Y., Nishida, M., and Yamashita, N. 2004. Detoxification of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. *J. Biosci. Bioeng.* 98: 64-66.
- Saito, T., Hong, P., Kato, K., Okazaki, M., Inagaki, H., and Maeda, S., 2003. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 520-526.
- Sakai, K., Yamanak, H., Moriooshi, K., Ohmoto, T., and Ohe, T. 2007. Biodegradation of bisphenol and related compounds by *Shingomonas*. *Sp* strain BP-7. *Biosci. Biotechnol. Bioche.* 71 : 51-57.
- Sakurai, A., Toyoda, S., and Sakakibara, M., 2001. Removal of bisphenol A by polymerization and precipitation method using *Coprinus cinereus* peroxidase. *Biotech. Lett.* 23: 995-998.
- Sakuyama, H., Endo, Y., Fujimoto K., and Hatano, Y. 2003. Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase. *J. Biosci. Bioeng.* 96: 227-231.
- Salmon, I., and Bull, AT. 1984. Mixed-culture fermentations in industrial microbiology. *Curr Perspect Microb Ecol; Proc of the Third Intl Symp on Microb Ecol* (Michigan State University, 7-12 Aug., 1983:656-662
- Shipovskov, S., Ferapontova, E., Ruzgas, T., and Levashov, A. 2003. Stabilisation of tyrosinase by reversed micelles for bioelectrocatalysis in dry organic media. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 1620: 119-124.
- Spivack, J., Leib, T.K., and Lobos, J.H. 1994. Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A, *J. Biol. Chem.* 269: 7323-7329.
- Sutherland, J.B., Crawford, D.L., Pometto, A.L. 1983. Metabolism of cinnamic, *p*-coumaric and ferulic acid by *Streptomyces setonii*. *Can. J. Microbiol.* 29: 1253-57
- Suzuki. K., Hirai, H., Murata, H. and Nishida, T. 2003. Removal of estrogenic activities of 17-estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *WaterRes.* 37: 1972-1975.
- Tamagawa Y., Yamaki, R., Hirai, H., Kawai S., and Nishida, T. 2006, Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere.* 65: 97-101.
- Tanaka, T., Tonosaki, T., Nose, M., Tomidokoro, N., Kadomura, N., and Fujii, T. 2001. Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine-disrupting chemicals with laccase from *Trametes* sp. in a rotating reactor. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 312-316.

- Tanaka, T., Yamada, K., Tonosaki, T., Konishi, T., Goto, H., and Taniguchi, M. 2000. Enzymatic degradation of alkylphenols, bisphenol A, synthetic estrogen and phthalic ester. *Water Sci. Technol.* 42: 89-95.
- Tatsumi, K., Ichikawa, H., and Wada, S. 1994. Dephenolization from aqueous solution by treatment with peroxidase and a coagulant. *Water Sci. Technol.* 30(9): 79-86.
- Tayhas, G., and Palmore, R., 2004. Bioelectric power generation. *Trends. Biotechnol.* 22: 99-100.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I., and Le Borgne, S. 2003. Potential use of oxidative enzymes for detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B-Environ.* 1-15.
- Tsutsumi, Y., Haneda, T. and Nishida, T. 2001. Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere.* 42: 271-276.
- Velázquez-Cedeño, M.A., Farnet, A.M., Ferré, E., Savoie, J.M. 2004. Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized wheat straw. *Mycologia.* 96:712-719
- Vasudevan, P.T., and Li, L.O. 1996. Peroxidase catalyzed polymerization of phenol. *Appl. Biochem. Biotech.* 60: 73-82.
- Verma, P., and Madamwar, D. 2002. Decolourisation of synthetic dyes by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiologica.* 47: 283-286.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., and Agathos S.N., 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22: 161-187.
- Yamanaka, H., Moriyoshi, K., Ohmoto, T. Ohe, T., and Sakai, K. 2008. Efficient Microbial Degradation of Bisphenol A in the Presence of Activated Carbon. *J Biosci Bioeng.* 105 (2): 157-160.
- Yoshihara, S., Makishima, M., Suzuki, N., and Ohta, S. 2001. Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction. *Toxicol. Sci.* 62: 221-227.
- Zhang, C., Zeng, G., Yuan, L., Yu, J., Li, J., Huang, S., Xi, B., and Liu, H., 2007. Aerobic degradation of bisphenol A by *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste. *Chemosphere.* 68: 181-190.
- Zhang, H., Hong, Y.Z., Xiao Y.Z., Yuan, J., Tu, X.M., Zhang, X.Q. 2006. Efficient production of laccase by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73: 89-94.
- Zaborsky, O.R. 1974. *Immobilized Enzymes.* CRC Press, Boca Raton, FL. 176 p.

Table 2. 1 Dégradation du BPA dans les eaux usées par des souches bactériennes pures

Type de traitement	Taux de dégradation	Paramètres de procédés	Commentaires	Références
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> B-16	25,26%	[BPA]=88µM t = 4,5 jours T= 30°C ; pH=7	Méthode lente et peu efficace	Zhang <i>et al.</i> 2007
<i>Pseudomonas</i> sp	100%	BPA=0,87µM t = 15 jours T= 3°C	Méthode efficace pour des faibles concentrations de BPA, mais lente	Kang et Kondo, 2002a
<i>Pseudomonas putida</i>	100%	BPA=0,87µM t = 10 jours T= 30°C	Méthode efficace pour des faibles concentrations de BPA, mais lente	Kang et Kondo, 2002a
<i>Sphingomonas</i> sp. strain AO1	100%	[BPA]=504µM=115 lg ml ⁻¹ t = 6h T= 30°C Milieu L	Méthode efficace de dégradation du BPA, mais son efficacité dépend du milieu	Sasaki <i>et al.</i> 2005
<i>Sphingomonas</i> sp. strain BP7	95 %	BPA= 876µM t = 40 jours T= 27°C	La dégradation du BPA par cette souche peut être améliorée par l'ajout de certains nutriments ou d'un autre microorganisme qui a une action synergique	Sakai <i>et al.</i> 2007
Bactéries gram-1 souche MV1	80 – 90%	[BPA]=1,5mM t = 3h T= 30°C	Taux de dégradation élevée malgré la concentration initiale élevée du BPA	Lobos <i>et al.</i> 1992; Spivack <i>et al.</i> 1994
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> FJ-4	100%	BPA=87µM t = 14 jours T= 28°C	Dégradation totale du BPA mais accumulation de deux autres métabolites, dont l'évaluation de leur toxicité est nécessaire pour juger l'efficacité du traitement	Ike <i>et al.</i> 2000
<i>Streptomyces</i> sp	90%	BPA=4,38µM t = 10 jours T= 30°C	C'est une méthode lente même pour des concentrations faibles de BPA	Kang <i>et al.</i> 2004
<i>S. yanoikuyae</i> BP-11R	100%	BPA=300 mg/l t = 60 h T= 30°C		Yamanaka <i>et al.</i> 2008

Tableau 2. 2 Elimination du BPA des eaux usées par les WRF et leurs enzymes lignolytiques

Souche fongique	Type de traitement	Concentration du BPA	Matrice	Taux d'élimination du BPA	Taux d'élimination de l'activité ostrogénique du BPA	commentaires	référence
<i>Corioloopsis polyzona</i>	Laccase libre	5 mg l ⁻¹	aqueux	40% : 1h 100% : 4h	35% : 1h 95% : 4 h	- Détermination des conditions optimales de la réaction: Température et pH. - Le système laccase/ABTS augmente significativement le taux de transformation du BPA - Identification de produits de réaction de haut poids moléculaire.	Cabana et al., 2007
<i>Corioloopsis polyzona</i>	Enzyme immobilisée CLEA	5 mg l ⁻¹	aqueux	50%: 40 min 90%: 150 min		Km : constant 0.23 mM Kcat: constant $\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$.	Jones, 2007
<i>Coriolus versicolor</i>	Laccase / Micelles renversés	100 μM	Solvant	50%: 60 min 80%: 140 min		- Détermination des conditions optimales de la réaction: température et pH. - L'utilisation du médiateur HEBT n'améliore pas le taux de conversion du BPA.	Okazaki et al., 2002
<i>Coriolus versicolor</i>	Laccase immobilisé	2 mM	aqueux	50 - 90%: 24h 100%: 96 h		Emprisonnement de l'enzyme dans une matrice physiquement définie : tube de dialyse	Hoshino et al., 2003
<i>Coriolus versicolor</i>	Laccase libre	3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de terre	sol	80%-100%: 5jours			Tanaka et al., 2000
<i>Heterobasidium insulare</i>	micelles de WRF	200 mg l ⁻¹	aqueux	77% :3j 100%:14j	100% :1 j	Résistance élevée des souches de WRF au BPA (plus que 100 mg l ⁻¹).	Lee et al., 2005

<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP libre	0.22 mM	aqueux	90%:30 min 100%: 60min	40%: 4 h 90%: 6 h d'incubation avec 0.88 mM de BPA.		Tsutsumi et al., 2001
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	LiP / Micelles renversés	0.1 mM	Solvant	40%: 30 min 50%: 120 min		Détermination des conditions optimales d'action de LiP: pH, température, type du solvant organique, concentrations d'AOT, LiP et H2O2.	Kimura et al., 2004
<i>Pleurotus ostreatus</i>	micelles de WRF	0.4 mM	aqueux	80% :12 j 85%:21 j			Hirano et al., 2000
<i>Pleurotus ostreatus</i>	MnP libre	0.4 mM	aqueux	100% : 1h			Hirano et al; 2000
<i>Pycnoporus coccineus</i>	Laccase libre	3 µmol g-1 de sol	sol	15%: 5 h			Tanaka et al., 2001
<i>Stereum hirsutum</i>	micelles de WRF	200 mg l-1	aqueux	68% : 3 j 100%:14 j	40% : 1 j 100%:3 j	Resistance élevée des souches de WRF au BPA (plus que 100 mg l-1).	Lee et al., 2005
<i>Trametes spp</i>	Laccase / Micelles renversés	200 µM	Solvant	40-95%: 1 h 50-100%: 3h			Michizoe et al., 2005
<i>Trametes spp</i>	Combinaison Laccase / Boues activée	5 - 100 mg l-1	aqueux			L'efficacité du traitement dépend de la durée initiale du traitement par la laccase et de la durée du contact avec les boues activées.	Nakamura et Mtui, 2003
<i>Trametes spp</i>	Laccase immobilisé	0.1 - 3 mM	aqueux	134 µg de BPA après 30minutes.			Iida et al., 2003; Iida et al., 2002

<i>Trametes spp</i>	Laccase libre	3 µmol g-1 sol	sol	-85% 5 h dans un tube -90% après 2 h dans un réacteur -100% : 8 h dans un réacteur			Tanaka et al., 2001
<i>Trametes versicolor</i>	Laccase libre	0.22 mM	aqueux	-50% :30 min -70% :60 min	- 40%: 1h - 60 % :6h avec 0.88 mM de BPA	- L'utilisation du médiateur HEBT améliore le taux de conversion du BPA et le taux d'élimination de l'activité oestrogénique du BPA	Tsutsumi et al., 2001
<i>Trametes versicolor</i>	Laccase libre	120 µM	aqueux			- Détermination des conditions optimales de la réaction: température et pH, médiateur. -Détermination de l'effet des constituants de l'eau usée sur la transformation du BPA	Kim et Nicel, 2006a
<i>Trametes villosa</i>	Laccase immobilisé	0 - 5 mM	aqueux			-Immobilisation de l'enzyme par une membrane de Nylon-poly (glycidyl methacrylate) utilisée dans un bioréacteur non isothermique. -Les paramètres de la cinétique de Michaelis-Menten Km et Vmax varient respectivement de 0.10 - 1.20 mM et 1.8 - 3.4 µmol min-1 en fonction de Tav et de delta T.	Diano et al., 2007
<i>Trametes villosa</i>	Laccase libre	2.2 mM	aqueux	-100% après un contact de 3h	Les produits de dégradation ne sont pas toxiques	Les valeurs de Km et de kcat pour BPA sont respectivement 14.1 mM et 59.1 µmol min-1 mg-1 .	Fukuda et al., 2004; Fukuda et al., 2001 ;
<i>Souche I-4 isolée d'un sol Japonais</i>	Laccase libre	5 mM	aqueux	-95% :1 h -100% : 3 h	Elimination de 100% de l'activité oestrogénique après 24 h de contact	-Les valeurs de Km et de kcat sont respectivement de 10000 µM et de 14 s-1. -Le système laccase/1-HBT (1mM) n'améliore pas le taux de transformation du BPA.	Saito et al., 2003; Saito et al., 2004;

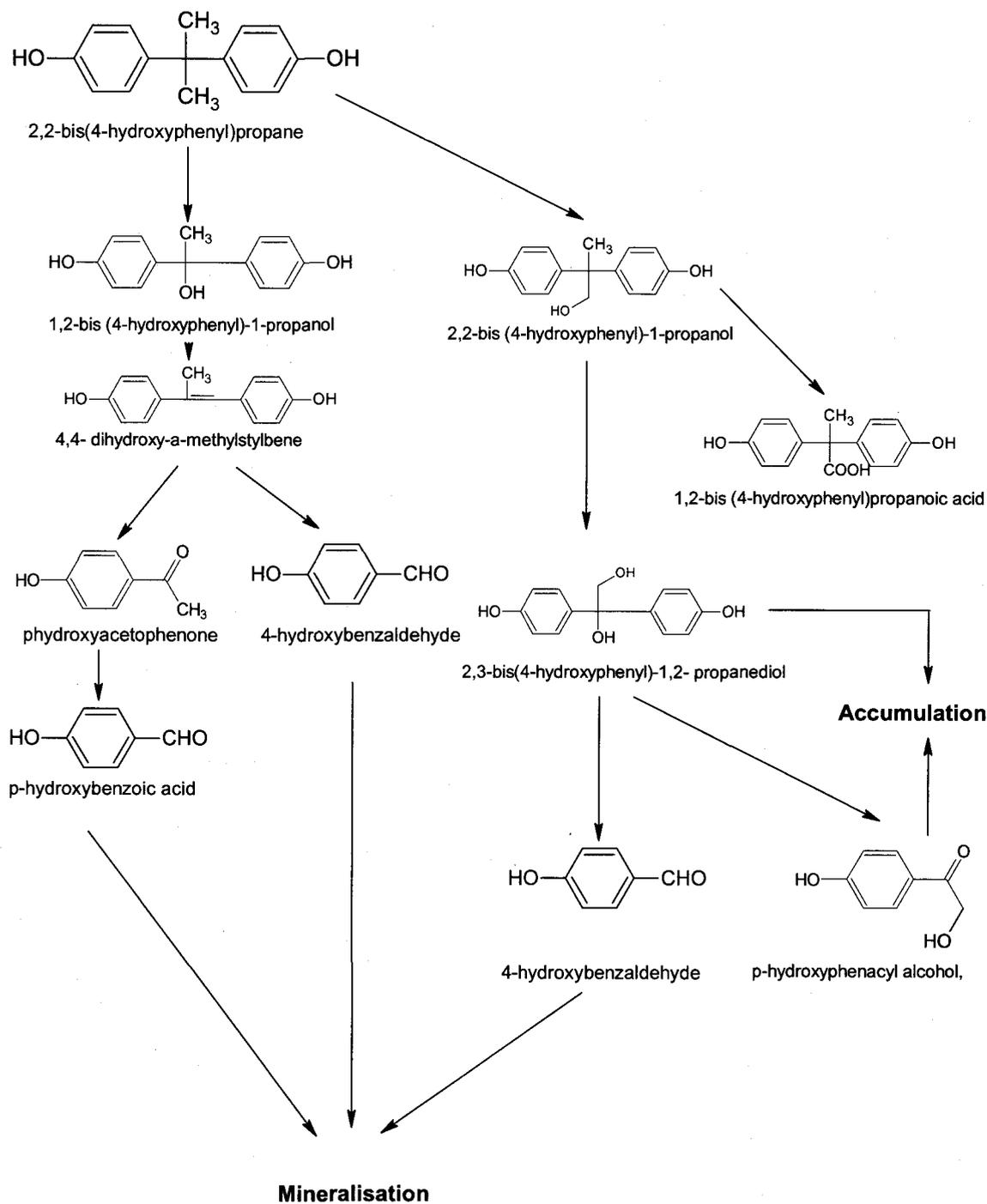


Figure 2. 1 Voie de dégradation du BPA par *Spingomonas paucimobilis* FJ-4 (données tirées de Ike et al. 2000)

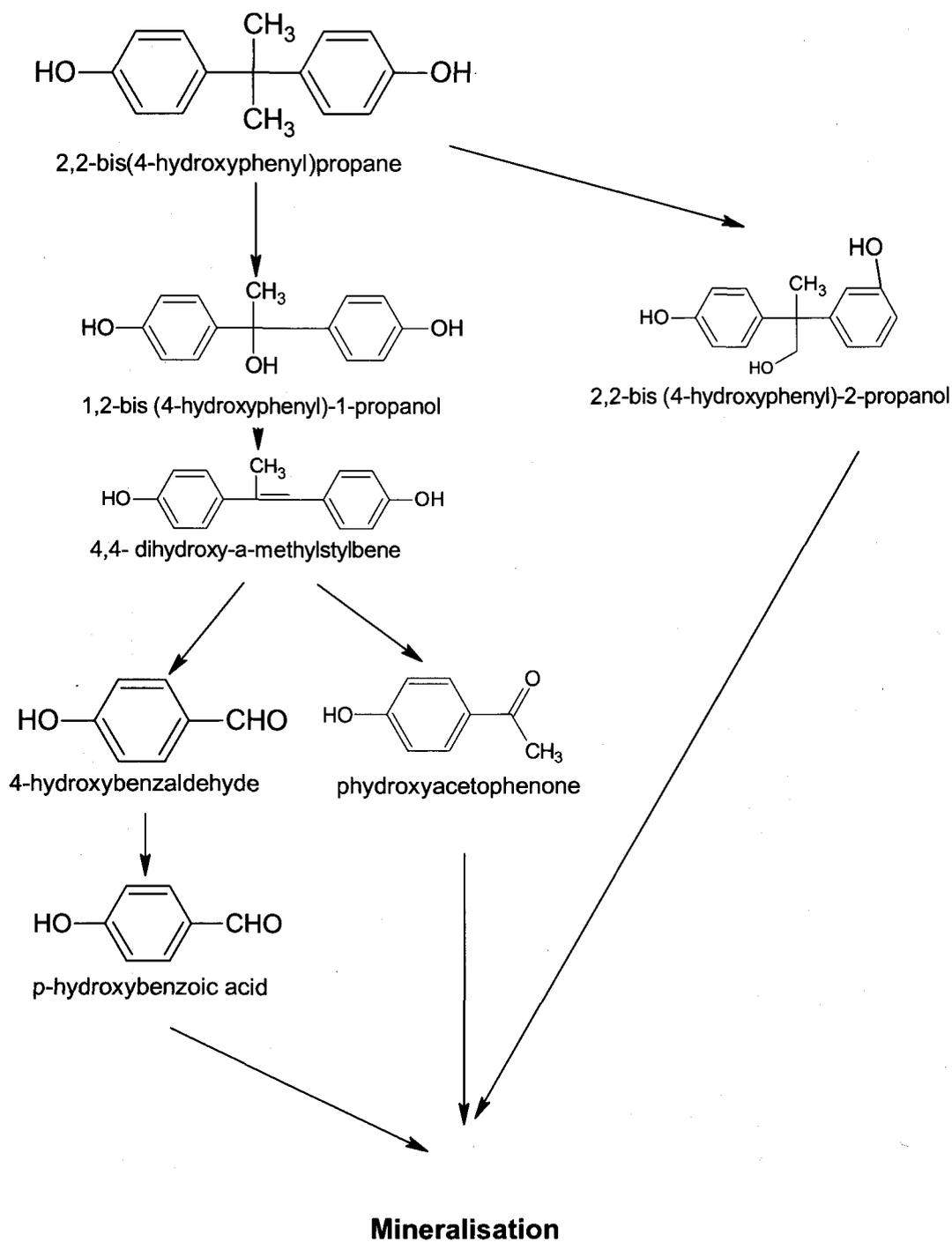


Figure 2. 2 Voie de dégradation du BPA par *Sphingomonas sp.* strain AO1 (données tirées de Sasaki et al. 2005)

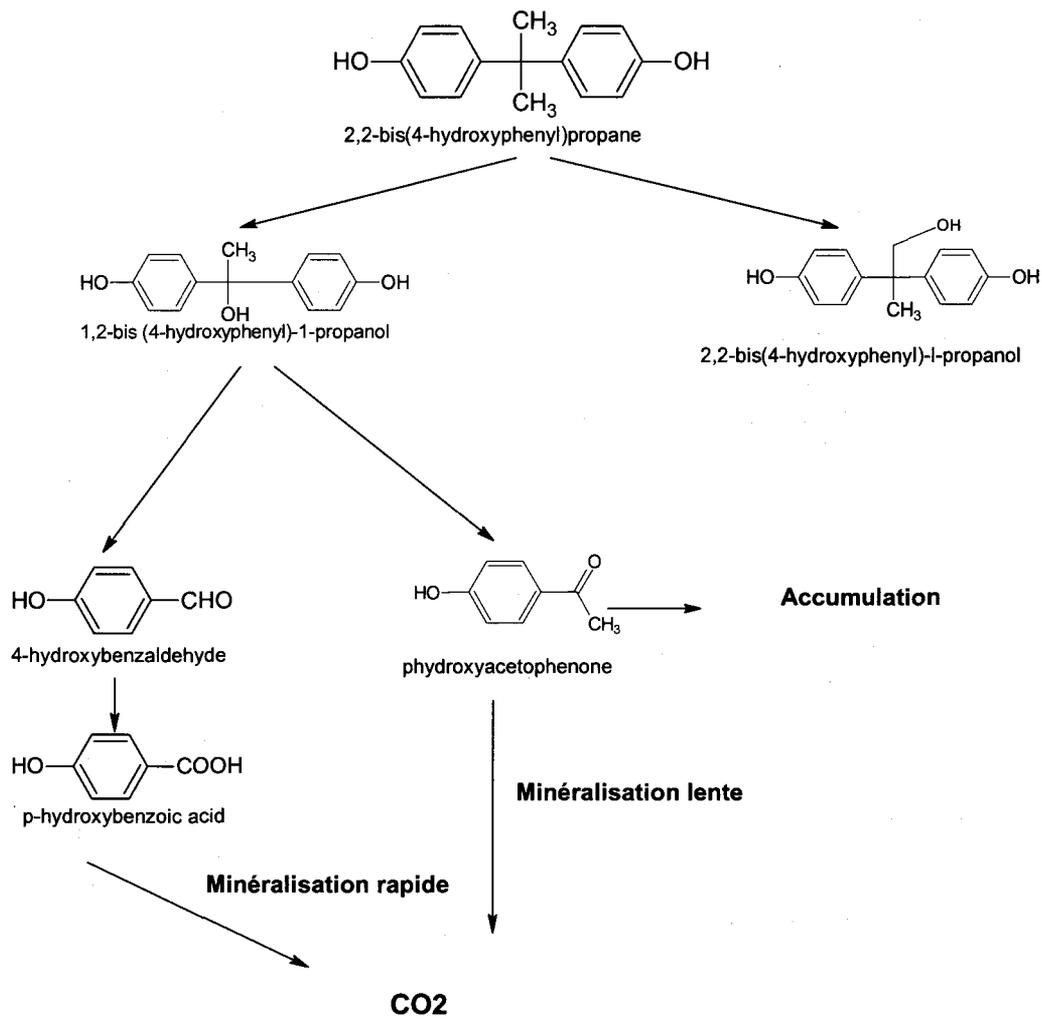


Figure 2. 3 Voie de dégradation du BPA par *Spingomonas sp.* strain BP7 (données tirées de Sakai et al. 2007)

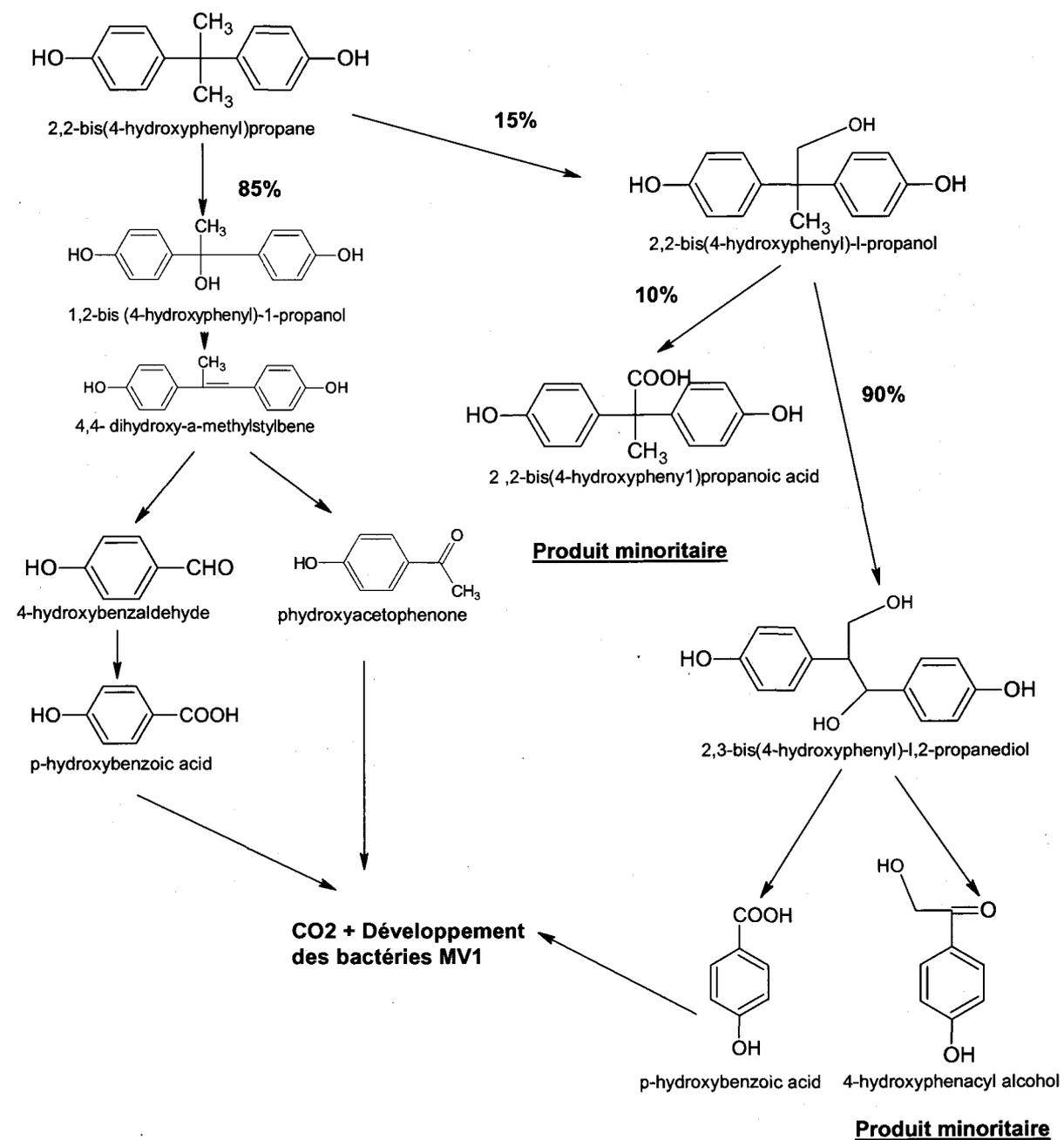


Figure 2. 4 Voie de dégradation du BPA par la souche Mv1 (données tirées de Spivack et al. 1994)

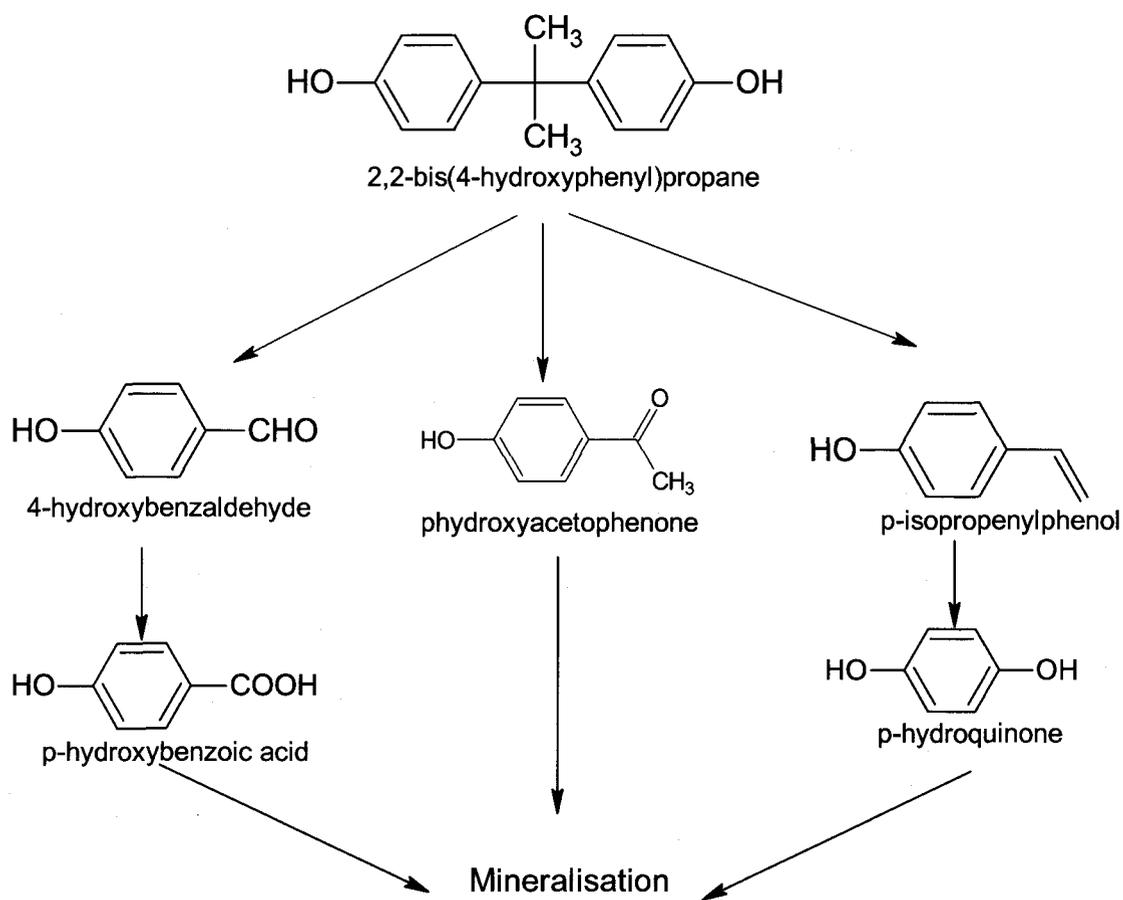


Figure 2. 5 Voie de dégradation du BPA par *Achromobacter xylosoxidans* B-16 (données tirées de Zhang et al. 2007)

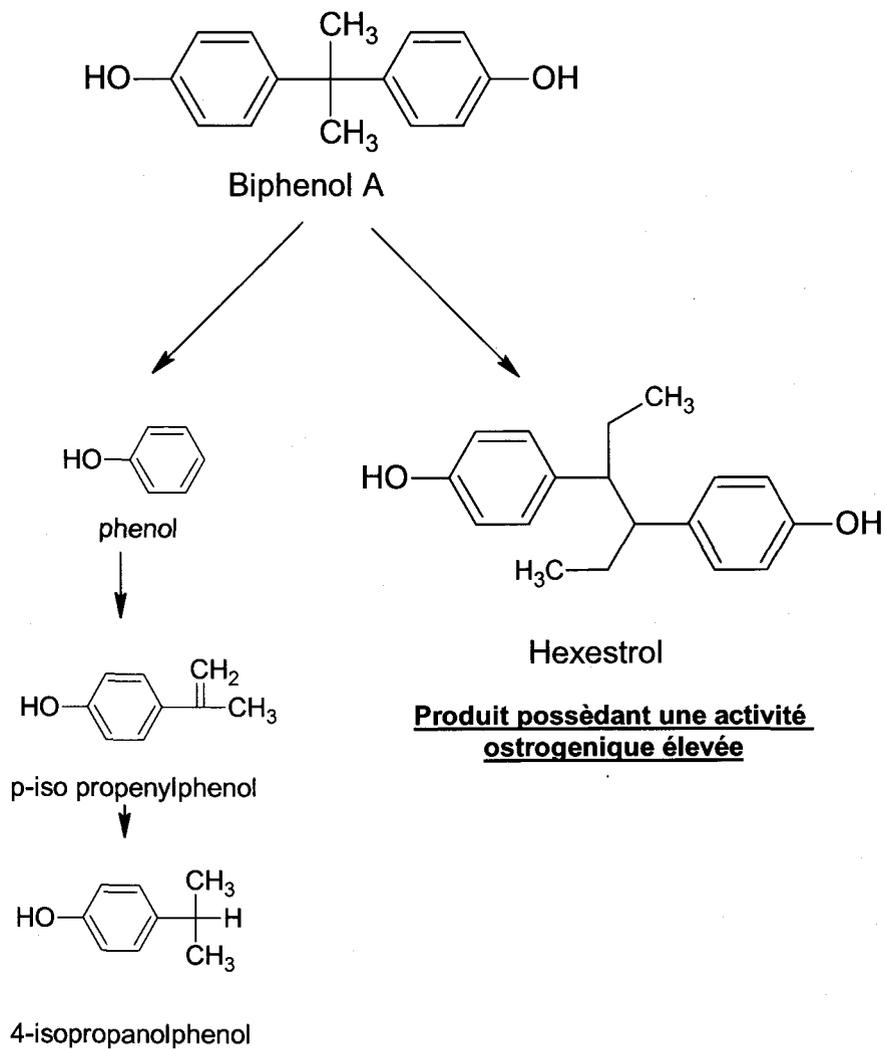


Figure 2. 6 Voie de dégradation de BPA par *Pleurotus ostreatus* O-48 (données tirées de Hirano *et al.* 2000)

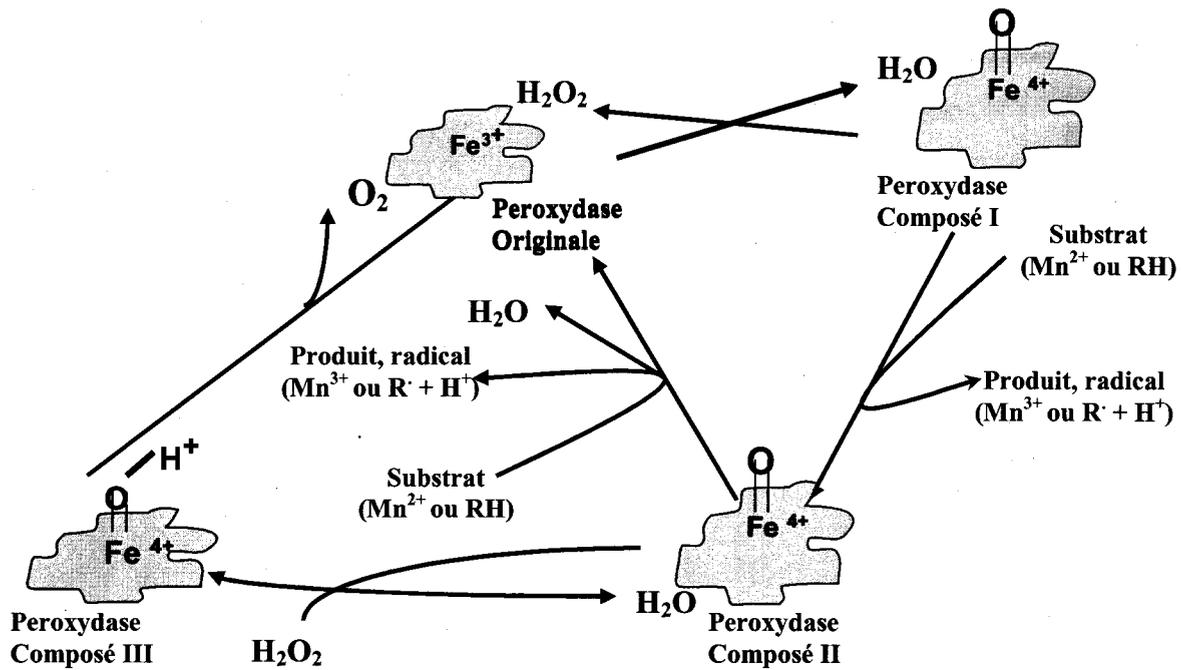


Figure 2. 7 Cycle catalytique général des peroxydases (modifié de Wesenberg *et al.* 2003)

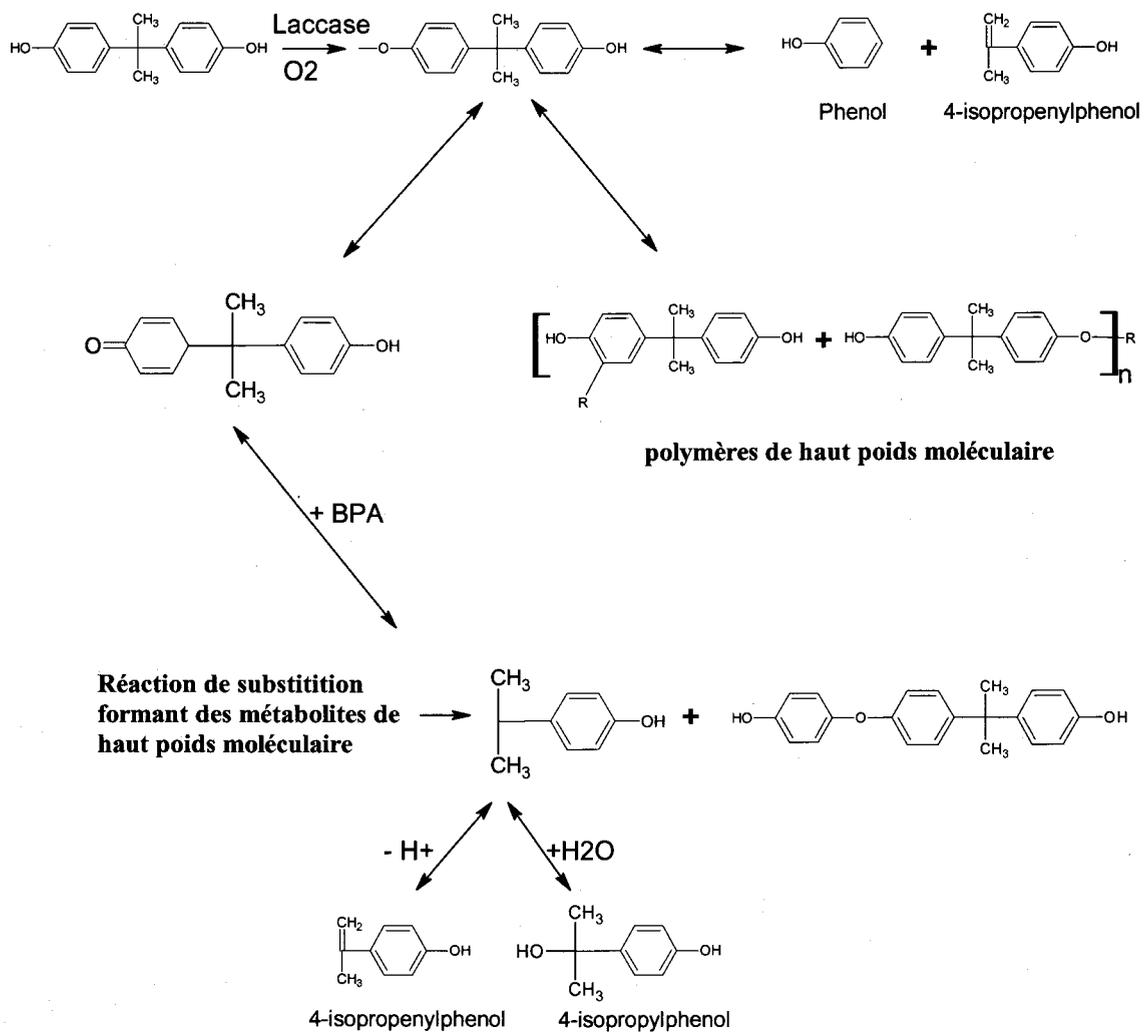


Figure 2. 8 Voie d'oxydation du BPA par la laccase (modifié de Huang et Weber, 2005)

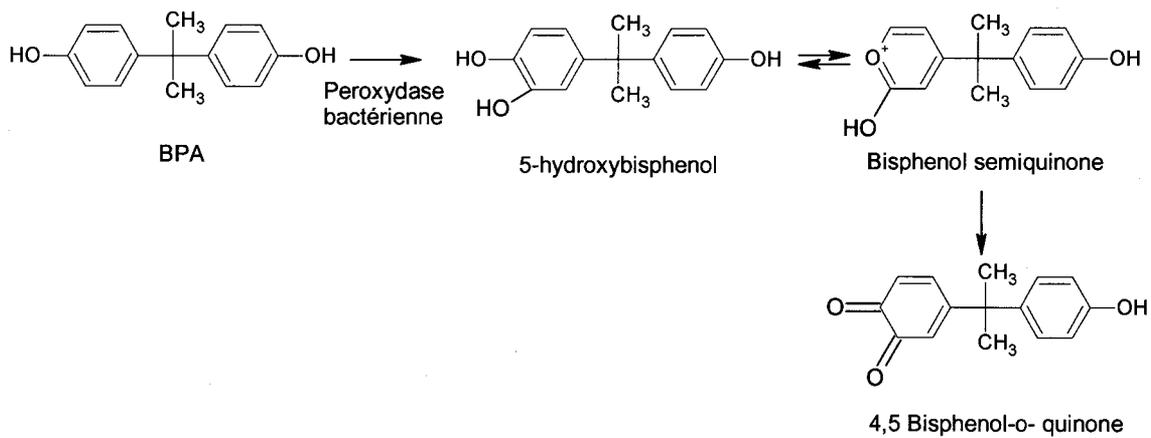


Figure 2. 9 Voie de dégradation de BPA par une peroxydase bactérienne (données tirées de Sakurai et al. 2001)

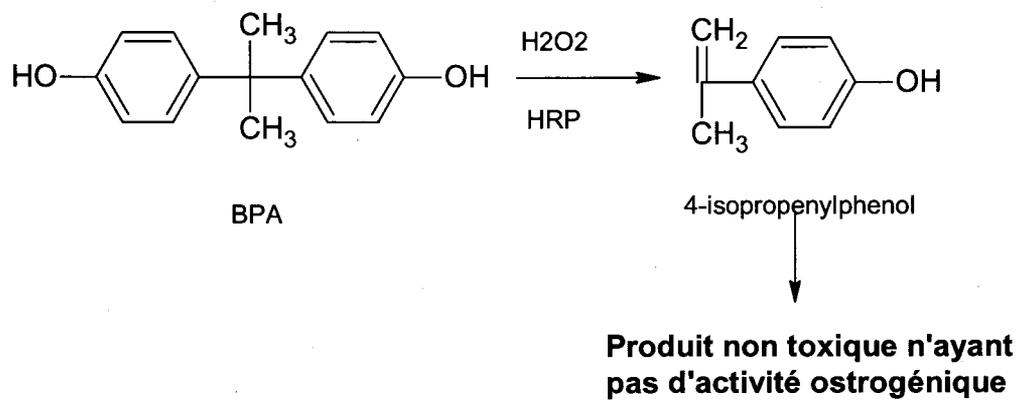


Figure 2. 10 Voie de dégradation de BPA par la peroxydase de raifort (HRP) (données tirées de Sakuyama *et al.* 2003)

CHAPITRE III
PARTIE 1
**SCREENING OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES TO
PRODUCE LIGNINOLYTIC ENZYMES BY
PHANEROCHETE CHRYSOSPORIUM**

Fatma Gassara, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, M. Verma and R.Y. Surampalli

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

Biochemical Engineering Journal 49 (2010) 388–394. Publié



RÉSUMÉ

La production d'enzymes ligninolytiques par des cultures solides de *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 a été étudiée en utilisant différents déchets agro-industriels, tels que les résidus de poisson, les déchets de microbrasserie, les déchets solides de jus de pomme (apple pomace) et les boues de pâtes et papiers. Différents inducteurs enzymatiques, telles que le veratryl alcool, le tween-80 et le CuSO₄ à des concentrations de 2 mM, 0,5% v / p et 3 mmole / kg, respectivement ont été également testés. L'utilisation du veratryl alcool et du Tween-80 conduit à un maximum d'activité de manganèse peroxydase (MnP) de $17,36 \pm 0,5$ U / gss, $540,2 \pm 5,1$ U/gss, $631,25 \pm 14$ U / gss, $507,5 \pm 26,87$ U / gss (unités / gramme de substrat sec), respectivement, pour les différents déchets. L'activité maximale de LiP obtenue a été $141,38 \pm 3,39$, $14,1 \pm 0,5$ U / gss avec les déchets solides de jus de pomme et les boues de pâtes et papiers, respectivement. L'activité de laccase a été négligeable dans tous les déchets testés. Par contre, l'addition de Tween-80 et CuSO₄ abouti à des valeurs d'activité de MnP de $17,4 \pm 0,6$, $291 \pm 2,8$, $213,5 \pm 3$ et $213,2 \pm 3,2$ U / gss dans les déchets de poisson, les déchets de microbrasserie, les déchets solides de jus de pomme et les boues de pâtes et papiers, respectivement. L'ajout de CuSO₄ a amélioré l'activité de laccase dans les différents milieux de culture. Des activités maximales de laccase de $738,97 \pm 9,2$, $719,97 \pm 14,6$, $308,8 \pm 12,1$, $94,44 \pm 1,2$ U /gss ont été obtenues dans les déchets de microbrasserie, des déchets solides de jus de pomme, les boues de pâtes et papier et les déchets de poisson, respectivement. Les déchets de microbrasserie et les déchets solides de jus de pomme ont servi d'excellentes sources pour la production de MnP, LiP et de laccase.

Mots-clés: enzymes Ligninolytique, déchet agro-industriel, inducteurs, *Phanerochaete chrysosporium*

ABSTRACT

Ligninolytic enzyme production by solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 was investigated by employing different agro-industrial wastes, such as fishery residues, brewery waste, apple waste (pomace) and pulp and paper industry sludge. Different enzyme inducers, such as veratryl alcohol, Tween-80 and CuSO_4 at concentrations of 2 mM, 0.5 % v/w and 3 mmole/kg, respectively were also tested. Use of veratryl alcohol and Tween-80 resulted in maximum manganese peroxidase (MnP) activity of 17.36 ± 0.5 U/gds, 540.2 ± 5.1 U/gds, 631.25 ± 14 U/gds, 507.5 ± 26.87 U/gds (units/gram dry substrate), respectively, for different wastes. Maximum lignin peroxidase (LiP) activity of 141.38 ± 3.39 , 14.1 ± 0.5 U/gds was attained with pomace and pulp and paper, respectively. Laccase activities were found to be insignificant for all wastes. Addition of Tween-80 and CuSO_4 resulted in highest values of MnP activity of 17.4 ± 0.6 , 291 ± 2.8 , 213.5 ± 3 and 213.2 ± 3.2 U/gds for fishery waste, brewery waste, pomace and pulp and paper industry sludge, respectively. Addition of CuSO_4 to the culture medium enhanced laccase activity. Maximum laccase activities of 738.97 ± 9.2 , 719.97 ± 14.6 , 308.8 ± 12.1 , 94.44 ± 1.2 U/gds were obtained for brewery waste, pomace, pulp and paper industry sludge and fishery waste, respectively. Brewery wastes and pomace served as excellent sources for production of MnP, LiP and laccases.

Keywords: Ligninolytic, enzymes, agro-industrial wastes, inducers, *Phanerochaete chrysosporium*

1. INTRODUCTION

Over the past decade, the white rot fungi by virtue of production of ligninolytic enzymes have been studied for their ability to degrade recalcitrant environmental pollutants, such as sulfonphthalein [1], DDT, lindane, dioxin and benzopyrene [2]. Among these white rot fungi, the basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium* has become the most commonly used organism due to its ability to produce ligninolytic enzymes, fast growth and easy handling during culturing techniques [3]. This microorganism has now become a model for many studies on bioremediation of pollutants, such as polynuclear aromatic hydrocarbons [4]. *P. chrysosporium* is also used for production of several extracellular enzymes, such as manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP) and laccase that are capable of degrading lignin [5].

Conventionally, the production of enzymes is very expensive and raw material translates into 40-60% of the production cost [6]. It is now accepted that solid-state fermentation (SSF) is the most economical process for ligninolytic enzyme production by fungi [7]. In this perspective, this study was aimed at utilization of wastes as growth substrates for the production of enzymes. Agro-industrial wastes were chosen as growth medium due to their omnipresence, high biodegradability, and rich in carbon as otherwise there would be disposal problems leading to adverse environmental impacts. Literature is replete with use of many agro-industrial wastes as raw materials for diverse value-added products.

Apple pomace has been used for the production of organic acids, protein-enriched feeds, edible mushrooms, ethanol, aroma compounds, natural antioxidants and enzymes, such as pectinases, pectin methylesterase, lignocellulolytic enzymes, among others [8]. Brewery waste was used for polyphenol extraction, enzymes production, mushrooms and actinobacteria cultivation [9]. Villas-Bôas et al. [10] utilized *Candida utilis* to produce ligninolytic enzymes (pectinase, manganese-dependent peroxidase, cellulase and xylanase) by using apple pomace under solid-state conditions. The study reported low yield of manganese-dependent peroxidase activity at 19.1 U/ml. Fishery wastes were also used for value-added products production, namely proteases, biofuels and other compounds [11]. Pulp and paper wastes were used for the production of lactic acid, among other compounds [11]. As per the published literature so far to the best of our knowledge, there is no study reported on the production of ligninolytic enzymes by *P.*

chrysosporium using brewery and fishery waste. Further, the present study will investigate the production of ligninolytic enzymes using pomace under SSF conditions with improved yield. Pulp and paper wastes, although investigated in detail for production of laccase, MnP and LiP, it was used as a reference in this study to compare with other wastes. In Canada, residues and by-products derived from juice, beer production and pulp and paper industries are abundant sources of organic matter, which were used in this study.

This study comprised solid-state fermentation (SSF) to test the production of lignocellulosic enzymes, namely lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase by *Phanerochaete chrysosporium*, while using different agro-industrial wastes, such as fish residues, municipal dewatered sludge, brewery waste, apple waste (pomace) and pulp and paper industry sludge.

2. MATERIALS AND METHODS

2. 1 Fungi and spores collection

The *P. chrysosporium* (ATCC 24275) strain was selected as a suitable organism for bio-processing of SSF for its potential for higher enzyme production. *Phanerochaete chrysosporium* was maintained on potato-dextrose-agar (PDA) medium at $4 \pm 1^\circ\text{C}$. The culture of *P. chrysosporium* was grown on PDA petri plate and incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. The spores were harvested from the sporulation medium plates and inoculated into sterile distilled water contained in test tubes and stored in the freezer, until use. The fermented broth was initially filtered through glass wool to remove mycelial contamination and recover only spores.

2. 2 Solid-state fermentation

Forty grams of solid substrate (60% w/w of moisture and pH 4.5), in a 500 ml Erlenmeyer flask were thoroughly mixed and autoclaved at 121°C for 30 min. The substrates were inoculated with spore suspension of 2.5×10^6 spores/gds. After thorough mixing, the inoculated substrate was incubated in a shaker at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 14 days. Unless specified otherwise, these fermentation conditions were maintained throughout the study.

2. 3 Solid substrates types

Different agro-industrial biomass, such as fish residues (SAUM-MOM inc., Montreal, Canada), municipal dewatered sludge (CUQ, Ville de Quebec, Quebec, Canada),

brewery waste (LA BARBERIE, Quebec, Canada), pomace apple industry waste from (Lassonde Inc., Rougemont, Montreal, Canada) and pulp and paper industry sludge (Kruger Wayagamack Inc., Trois-Rivieres, Quebec, Canada) were used as solid substrates to evaluate their suitability for production of manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP) and laccase. The physical-chemical characterization of these alternative solid substrates is given in Table 3. 1. The most suitable solid substrate was used for optimization experiments study.

2. 4 Effect of inducers on laccase and peroxidase production

P. chrysosporium, a well-known lignin degrader fungus was initially thought to produce LiP, MnP and protease only and not phenol oxidase (laccase) [12], it was also found that this fungus was able to produce laccase under environmental stress conditions and in the presence of some potent inducers. Therefore, it was imperative to study the effect of inducers on *P. chrysosporium* for laccase production. For this, copper sulphate (3 mmole/kg) and Tween-80 (0.5 % v/w), veratryl alcohol (2 mmole/kg) and Tween-80 (0.5 % v/w), were chosen as potential inducers. The pH of the substrates were adjusted to 4.5 and 40 g was distributed to each 500 mL Erlenmeyer flask with appropriate inducers and sterilized at $121 \pm 1^\circ\text{C}$ for 30 min in an autoclave. After autoclaving, a spore suspension of 2.5×10^6 spores/gds of *P. chrysosporium* was added to all the flasks. The inoculated substrate was placed in a shaker at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ and then incubated for 14 days. Enzymes were extracted by filtration and laccase and peroxidase (LiP and MnP) activities were assayed for up to 14 days after inoculation. Each experiment was carried out in duplicates and the standard error was calculated.

2. 5 Enzyme extraction

The efficacy of different extraction methods were compared by measurement of enzymes in 9- day old fermented broth:

2. 5. 1 Extraction by centrifugation

One gram of sample was taken from each flask and mixed with 50 mM sodium phosphate buffer (10/1: v/w) at pH 6.5. The mixture was placed in a shaker at 150 rpm for one hour. It was then centrifuged at $7000 \times g$ for 20 min. The supernatant collected was analyzed for enzyme activity. The enzyme activity was expressed as activity per gram of dry culture by measuring the optical density. The dry weight of culture was determined by measuring the sample moisture content using a moisture analyzer (HR-83 Halogen, Mettler Toledo, Switzerland).

2. 5. 2 Extraction by filtration

The enzymes were extracted with 50 mM sodium-phosphate buffer at pH 6.5 (10/1: v/w). The mixture was placed in a shaker at 150 rpm for one hour. It was then filtered through Whatman filter G6 (φ 1.5 μ m) and the filtrates were analyzed for enzyme activity.

2. 6 Enzyme assays

2. 6. 1 Lignin peroxidase (LiP)

LiP activity was determined by monitoring the conversion of veratryl alcohol to veratryl aldehyde at 25 °C by hydrogen peroxide at 310 nm [13]. The final reaction mixture contained 1.5 ml of 0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 3.0), 1.0 ml of 10 mM veratryl alcohol, and 0.4 ml enzyme sample. The reaction was initiated at 25 \pm 1°C by 0.1 ml 10 mM H₂O₂. One unit of enzyme activity was defined as the amount of the enzyme which can produce 1 μ mol veratryl aldehyde from the oxidation of veratryl alcohol per minute [14].

2. 6. 2 Laccase activity

Laccase activity was measured with 2,2-azino bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) in 0.1 M phosphate-citrate buffer at pH 4. Oxidation of ABTS was determined by the increase in A₄₂₀ (ϵ_{420} = 36 mM/cm) [15]. One unit of laccase activity was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 μ mol of ABTS per min.

2. 6. 3 Manganese peroxidase (MnP)

MnP activity was measured as described by Fujian *et al.* [16]. The reaction mixture contained 1.70 ml of citrate-phosphate buffer (pH 3; 0.1 mol/l), 0.05 ml of MnSO₄ (0.40 mol/l), 0.2 ml of enzyme and 0.05 ml of H₂O₂ (0.016 mol/l). One unit of MnP activity was defined as 10% of OD₂₄₀ (optical density) nm increase/minute.

2. 7 Viability assay

Viability assay was used as an indicator or measure of the amount of living fungal biomass in solid-state cultivation. Viability of broken fungal mycelium in samples containing mycelium and residual substrate was assayed with most probable number (MPN) method [17]. A sample of 1.5 g of fungal-colonized substrate was first diluted in 100 ml sterile water. Afterwards, it was homogenized with Ultra-Turrax for 20 s. Adequate dilutions were made for these samples. At least five different dilutions per sample were used for the analysis. Each dilution (6 μ l \times 10 μ l) was aseptically pipetted on an agar plate at six different spots. Two plates per dilution were seeded. The plates

were incubated for 1 day, after which the growing spots on the plates were calculated. While calculating the results, the first dilution, where all the pipetted spots did not grow, and the last dilution, where at least one pipetted spot grew, and all the samples between these, were taken into account. The results in colony forming units (cfu's) were calculated according to the following formula:

$$\text{MPN} = P / (N_n \times N_k)^{0.5}$$

Where, P = number of positives in all the accounted series

N_n = amount of sample in the negative parallels (g).

N_k = amount of sample in all the accounted series (g).

In the screening studies, the growth was detected only visually.

2. 8 Statistical analysis

Data means were analyzed with individual Student's t-tests to distinguish differences among treatments (for example, with inducers, without inducers, pH variations, among others). The test was performed at the level of P -value < 0.05 to determine the significance of the difference between treatments to produce ligninolytic enzymes [18].

Standard errors and error bars presented in the tables and figures, respectively were calculated using untransformed data in ANOVA. Standard error for a single proportion was estimated as described by [19].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effect of inducers on laccase and peroxidase production

The effect of inducers of laccase and peroxidase activity, namely copper sulfate (3 mmole/kg) and veratryl alcohol (2 mmole/kg) was investigated. It was found that inducers play a significant role in enhancing the production and activity of laccase and peroxidase. Table 3. 2 illustrates the role of inducers in laccase and peroxidase production. It has been shown that the addition of copper sulfate (3 mmole/kg) to the culture medium had significant effect on laccase production ($P < 0.05$). Copper sulfate as enzyme inducer resulted in maximum laccase activities of 738.97 ± 9.2 , 719.97 ± 14.6 , 308.8 ± 12.1 , 94.44 ± 1.2 U/gds obtained in brewery waste, pomace, pulp and paper industry sludge and fish waste, respectively. On the other hand, when no inducer is added or only veratryl alcohol is added to the culture medium, laccase activities were found to be insignificant in all waste materials ($P > 0.05$). The inability of P .

chryso sporium to produce laccase without inducer has been reported in the literature [12]. Furthermore, veratryl alcohol does not induce laccase production and is only known as established inducer of LiP [20]. These results clearly showed the positive effect of copper sulphate as an inducer of laccase activity. Thus, the results were in agreement with [21]. The authors reported that the addition of 2 mM copper sulfate stimulated laccase production by *Trametes pubescens* MB 89 grown on synthetic medium under liquid-state conditions. The results of this study were also well correlated with Rosale et al. [22] where an increase in laccase (by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings under solid-state conditions) activity by adding 1mM copper sulfate was reported. Addition of copper sulfate probably led to expression of the gene encoding laccase production in *P. chryso sporium*. Alvarez et al. (2009) [23] investigated the effect of copper addition on gene expression encoding the ligninolytic enzymes, laccase and MnP in *Ceriporiopsis subvermispora*. They isolated and characterized an ACE1-like transcription factor from *C. subvermispora* (Cs-ACE1) essential for laccase induction on copper addition. Therefore, further research is required to isolate and characterize transcription factor from *P. chryso sporium* essential for laccase induction with copper addition. Laccases belong to the group of blue copper oxidases and contain four copper atoms per molecule, distributed in three different copper-binding sites [24]. Hence, copper presence in the media is important for laccase production. Copper sulphate (3 mmole/kg) was added to the raw materials in order to induce laccase production. The extraction of enzyme was carried out with 50 mM sodium phosphate (10/1/v/w). Thus, the concentration of copper sulphate was around (0.3 mM /L, 47.8 mg /L) and thus the concentration of copper was 11.94 mg/l which is above the environmental norm. However, when copper sulphate was added as inducer, it was used by the fungus to produce laccase that contains 4 copper atoms per molecule. The final concentration of copper in the extracted broth after extraction will be typically less than 11.94 mg/l. Additionally, the optimization of the inducer concentration will bring down the concentrations of copper sulphate used. In fact, preliminary studies have demonstrated a concentration of 1 mmol/kg to be an optimal concentration (further reproducibility studies are being performed to ascertain the actual value). Further, during application of these enzymes in the real world situation, about 5-10 % w/w and v/v will be applied per unit target medium, be it wastewater sludge or other medium so that the overall concentration of copper in the medium will be actually very low respecting environmental norms

When veratryl alcohol (2 mM) and Tween-80 (0.5 % v/w) were used as enzyme inducers, maximum MnP activities of 17.36 ± 0.5 , 540 ± 5 , 631 ± 14 , 507 ± 26 . U/gds (units per gram dry substrate) were obtained for fish residue, brewery waste, pomace and pulp and paper industry sludge, respectively. Maximum LiP activities of 141 ± 3 , 14.1 ± 0.5 U/gds were obtained with pomace and pulp and paper, respectively, whereas it was insignificant for other substrates ($P > 0.05$). The stimulatory nature of veratryl alcohol for lignin peroxidase in *P. chrysosporium* [20] has also been reported earlier. The increase in enzyme production in the presence of veratryl alcohol has been attributed to the protection of the enzyme from H₂O₂ dependent inactivation [20].

Addition of CuSO₄ as an inducer and/or the absence of inducer compound do not result in LiP activities in different wastes. The absence of LiP in the extracts of *P. chrysosporium* (ATCC 24275) in samples could be due to the limitation of LiP assay. LiP was detected using veratryl alcohol assay which interferes with phenolic compounds and other typical aromatics in the lignocellulose compounds present in substrates [25]. Nevertheless, the production of LiP in all cases may not be that higher. The brown color imparted by these substrates to the culture media led to strong absorbance at 310 nm making the assay procedure ineffective [20]. The interference due to aromatic compounds can be eliminated by using another substrate such as, azure B to evaluate LiP, which is under progress.

A decrease in the maximum of MnP activities in all wastes by adding 3mM copper sulfate or without adding any inducer, which is about 2 fold lower than the values obtained when veratryl alcohol is used as inducer was observed. These results clearly showed that veratryl alcohol particularly enhanced MnP production by *Phanerochaete chrysosporium*. It showed that it is possible that MnP can use veratryl alcohol as substrate and transform it to veratryl aldehyde. These results are in accordance with the findings of Gill and Arora [26].

High values of laccase and peroxidase (LiP and MnP) detected with pomace were probably due to insoluble carbohydrates, such as cellulose, hemicellulose, and lignin content of the apple [8] which can stimulate laccase and peroxidase (LiP and MnP) production by *Phanerochaete chrysosporium*. The yields of lignin and cellulose in the different wastes were given in the table 3. 1. High activities of laccase and MnP with brewery waste were observed. This could be due to the high content of lignin and cellulose in brewery waste [27], which might stimulated laccase and MnP production. In

addition, high concentrations of carbon (49.8, 45.7% w/dw) and nitrogen (2.64, 6.42% w/dw) contained in dry pomace and brewery waste, respectively can act as important parameters to enhance laccase levels. Therefore, there is an enormous potential of pomace and brewery wastes as a low cost substrate for laccase and peroxidase production, which is an important industry in Canada and significant producer of low cost wastes. Municipal dewatered sludge was tested for ligninolytic enzyme production. However, no significant growth of *Phanerocheate chrysosporium* was detected and there was no production of ligninolytic enzyme. This was probably due to the presence of inhibitory compounds (chemical polymers used to facilitate sludge decantation and insufficient amount of nutrients in the dewatered sludge. Hence, municipal dewatered sludge was not considered for further studies.

3.2. Effect of extraction methods and buffer pH on peroxidase recovery

Table 3. 3 presents the effect of extraction conditions on peroxidase recovery. The values of MnP and LiP activities obtained after extraction of enzymes by centrifugation are higher than those obtained after extraction by filtration. Filtration would have led to the adsorption of enzymes on the filter which was the case as subsequent washing of the filter with the buffer resulted in enzyme activity. Generally, the enzymes can be recovered by centrifugation which separates the solid phase and the supernatant, followed by filtration [28]. However, in the present case, the filtration after centrifugation was not required as the supernatant obtained was clear. There was a loss of the enzymes in the solid phase (< 7 %). Therefore, extraction by centrifugation was used in this study to optimize the production of ligninolytic enzymes. The effect of extraction buffer pH on the recovery of enzymes was also tested. However, Table 3. 3 showed that there is no significant difference between the activities of MnP and LiP obtained after extraction with a sodium-phosphate buffer pH 5 and those obtained after extraction with the same buffer at pH 6.5. These observations were inconsistent with previous research [25] which indicated that pH is an important factor to control the activity of MnP and LiP. The authors reported that pH 5 is a pH optimum for the recovery of MnP, while pH 6 increases the activity of proteases [25] and decreases LiP and MnP activities. The function of proteases produced by white-rot fungi is to release nitrogen from the substrate or to recycle extracellular proteins by autolysis mechanism [29, 25]. The present study showed that the pH of the extraction buffer had no significant effect on the recovery of lignolytic enzymes ($P > 0.05$). Moreover, the proteases produced by these

fungi are not active at pH 5 and 6.5 (confirmed by independent experiments) and therefore, resulted in no effect of pH in MnP and LiP activities. The literature reports that about 60% of proteases produced by *P. chrysosporium* were found to be acidic proteases [29].

3. 3 Viability assay

The direct determination of fungal biomass in solid substrate is complex as direct weighing of the biomass is not practical. Many indirect methods, e.g., determination of ergosterol content, are in use but most of them have limitations. In this study, the living fungal mycelium as a relative measure of active biomass was used. MPN method suits well for fungal cultivations but is not very widely used.

Viabilities of *P. chrysosporium* cultivated on wastes material (Pomace, brewery waste, fish waste, pulp and paper industry sludge) without inducer, with inducer (CuSO₄ and veratryl alcohol) are shown in Figs. 3. 2, 3. 3 and 3. 4, respectively. Viability varied with the cultivation medium. The results showed that the viability of *P. chrysosporium* increased during the incubation time in all substrates tested except the fish waste until a maximum viability was followed by a drop in viability (Fig. 1 and 2). This drop in viability was due to the depletion of the substrate which caused cell death. When copper sulfate was added to the culture media to induce the production of enzymes, the maximum viability was found after 8 days as seen in Fig 3. 2. However, fishery waste behaved differently and the maximum was obtained at 14 days (due to medium complexity causing poor growth). The copper sulfate addition at this concentration could inhibit *P. chrysosporium* growth and prolongs the duration to obtain maxima. Free copper ions as well as the production of a toxic compound could result in oxidative stress at an advanced stage of fungal growth and could also be responsible for late transcriptional induction [30]. These results were in accordance with [31]. The researchers reported that copper concentrations > 1 mM inhibited *Trametes trogii* growth but did not affect laccase secretion. In the case of veratryl alcohol as seen in Fig 3. 3, the maximum was obtained only after four days. These results could be due to the fact that veratryl alcohol was used as carbon source for *P. chrysosporium* and accelerate its growth. Additionally, the viability in all media except fishery waste stabilized after 4 d. This trend can be attributed to the easy availability of nutrients in these media and also supplementation of nutrients by veratryl alcohol acting as a potential carbon source.

The maximum viability in pomace, pulp and paper waste, brewery waste induced by copper sulfate were 5×10^9 , 1×10^8 , 5×10^6 cfu/g respectively. Maxima in the same media induced by veratryl alcohol were around 2×10^6 , 2×10^8 , and 2×10^6 cfu/g, respectively. Maximum viability obtained in the three media could be explained by high levels of cellulose and lignin content in apples, beer grain and pulp and paper sludge that can induce the growth of *P. chrysosporium*. Fishery wastes do not contain cellulose and lignin which justifies the poor growth of *P. chrysosporium*. Moreover, the fishery waste is more complex and nutrients in this medium are non-available. The pre-treatment of fishery waste may increase the availability of nutrients and can promote the growth of this fungus, which is under progress in our laboratory. Growth maxima obtained with inducers were always higher than the growth maxima obtained without inducer addition. Thus, the inducer not only induces enzyme production, but also stimulates microbial growth.

White-rot fungi commonly produce MnP, LiP and laccase when they grow on solid lignocellulose containing media, such as brewery waste, apple waste (pomace), pulp and paper industry sludge. The inducer and the cultivation media used greatly affect the production of MnP, LiP and laccase. Copper sulfate addition at specific concentration increased laccase production in all the tested media. Veratryl alcohol addition increased LiP production. Based on our results, the expression of LiP, MnP and laccase seemed to be growth dependent. When the enzyme activity results were compared to viability measurements, it was observed that the enzyme activities surged during declining phase of growth.

4. CONCLUSION

In view of the results obtained for solid-state fermentation of different agro-industrial wastes using *P. chrysosporium* to produce ligninolytic enzymes, following conclusions can be drawn:

- 1) Ligninolytic enzymes production (without inducer) using pomace and brewery wastes was 1.5 to 5-folds and 3.7-folds, respectively higher than the fishery and pulp and paper industry sludge.
- 2) Veratryl alcohol addition enhanced LiP and MnP production and accelerated *P. chrysosporium* growth. Copper sulfate was an excellent inducer of laccase activity.

- 3) Extraction buffer pH did not have any impact on the peroxidase recovery, however, centrifugation enhanced the recovery when compared to simple filtration.
- 4) The viability results correlated well with ligninolytic enzyme production, even with or without inducer. MPN method is a rational method to evaluate the growth of *P.chrysosporium*.
- 5) Promising results found with brewery wastes and apple wastes suggest the application of these substrates to large-scale processes in order to produce high amounts of ligninolytic enzyme, which would subsequently be utilized to degrade different recalcitrant compounds.

ABBREVIATIONS

ATCC: American type culture collection

cfu: Colony forming unit

gds: Gram dry substrate

LiP: Lignin peroxidase

MnP: Manganese peroxidase

MPN: Most probable number

OD: Optical density

PAP: Pulp and paper industry sludge

PDA: Potato dextrose agar

SSF: Solid state fermentation

U/gds: Units per gram dry substrate

w/dw : Weight per dry weight

w/v: Weight per volume

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Grant 355254, Canada Research Chair), FQRNT (ENC

125216) and MAPAQ (No. 809051) for financial support. The views or opinions expressed in this article are those of the authors.

REFERENCES

- [1] R. Shrivastava, V. Christian, B.R.M. Vyas, Enzymatic decolorization of sulfonphthalein dyes, *Enzyme Microb Technol.* 36 (2005) 333-337.
- [2] J.A. Bumpus, M. Tien, D. Wright, S.D. Aust, Oxidation of persistent environmental pollutant by a white rot fungus, *Science.* 228 (1985) 1434-1436.
- [3] C.D. Barclay, R.L. Legge, G.F. Farquha, Modelling the growth kinetics of *Phanerochaete chrysosporium* in submerged static culture, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 1887-1892.
- [4] N. Moredo, M. Lorenzo, A. Dominguez, D. Moldes, C. Cameselle, A. Sanroman, Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19 (2003) 665-669.
- [5] A. Hatakka, Lignin modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation, *FEMS Microbiol. Rev.* 13 (1994) 125-135.
- [6] A.J. Hacking, *Economic Aspects of Biotechnology*, Cambridge: Cambridge University Press; 1987, p. 317.
- [7] K. Iwashita, Recent Studies of Protein Secretion by Filamentous Fungi, *J. Biosc. Bioeng.* 94 (2002) 530-535.
- [8] F. Vendruscolo, P.C.M. Albuquerque, F. Streit, E. Esposito, J.L. Ninow, Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications, *Crit. Rev. Biotechnol.* 28 (2008) 1-12.
- [9] S. I. Mussatto, Biotechnological potential of brewing industry by-products, in: P. S. Nigam, A. Pandey (Eds.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, Springer Netherlands., 2009, pp. 313-326.
- [10] S. G. Villas-Bôas, E. Esposito, M. M. Mendonca, Novel lignocellulolytic ability of *Candida utilis* during solid state cultivation on apple pomace, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18 (2002) 541-545.
- [11] P. S. Nigam, A. Pandey, *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, Springer Netherlands, 2009.
- [12] A. Gnanamania, M. Jayaprakashvel, M. Arulmani, S. Sadulla, Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes, *Enzyme Microb Technol.* 38 (2006) 1017-1021.
- [13] M. Tien, T.K. Kirk, Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81 (1984) 2280-2284.
- [14] J. Sealey, A.J. Ragauskas, Residual lignin studies of laccase-delignified kraft pulps, *Enzyme Microb Technol.* 23 (1998) 422-426.

- [15] P.J. Collins, A.D.W. Dobson, Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 3444-3450.
- [16] X. Fujian, C.H. Zhang and L. Zuohn, Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam exploded straw as substrate, *Biores. Technol.* 80 (2001) 149-151.
- [17] H.A. Thomas, Bacterial densities from fermentation tube tests, *J. Am. Water Work Assoc.* 34 (1942) 572-576.
- [18] SPSS 1999. SPSS Base 10.0 Application Guide. SPSS, Chicago, IL.
- [19] N.J. Gottelli, AM. Ellison, A Primer of Ecological Statistics, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 2004.
- [20] D.S. Arora, P.K. Gill, Comparison of two assay procedures for lignin peroxidases, *Enzyme and Microb Tech.* 28 (2001) 602-605.
- [21] C. Galhaup, H. Wagner, B. Hintertoisser, D. Haltrich, Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*, *Enzyme Microbiol. Technol.* 30 (2002) 529-536.
- [22] E. Rosale, S. R. Couto, A. Sanromán, Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings, *Enzyme Microb Technol.* 40 (2007) 1286-1290.
- [23] J.M. Alvarez, P. Canessa, R.A. Mancilla, R.Polanco, P.A. Santibáñez, R. Vicuña, Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispota* is mediated by an ACE1-like copper-fist transcription factor, *Fungal Genet Biol.* 46 (2009) 104-111.
- [24] E.I. Solomon, U.M. Sundaram, T.E. Machonkin, Multicopper oxidases and oxygenases, *Chem. Rev.* 96 (1997) 2563-2605.
- [25] E.M. Silva, S.F. Martins, A.M.F, Milagres, Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*, *Bioresource Technol.* 99 (2008) 2471-2475.
- [26] P.K. Gill, D.S. Arora, Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white-rot fungi, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30 (2003) 28-33.
- [27] D. Wang, A. Sakoda, M. Suzuki, Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain, *Bioresource Technol.* 78 (2001) 293-300.
- [28] L. Li, X.Z. Li, W.Z. Tang, J. Zhao, Y.-B. Qu, Screening of a fungus capable of powerful and selective delignification on wheat straw, *Lett. Appl. Microbiol.* 47 (2008) 415-420.
- [29] D.R. Cabaleiro, S.R. Couto, A. Sanroman, M.A. Longo, Comparison between the protease production ability of ligninolytic fungi cultivated in solid state media, *Process Biochem.* 37 (2002) 1017-1023.
- [30] J. Fernandez-Larrea, U. Stahl, Isolation and characterization of a laccase gene of *Podospora anserina*, *Mol. Gen. Genet.* 252 (1996) 539-551.

- [31] L. Levin, F. Forchiassin, A. M. Ramos, Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*, *Mycologia*, 94(2002) 377–383.
- [32] S. G. Villas-Bôas, E. Esposito, M. M. Mendonca, Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19 (2003) 461–467.
- [33] S. I. Mussatto, G. J. M. Rocha, I. C. Roberto, Hydrogen peroxide bleaching of cellulose pulps obtained from brewer's spent grain, *Cellulose*. 15 (2008) 641–649.
- [34] M. J. Jackson, M. A. Line, Organic Composition of a Pulp and Paper Mill Sludge Determined by FTIR, ¹³C CP MAS NMR, and Chemical Extraction Techniques, *J. Agric. Food. Chem.* 45 (1997) 2354-2358.

Table 3. 1 Physical-chemical characteristics of wastes

±represents standard error calculated using duplicate sets

Parameters	Apple waste (pomace)	Brewery waste	Pulp and paper industry sludge	Fishery waste
Moisture % (w/w)	84.3± 0.5	76.6± 0.3	78± 0.3	65.6± 0.4
Suspended solids (g/l)	202± 1.3	162.7± 1.5	—	419.65± 2.5
Total solids (g/kg)	257± 1.3	234.4± 2.1	302.61± 2.2	515± 2.7
Volatile solids (g/kg)	231± 1.8	216± 2.3	273± 2.4	442.6± 2.9
Total Carbon (g/kg)	127.9	106.9	—	288.9
Total Nitrogen (g/kg)	6.8	15.0	—	25.6
Sulfur (g/kg)	0.6	1.3	—	1.6
Lignin (W/ dry weight)	23,5 [†]	27.8 ± 0.3 [‡]	27.42 ^{††}	-
Cellulose (W/ dry weight)	7.2 [†]	16.8 ± 0.8 [‡]	57.08 ^{††}	-

[†][32]

[‡][33]

^{††}[34]

N.B.: Fishery waste does not contain lignin and/cellulosic material

Table 3. 2 Effect of inducer on MnP, LiP and laccase production , ND: not detectable; ±represents standard error calculated using duplicate sets; shaded cells represent maximum values

Inducer	Time (day)	MnP (U/gds)				Laccase (U/gds)				LiP Laccase (U/gds)			
		Pomace	Brewery waste	Pulp and paper	Fishery waste	Pomace	Brewery waste	Pulp and paper	Fish waste	Pomace	Brewery waste	Pulp and paper	Fish waste
Veratryl alcohol	1	73.3±0	14.9±0	12.2±0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2	17.9±0	14.5±0.4	1.3±0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5	29.3±1.1	39.7±1.2	78.7±0.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	7	14.3±3.2	65±0.7	26±0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	9	301.5±2.5	301.5±8.3	308.1±8	ND	ND	ND	ND	ND	141.4±3.4	ND	14.1±0.5	ND
	12	258.1±2.4	254.12±4.7	7.6±0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	13	468.7±5.1	344.2±4.9	507.5±12	4.2±0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	14	631.25±14	540.2±5.1	487.5±0	17±0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	56±0.6	44±0.8	28.3±0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Copper sulphate	1	2±0	0.3±0	1.7±0	0.6±0	0.0175	5.2±0.4	3.86±0.2	5.5±0	ND	ND	ND	ND
	2	2.6±0	3.6±0	6.3±0.3	ND	2.1±0.1	11.6±0.1	86.5±0.9	9.2±0.1	ND	ND	ND	ND
	3	10.4±0.1	27.9±1.2	213.2±3.2	ND	23.2±0.8	166.8±6.2	72.6±1.4	67.1±1.2	ND	ND	ND	ND
	4	213.5±3.1	22.2±1.4	39.6±1.2	9.6±0.5	40.4±1.2	133.5±5.3	26.6±0.9	45.0±0.8	ND	ND	ND	ND
	8	24±0.1	41.25±1.5	34.3±1.3	17.4±0.6	719.9±14.6	738.9±9.2	308.8±12.1	71.4±0.9	ND	ND	ND	ND
	9	198.2±1.9	50.5±1.9	26.3±1.2	ND	334.8±7.2	709.1±8.7	235.1±10.8	94.4±1.2	ND	ND	ND	ND
	10	72.0±1.2	17.8±0.9	4.7±0	ND	231.4±6.1	500.4±9.2	198.2±10.2	31.1±0.5	ND	ND	ND	ND
	11	6.1±0	291±2.8	22.8±0.8	ND	211.2±6.1	387.2±4.5	175.3±11.1	22.1±0.4	ND	ND	ND	ND
14	ND	8.1±0	10.5±0.5	ND	200.4±5.2	105.1±2.1	173.1±7.9	14.5±0.5	ND	ND	ND	ND	
15	20.85±1.1	ND	ND	ND	198.2±5.9	78.1±1.4	167.3±6.6	10.9±0.4	ND	ND	ND	ND	
Without inducer	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	6	ND	ND	ND	10.6±1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	7	ND	17.3125	ND	26.9±0.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	5±0	58.75	ND	10.3±0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	11	19.6±0.4	54	18.8±1.7	6.8±0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	12	170.6±6.1	108.75	135±1.7	47.4±0.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	13	243.7±5.3	175	164±0.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	3.125±0	17.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

Table 3. 3 Effect of extraction methods and buffer pH on peroxidase and laccase recovery

ND: not detectable; ±represents standard error calculated using duplicate sets

Enzymes activities	wastes	Effect of extraction method		Effect of Buffer pH	
		Filtration	Centrifugation	pH 5	pH 6.5
MnP (IU/gds)	Pomace	17.5±0.8	301.5±2.5	299,67±2.6	301,5±2.5
	Brewery waste	24.6±2.7	301.5±8.3	285.43±4.5	301 ±8.
	Pulp and paper sludge	14.7±0.3	308.8±12.1	303.5±8	308,1±12
	Fishery waste	4.2± 0.1	8.75± 0.3	43,2±0.9	41,3125±1.6
LIP (IU/gds)	Pomace	93.6± 1.2	141.3± 3.3	139,6±4,7	141.3± 3.3
	Brewery waste	ND	ND	ND	ND
	Pulp and paper sludge	0.45	14.1±0.5	13,9±1	14.1±0.5
	Fishery waste	0.957	0.1	0.957	1.02
Laccase(IU/gds)	Pomace	ND	ND	ND	ND
	Brewery waste	ND	ND	ND	ND
	Pulp and paper sludge	ND	ND	ND	ND
	Fishery waste	ND	ND	ND	ND

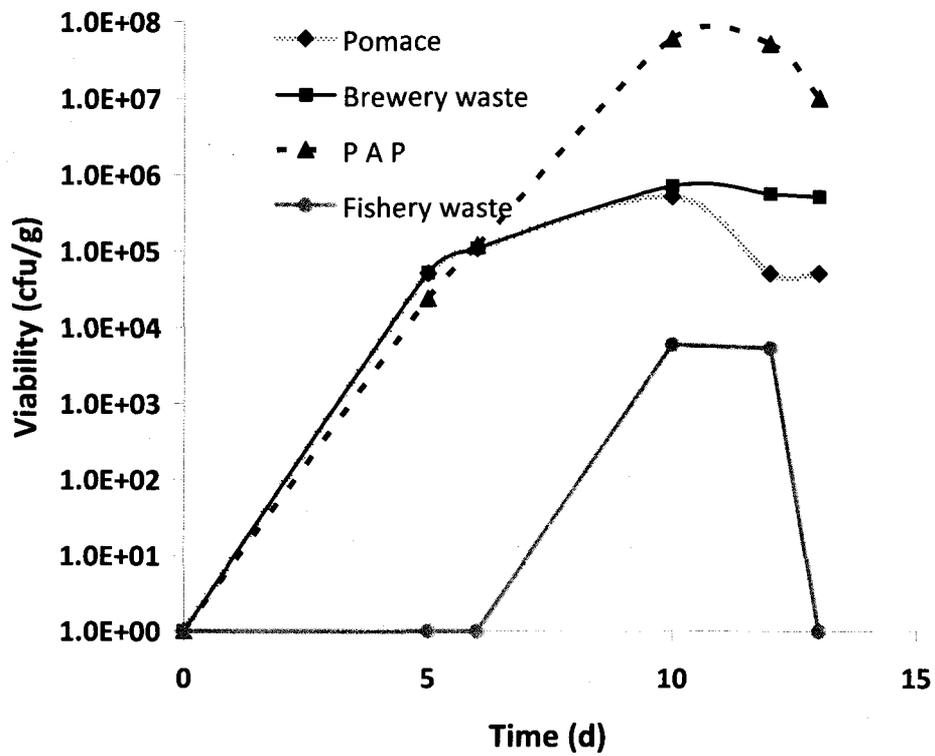


Figure 3. 1 Viability of *P. chrysosporium* cultivated on wastes (Pomace, brewery waste, fishery waste, pulp and paper industry sludge: P A P), without inducer. Viability was determined using MPN method.

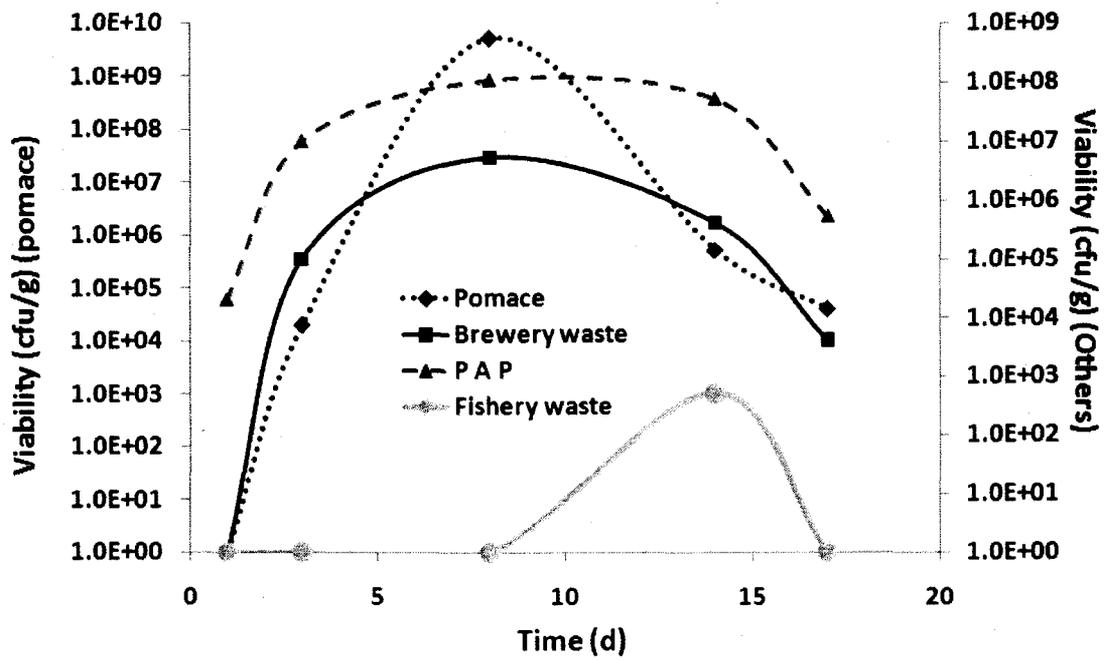


Figure 3. 2 Viability of *P. chrysosporium* cultivated on wastes (Pomace, brewery waste, fishery waste, pulp and paper industry sludge: P A P), inducer (copper sulphate, 3 mM). Viability was determined using MPN method.

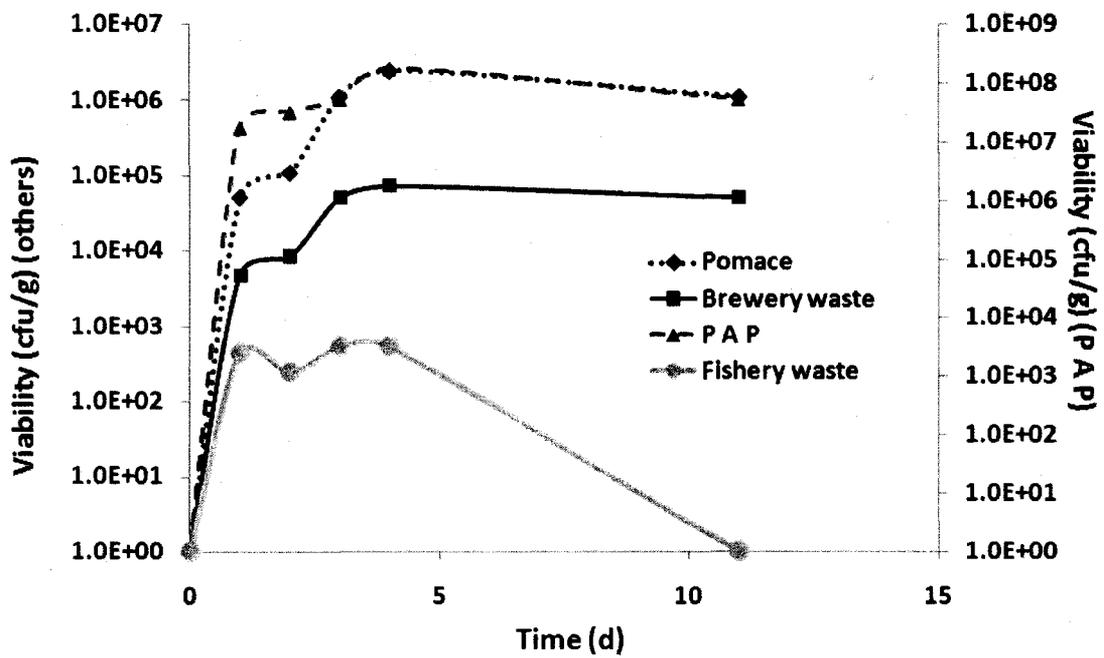


Figure 3. 3 Viability of *P. chrysosporium* cultivated wastes (Pomace, brewery waste, fishery waste, pulp and paper industry sludge: P A P), inducer (veratryl alcohol, 2 mM). Viability was determined using MPN method



CHAPITRE III
PARTIE 2
PARAMETER OPTIMIZATION FOR PRODUCTION OF
LIGNINOLYTIC ENZYMES USING AGRO-INDUSTRIAL
WASTES BY RESPONSE SURFACE METHOD

Fatma Gassara, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, Rojan P. John, M. Verma, J.R. Valero

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

Biotechnology and Bioprocess Engineering 16: 343-35. Publié



RÉSUMÉ

La production de manganèse et de lignine peroxydase (LiP, MnP) et de laccase par *Phanerocheate chrysosporium* dans les déchets solides de jus de pomme (apple pomace) et de microbrasserie a été optimisée par la méthodologie de surface de réponse. L'effet de l'humidité et des concentrations de sulfate de cuivre et de veratryl alcool (VA) sur la production d'enzymes a été étudiée. L'humidité et VA ont exercé un effet positif important sur la production de MnP, LiP et la viabilité de *P. chrysosporium* ($p < 0,05$). Par contre, le sulfate de cuivre a produit un effet négatif sur ces trois paramètres. Toutefois, le sulfate de cuivre et l'humidité ont eu un effet positif significatif ($p < 0,05$) sur la production de laccase, mais VA a eu un effet positif insignifiant ($p < 0,05$). Des valeurs maximales de MnP, LiP et de la viabilité de *P. chrysosporium* dans les déchets solides de jus de pomme (1287,5 U de MNP / gss (unités / gramme de substrat sec), 305 U LiP / gss, Log 10 viabilité = 10,38) et les déchets de microbrasserie (792 U MnP / gss, log 10 viabilité = 9,83) ont été obtenues en utilisant 80% d'humidité, 3 mmol / kg de VA et 0,5 mmole / kg de cuivre. La production maximale de LiP dans les déchets de microbrasserie (7,87 U / gss) a été obtenue en utilisant une humidité de 70%, 2 mmole / kg VA et 1 mmole/kg de sulfate de cuivre. De plus, la production maximale de laccase dans les déchets solides de jus de pomme (789 U / gss) et les déchets de microbrasserie (841 U / gss) a été obtenue en utilisant 80% d'humidité, 3 mmole / kg de VA et 1,5 mmole / kg de cuivre. Ainsi, l'optimisation de l'humidité, les concentrations de VA et de sulfate de cuivre a été pertinente pour améliorer la production d'enzymes ligninolytiques et la viabilité de *P. Chrysosporium*.

Mots clés: enzyme ligninolytiques, *Phanerocheate chrysosporium*, surface de réponse, humidité, inducteurs

ABSTRACT

Lignin and manganese peroxidase (LiP, MnP) and laccase production by *Phanerocheate chrysosporium* was optimized by response surface methodology for brewery waste and apple pomace. The effect of moisture, copper sulphate and veratryl alcohol (VA) concentrations on enzyme production was studied. Moisture and VA had significant positive effect on MnP and LiP production and the viability of *P. chrysosporium* ($p < 0.05$) and copper sulphate produced a negative effect. However, moisture and copper sulphate had a significant positive ($p < 0.05$) effect on laccase production, but VA had an insignificant positive effect ($p < 0.05$). Higher values of MnP, LiP and viability of *P. chrysosporium* on apple pomace (1287.5 U MnP/gds (units/gram dry substrate), 305 U LiP/gds, and 10.38 Log 10 viability) and brewery waste (792 U MnP/gds and 9.83 Log 10 viability) were obtained with 80% moisture, 3 mmol/kg VA and 0.5 mmol/kg copper. LiP production in brewery waste (7.87 U/gds) was maximal at 70% moisture, 2 mmol/kg VA and 1 mmol/kg copper. Higher production of laccase in apple pomace (789 U/gds) and brewery waste (841 U/gds) were obtained with 80% moisture, 3 mmol/kg VA and 1.5 mmol/kg copper. Thus, moisture along with VA and copper sulphate was pertinent for the production of ligninolytic enzymes and increased cell viability.

Key words: Ligninolytic enzyme, *Phanerocheate chrysosporium*, response surface, moisture, inducers.

1. INTRODUCTION

Research on production of ligninolytic enzymes has experienced a leap in the last two decades to respond to potential applications, such as food, wastewater treatment, bioremediation and nano-biotechnology [1, 2]. White rot fungi are mass producers of ligninolytic enzymes with the most common fungus being *Phanerochaete chrysosporium* [3]. This microorganism has been widely employed in the bioremediation of pollutants, such as polynuclear aromatic hydrocarbons as they produce extracellular enzymes, such as manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP) and laccase [4,5]. Conventionally, the production of enzymes is very costly and raw material constitutes 40-60% of the production cost [6]. The use of agro-industrial waste as raw material can reduce the cost of enzyme production. Large amounts of agro-industrial waste produced worldwide represent a serious environmental problem and value-addition has been seen as a recent approach to overcome the challenge [7, 8].

Recently, solid state fermentation (SSF) has gained much popularity in the production of primary and secondary metabolites with high productivity in a relatively low cost process by using agro-industrial residues as substrates. SSF encompasses several advantages, such as reduction of the production costs, high volume productivity, relatively higher concentration of the products, less effluent generation, requirement for simple fermentation equipments and improved product recovery are outstanding [9]. The main problems of SSF processes to produce enzyme are the changes in fermentation conditions and the effect of inducers that differ amongst fungi and substrates. Veratryl alcohol is a secondary metabolite secreted by the white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* [10] and its nutrient media has been reported to exert a positive effect on the synthesis of ligninolytic enzymes [11]. It is also shown that copper ions induce laccase production by some basidiomycetes [12]. Hence, the optimization of the concentrations of these inducers is very important to maximize ligninolytic enzymes production. Moreover, moisture represents a key parameter in SSF [13], which should be optimized.

The application of statistical methodologies is helpful in defining the effects and interactions of the physiological factors that play a role in biotechnological processes, such as microbial enzyme production. Response Surface Methodology (RSM) is a

collection of statistical and mathematical techniques useful for developing; improving and optimizing processes. There are different types of RSM designs, such as 3-level factorial design, central composite design (CCD) (14), Box-Behnken design [15], and D-optimal design [16]. RSM has been successfully utilized to optimize the compositions of microbiological media and improving solid state fermentation process [17].

The aim of the present study is to evaluate the influence of variable fermentation parameters (moisture, veratryl alcohol and copper sulphate concentration) on the production of ligninolytic enzyme by *Phanerocheate chrysosporium*. As per the published literature so far to the best of our knowledge, there is no study reported on the coordinate influence of moisture and the two inducers on ligninolytic enzymes production by *P. chrysosporium* using brewery and apple pomace under solid state conditions. Optimization of the production of ligninolytic enzymes was performed using an experimental design and it was analyzed by the response-surface method.

2. MATERIALS AND METHODS

2. 1 Organism and inoculum preparation

The microorganism used in this study was *P. chrysosporium* (ATCC 24275). This strain was maintained and periodically sub-cultured on potato–dextrose–agar (PDA) medium at $4 \pm 1^\circ\text{C}$. The culture of *P. chrysosporium* was grown on PDA petri plate and incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. The spores were harvested from the sporulation medium plates and inoculated into sterile distilled water contained in test tubes and stored in the freezer at -20°C , until use. To recover fungal spores devoid of mycelial contamination, filtration of fermented broth was carried out by using glass wool.

2. 2 Solid-state fermentation

Experiments were carried out at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 14 days using 500 mL Erlenmeyer flasks containing 40 g of the two solid substrates (apple pomace and brewery waste) along with 0.5 % v/w Tween 80 (in duplicate). This medium was inoculated with spore suspension of 10^6 spores/g and incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 14 days. Two solid substrates used in this study were screened for maximum ligninolytic enzyme production based on our earlier study [18]. The solid substrates comprised brewery waste (LA BARBERIE, Quebec, Canada) and apple pomace (Lassonde Inc., Rougemont, Montreal, Canada). There was not much variability in the composition because apple pomace is obtained from the same industry, and same source of apples. Likewise, the spent grain in brewery

waste is derived from the same source of malt grain. The physical-chemical characteristics of these substrates have been already presented in details in our earlier publication (2010) [18].

2. 3 Experimental design and optimization

The design used in this study is Central Composite Designs (CCD) which is a first-order (2^N) design augmented by additional centre and axial points to allow estimation of the tuning parameters of a second-order model. In order to identify the significant factors that affect the responses, an attempt was made to improve the composition of the medium by comparing different levels of several factors that were found to have more influence on four dependant variables: LiP production, MnP production, laccase production and the growth of *Phanerocheate chrysosporium*. The impact of three independent quantitative variables, including moisture (X_1), veratryl alcohol (X_2) and copper sulfate (X_3), was evaluated by a factorial central composite design (CCD) to find the optimal concentrations of these three factors.

A study of determination of the provisional optimal values of these independent variables was carried out by using the steepest ascent method and was found to be significant. In this regard, a set of 20 experiments including, six center points (0,0,0) and six axial points ($\alpha = 1.68$) and 8 points corresponding to a matrix of 2^3 which incorporates 8 experiments including 3 variables (+1, -1, 0), were carried out. Each variable was studied at two different levels (-1, +1) and center point (0) which is the midpoint of each factor range. The minimum and maximum range of variables investigated and the full experimental plan with respect to their actual and coded values are listed in Tables 4. 1 and 4. 2, respectively. A multiple regression analysis of the data was carried out by STATISTICA 6 of STATSOFT Inc. (Thulsa, U.S.) by surface response methodology and the second-order polynomial equation that defines predicted responses (Y_i) in terms of the independent variables (X_1 , X_2 , and X_3):

$$Y_i = b_{0_i} + b_{1_i}X_1 + b_{2_i}X_2 + b_{3_i}X_3 + b_{11_i}X_1^2 + b_{22_i}X_2^2 + b_{33_i}X_3^2 + b_{12_i}X_1X_2 + b_{23_i}X_2X_3 + b_{13_i}X_1X_3 \quad (1)$$

Where, Y_i = predicted response, b_{0_i} is intercept term, b_{1_i} , b_{2_i} , b_{3_i} linear coefficients, b_{11_i} , b_{22_i} , b_{33_i} squared coefficients and b_{12_i} , b_{23_i} , b_{13_i} are interaction coefficients and i

refer to the response. Combination of factors (such as X_1X_2) represents an interaction between the individual factors in the respective term. There are 4 different responses, growth (viability), MnP, LiP and laccase production. These responses are a function of the level of factors. The response surface graphs indicate the effect of variables individually and in combination and determine their optimum levels for maximal, growth, MnP, LiP and laccase production.

2. 4 Enzyme extraction and moisture measurement

One gram of fermented sample was obtained and mixed with 50 mM sodium phosphate buffer (10/1: v/w) at pH 6.5. The mixture was later centrifuged at 7000 x g for 20 min. The supernatant collected was analyzed for respective enzyme activity (by measuring optical density) expressed as activity per gram of dry culture. The dry culture weight was measured using a moisture analyzer (HR-83 Halogen, Mettler Toledo, Switzerland) by taking into account initial and final weights.

2.5 Enzyme assays

LiP activity was assayed spectrophotometrically at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ using veratryl alcohol as a substrate and monitoring the formation of veratryl aldehyde by hydrogen peroxide at 310 nm [19]. One unit of LiP activity (U) is defined as the amount of enzyme which produces 1 μmol of veratryl aldehyde per min under the assay conditions.

Laccase activity was assayed spectrophotometrically at $45 \pm 1^\circ\text{C}$ using 2,2-azino bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) as a substrate and monitoring the formation of ABTS^+ at 420 nm ($\epsilon_{420} = 36 \text{ mM/cm}$) (20). One unit of enzyme activity (U) is defined as the amount of enzyme which produces 1 μmol of product per min under the assay conditions.

MnP activity was measured spectrophotometrically at $38 \pm 1^\circ\text{C}$ using MnSO_4 as a substrate and monitoring the formation of Mn^{3+} as described by Fujian et al. (2001) (21). The reaction mixture contained 1.70 ml of citrate-phosphate buffer (pH 3; 0.1 mol/l), 0.05 ml of MnSO_4 (0.40 mol/l), 0.2 ml of enzyme and 0.05 ml of H_2O_2 (0.016 mol/l). One unit of MnP activity was defined as 10 % of OD_{240} (optical density) nm increase/minute.

2. 6 Viability assay

In order to measure the amount of living fungal biomass in solid-state cultivation, viability assay was used as an indicator. Modified most probable number (MPN) method was

used to determine the viability of broken fungal mycelium in samples containing mycelium and residual substrate [22]. A fungal-colonized substrate was first diluted in sterile water. Afterwards, adequate dilutions were performed for these samples after homogenization. At least five different dilutions per sample were used for the analysis. Each dilution was aseptically pipetted on an agar plate at six different spots. Experiments were carried out in duplicates. The growing spots on the plates were calculated after the incubation of plates for 1 day. While calculating the results, the first dilution, where all the pipetted spots did not grow, and the last dilution, where at least one pipetted spot grew, and all the samples in between these combinations were taken into account. Finally, the results were calculated in colony forming units (cfu's).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3. 1 Effects of variables on peroxidases production and the viability of *Phanerocheate chrysosporium*

The central composite design was used to find the suitable values of the variables on ligninolytic enzymes production by *Phanerocheate chrysosporium* by using brewery waste and apple pomace as solid substrates. The results of CCD experiments consisted of experimental data for studying the effects of three independent variables; moisture, veratryl alcohol and copper sulfate on ligninolytic enzymes production and the viability of *Phanerocheate chrysosporium* and are presented in Table 4. 2. Enzymes production and viability exhibited different responses in the two media assayed, namely brewery waste and apple pomace. The data were fitted into a second-order polynomial function (Eq. (1)). Linear, quadratic and interaction coefficients of variables under study that were found to be significant at $p < 0.05$ were retained in reduced models. Data were best fitted by a first-order polynomial equation, as it can be inferred from the good agreement of experimental data with those predicted by the model. The quality of the model fit was evaluated by the coefficient R^2 and its statistical significance was determined by an F-test. R^2 represents the proportion of variation in the response data that can be explained by the fitted model. High R^2 was considered as an evidence for the applicability of the model in the range of variables included. It should be noted that a R^2 value greater than 0.75 indicates the aptness of the model. The coefficients of determination (R^2) are presented in Table 3. In all models, R^2 higher than 0.84 indicated that the model fitted well into the experimental results. The analysis of variance (Table 3) indicated that the model terms of X_1 (moisture), X_2 (veratryl alcohol) had significant positive effect on MnP

and LiP production and the viability of *Phanerochaete chrysosporium* ($p < 0.05$) using both brewery wastes and apple pomace. This could be explained by the fact that in solid state fermentation (SSF), the fermentation was carried out in the absence of free water, however the substrate must possess enough moisture to support the growth and metabolism of microorganisms [13]. Moreover, veratryl alcohol particularly enhanced LiP and MnP production by *Phanerochaete chrysosporium*. This is due to the possibility of use of veratryl alcohol by LiP as substrate and its transformation to veratryl aldehyde [23]. Furthermore, veratryl alcohol can be used as a carbon source by *Phanerochaete chrysosporium* to increase its growth and enhance its secondary metabolism. The results shown in Table 4. 3 indicated the absence of interactive effects of variables on MnP, LiP production and viability of *Phanerochaete chrysosporium* grown on apple pomace and brewery waste. However, veratryl alcohol concentration had a significant positive interactive effect with moisture on MnP production in apple pomace ($p < 0.05$). On the contrary, copper sulphate had a significant negative interactive effect with moisture and veratryl alcohol on MnP in apple pomace ($p < 0.05$). MnP production may have been triggered by stress conditions (low oxygen transfer) and toxicity due to high copper concentration (in contrast to other essential metals, copper is toxic to most fungi even at very low concentrations) [24].

The interactive effect of moisture, veratryl alcohol and copper concentration on MnP production has not been described earlier in literature. As the moisture increased, the availability of the two inducer compounds, namely, copper sulphate and veratryl alcohol increased too. The increase in VA led to a positive effect on viability, LiP, MnP and also to some extent on laccase. Meanwhile, increase in copper sulphate decreased the viability and thus MnP and LiP decreased and only laccase increase was prominent. This translates to the fact that increase in viability is related to MnP and LiP production and not laccase production.

It is shown in Table 4. 3 that the linear term of models X_3 (copper sulfate) had a significant negative effect on MnP and LiP production and the viability of *Phanerochaete chrysosporium* ($p > 0.05$) using both brewery wastes and apple pomace. These results could be due to the deliberate addition of copper sulphate which also furnishes a heavy metal, Cu that might affect the growth of *Phanerochaete chrysosporium*, the decrease of fungal growth rate is sometimes accompanied with a prolonged lag phase. It was shown

that Cu^{2+} inhibited the growth of *Ganoderma lucidum* at concentrations less than 1 mM, while 150 ppm of Cu^{2+} decreased the growth rate of *P. chrysosporium* [24].

3.2 Effects of variables on laccase production

The results shown in Table 4. 3 indicated that the linear term of model X_1 (moisture) and X_3 (copper) had a significant positive effect on laccase production. This is due to the induction of laccase production by copper ions that are distributed in three different copper-binding sites in the laccase molecule. Copper has been reported to be a strong laccase inducer in several species, including *P. chrysosporium* [25] and *T. versicolor* [20]. It is known that copper induces both laccase transcription and activity [20], and the increase in activity is proportional to the amount of copper added. Addition of copper sulfate probably led to expression of the gene encoding laccase production in *P. chrysosporium*. Alvarez et al. [12] investigated the effect of copper addition on gene expression encoding the ligninolytic enzymes, laccase and MnP in *Ceriporiopsis subvermispora*. They isolated and characterized an ACE1-like transcription factor from *C. subvermispora* (Cs-ACE1) essential for laccase induction on copper addition. Moisture also plays an important role in the growth of microorganism under solid-state condition. It increases the oxygen transfers to microorganism and the availability of nutrients in media. Hence, when moisture content is high, the growth of microorganism is prominent and the production of secondary metabolites is higher too.

The 3-D response surface plots are the graphic representation of the regression equation for MnP, LiP, laccase production and Log10 viability (Fig.4. 1; Fig.4. 2; Fig.4. 3.; Fig 4. 3). The effect of pair wise interaction of the parameters is prominently depicted in the 3-D graphs in which the third parameter is kept constant. The results shown in Table 4. 3 also indicated the fact that interactive effects of variables were insignificant on laccase production and viability of *Phanerochaete chrysosporium* in both apple pomace and brewery waste. Veratryl alcohol was shown to have positive effect (Table 4. 3) on laccase production which was insignificant ($p > 0.05$). Aromatic alcohols, such as VA (a secondary metabolite produced by ligninolytic cultures of white-rot fungi, and known to be a cofactor involved in the degradation of lignin and xenobiotic pollutants by LiP), which themselves are not substrates for laccases, but induce laccase production [26]. In a previous study using RSM to optimize laccase production by the ascomycete

Botryosphaeria [27], VA concentration was among the main factors increasing enzyme production; however, in the range assayed it did not significantly influence laccase production by *Phanerocheate chrysosporium*.

3.3 Determination of optimal conditions and optimal responses

Using the method of experimental factorial design and response surface analysis, the optimal conditions to obtain a high enzyme yield were determined. The validity of the model was proved by fitting different values of the variables into the model equation and by carrying out the experiment at those optimized/ model values of the variables. The best conditions for the production of MnP and the viability of *P. chrysosporium* in apple pomace and brewery waste were: 80% moisture, 3mmol/kg VA and 0.5 mmol/kg copper (Table 4. 2).

However, the best conditions for the production of LiP in apple pomace were 80% moisture, 3 mmol/kg VA and 0.5 mmol/kg and in brewery waste were 70% moisture 2 mmol/kg VA and 1 mmol/kg copper. In the apple pomace, higher LiP, MnP production and viability for *P. chrysosporium* were 305 U LiP/gds, 1287.5U MnP/gds and 10.38 Log 10 viability, respectively. Likewise, in brewery waste higher MnP production and viability were reported to be 792 U MnP/gds and 9.87Log 10 viability, respectively. Meanwhile, LiP production in brewery waste was very low in all tested conditions and the maximum obtained was 7.87 U/gds. Lower production of LiP in brewery waste suggested that either the fungus produced no significant levels of this enzyme in brewery waste or that its production required different growth conditions, such as moisture and inducer concentrations. The best conditions for the production of laccase in apple pomace and brewery waste (80% moisture, 3 mmol/kg VA and 1.5 mmol/kg copper) are different than the ones for MnP, LiP production and the viability of *P. chrysosporium*. This medium rendered highest laccase production in apple pomace (789 U/gds) and in brewery waste (841 U/gds). Extracellular ligninolytic enzymes (laccase) are regulated by heavy metals at the transcription level as well as during their catalytic action [24]. Cu²⁺ has been reported to be a strong laccase inducer in several species, examples being *T. pubescens* [28] and *T. versicolor* [29]. Production of additional laccase isoenzymes not present under natural conditions was observed after Cu²⁺ addition in *P. chrysosporium* [25] and *Marasmius quercophilus* [30].

Productivity of ligninolytic enzymes in SSF of selected agro-residues (combination of neem hull and wheat bran wastes) and by co-cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* reached a maximum production of laccase of 772 U/gds and manganese peroxidase of 982 U/gds [31]. In this work, very high activity of laccase (841 U/gds), accompanied by MnP activity (1287.5U /gds) and LiP (305 U/gds), were obtained on a simple media without pre-treatment, that does not contain aromatic toxic inducers and is routinely used for stimulating ligninolytic enzymes synthesis. No addition of expensive media is required and the use of inexpensive agro-industrial wastes will have important economic and environmental advantages. The application of cheap crude enzyme mixtures can be more efficient than isolated enzymes, in cases where high substrate specificity is not required [32]. Therefore, these media could be an attractive and alternative source of these enzymes, which have gained renewed interest in recent years, mainly due to their applications in paper industries for pulp treatment, waste water treatment and many other fields. Further, the agro-industrial wastes are either incinerated or used as cheap animal feed which can be transformed into value-added thus mitigating greenhouse gas emissions and contributing in the effort to protect climate change.

The principal aim of our study is the optimization of the production of combination of MnP, LiP and laccase as these three enzymes will be applied together for their end-use i.e. bioremediation and/or juice clarification. The maximal production of MnP and LiP in apple pomace was obtained under following conditions: 80% moisture, 3 mmol/kg VA and 0.5 mmol/kg copper. However, the maximal production of laccase in the same medium was obtained under different conditions: 80% moisture, 3mmol/kg VA and 1.5 mmol/kg copper. Likewise, the maximal production of LiP, MnP and laccase was also obtained under different conditions in brewery wastes. In order to evaluate the same, we calculated the Σ value for the three enzymes activities (MnP, LiP and Laccase) (Table 2). The results indicated that the maximal production of Σ value for the three enzymes in apple pomace was obtained with 80% moisture, 3mmol/kg VA and 0.5 mmol/kg copper. However, the optimal production of Σ value of the three enzymes in brewery waste was obtained with 80% moisture, 3mmol/kg VA and 1.5 mmol/kg copper. Thus, the maximum production of Σ value of the three enzymes depends on the type of medium. This may be due to the difference in the composition of the medium and also the initial

concentration of copper that was contained in apple pomace and brewery waste prior to copper addition.

4. CONCLUSION

The results of central composite experimental design indicated that moisture and veratryl alcohol had significant positive effect on MnP and LiP production and the viability of *Phanerocheate chrysosporium* grown on apple pomace and brewery waste ($p < 0.05$) and copper sulphate had a negative effect. Meanwhile, moisture and copper sulphate had a significant positive effect on laccase production, but veratryl alcohol had a positive effect which was not significant ($p > 0.05$). The interactive effect of moisture, veratryl alcohol and copper concentration on MnP production and laccase production was significant ($p < 0.05$). In all, the best conditions for the production of MnP, LiP and viability of *P.chrysosporium* in apple pomace (1287.5U MnP/gds, 305 U LiP/gds, and 10.38 Log 10 viability) and brewery waste (792 U MnP/gds and 9.83Log 10 viability) were: 80 % moisture, 3 mmol/kg VA and 0.5 mmol/kg copper except LiP production in brewery waste (7.87 U/gds) that is higher with 70 % moisture, 2 mmol/kg VA and 1mmol/kg copper. The best conditions for the production of laccase in apple pomace (789 U/gds) and brewery waste (841 U/gds) were: 80 % moisture, 3 mmol/kg VA and 1.5 mmol/kg.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Grant 355254, Canada Research Chair), FQRNT (ENC 125216) and MAPAQ (No. 809051) for financial support. The views or opinions expressed in this article are those of the authors.

REFERENCES

1. Rodriguez Couto, S. and J.L. Toca Herrera (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv.* 24: 500-513.
2. Casa R., A. D'Annibale, F. Pieruccetti, SR. Stazi, G. Giovannozzi Sermanni, and B. Lo Cascio (2003) Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* DESF.) germinability. *Chemosphere.* 50: 959-966.
3. Barclay, C.D., R.L. Legge, and GF. Farquha (1993) Modelling the growth kinetics of *Phanerochaete chrysosporium* in submerged static culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1887-1892.
4. Moredo, N., M. Lorenzo, A. Dominguez, D. Moldes, C. Cameselle, and A. Sanroman (2003) Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *World. J Microbiol. Biotechnol.* 19: 665-669.
5. Hatakka, A. (1994) Lignin modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS. Microbiol. Rev.* 13: 125-135.
6. Hacking. A.J. (1987) Economic Aspects of Biotechnology. *Cambridge University Press*, Cambridge.
7. Vendruscolo, F., P.C.M. Albuquerque, F. Streit, E. Esposito, and J.L. Ninow (2008) Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 1-12.
8. Mussatto, S.I. (2009) Biotechnological potential of brewing industry by-products. pp. 313-326. In: P.S. Nigam, A .Pandey (eds.). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation.* Springer, Netherlands.
9. Viniegra-González, G., N. Favela-Torres, C.N. Aguilar, S.J. Romero-Gómez, G. Díaz-Godínez, C. Augur (2003) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.* 13: 157-167.
10. Lundquist, K. and T.K. Kirk (1978) De novo synthesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading basidiomycete. *Phytochem.* 17: 1676.
11. Arora, D.S. and P.K. Gill (2001) Comparison of two assay procedures for lignin peroxides. *Enzyme. Microb. Tech.* 28: 602-605.
12. Alvarez, J.M., P. Canessa, R.A. Mancilla, R. Polanco, P.A. Santibáñez, and R. Vicuna (2009) Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispora* is mediated by an ACE1-like copper-fist transcription factor. *Fungal. Genet. Biol.* 46:104-111.
13. Pandey, A. (2003) Solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13: 81-84.
14. Boza, A., Y. De la Cruz, G. Jordan, U. Jauregui-Haza, A. Aleman, and I. Caraballo (2000) Statistical optimization of a sustained-release matrix tablet of lornoxicam. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 26:1303-1307.

15. Singh, S.K., J. Dodge, M.J. Durrani, and M.A. Khan (1995) Optimization and characterization of controlled release pellets coated with experimental latex: I. Anionic drug. *Int. J. Pharm.* 125: 243-255.
16. Sanchez-Lafuente, C., S. Furlanetto, and M. Fernandez-Arevalo (2002) Didanosine extended-release matrix tablets: optimization of formulation variables using statistical experimental design. *Int. J. Pharm.* 237: 107-118.
17. Francis, F., A. Sabu, K.M. Nampoothiri, S. Ramachandran, A. Ghosh, and G. Szakacs (2003) Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Eng. J.* 107-115.
18. Gassara, F., S.K. Brar, R.D. Tyagi, M. Verma, and R.Y. Surampalli (2010) Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Eng. J.* 49: 388-394.
19. Tien, M. and T.K. Kirk (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 81: 2280-2284.
20. Collins, P.J. and A.D.W. Dobson (1997) Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3444-3450.
21. Fujian, X., and C.H. Zhang, and L. Zuohn (2001) Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam exploded straw as substrate. *Biores Technol.* 80: 149-151.
22. Thomas H.A. (1942) Bacterial densities from fermentation tube tests. *J. Am. Water. Work. Assoc.* 34: 572-576.
23. Gill, P.K. and D.S. Arora (2003) Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white-rot fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 28-33.
24. Baldrian, P. (2003) Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 78-91.
25. Dittmer, J.K., N.J. Patel, S.W. Dhawale, and S.S. Dhawale (1997) Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEMS. Microbiol. Lett.* 149: 65-70.
26. De Jong, E., J. Field, and J. de Bont (1994) Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 13: 153-188.
27. Vasconcelos. A.F.D., A.M. Barbosa, R.F.H. Dekker I.S. Scarminio, M.I. Rezende. (2000). Optimisation of laccase production by *Botryosphaeria sp.* in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process. Biochem.* 35: 1131-1138.
28. Galhaup, C., H. Wagner, B. Hinterstoisser, D. Haltrich (2002) Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme. Microb. Technol.* 30: 529- 536.

29. Tavares, A.P.M, M.A.Z. Coelho, J.A.P Coutinho, and A.M.R.B. Xavier (2005) Laccase improvement in submerged cultivation: Induced production and kinetic modeling. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 669-676.
30. Klonowska, A., J. Le Petit, and T. Tron (2001) Enhancement of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. *FEMS. Microbiol. Lett.* 200: 25–30.
31. Verma, P., and D. Madamwar (2002) Production of lignolytic enzymes for dye decolourization by cocultivation of White rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under solid state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102: 109–118.
32. Mai. C., U. Kües, H. Militz (2004) Biotechnology in the wood industry, *Appl Microbiol Biotechnol.* 63: 477-494.

Table 4. 1 Experimental range of the three variables studied using CCD in terms of actual and coded factors

Variables	Symbol	Coded levels				
		-1.682	Low (-1)	Mid (0)	High (1)	+1.682
Moisture (% w/w)	X ₁	53.18	60	70	80	86.82
Veratryl alcohol (mmole/ kg)	X ₂	0.32	1	2	3	3.68
Copper sulfate (mmole/ kg)	X ₃	0.16	0.5	1	1.5	1.84

Table 4. 2 Results of experimental plan by central composite design for pomace and brewery waste, shaded cells represent maximum value

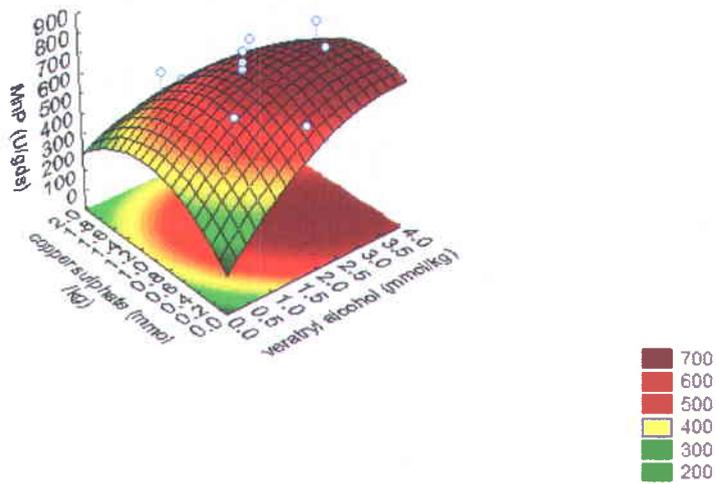
Trial	X ₁	X ₂	X ₃	MnP (U/gds)		LiP (U/gds)		Laccase (U/gds)		Σ enzyme values activities (U/gds)		Log10 viability	
				Brewery waste	Pomace	Brewery waste	Pomace	Brewery waste	Pomace	Brewery waste	Pomace	Brewery waste	Pomace
1	60	1	0.5	217	88.75	0.44	45.47	26	12	243.44	146.22	6.61	5.38
2	60	1	1.5	192	191.87	0.14	4.96	267	254	459.14	450.83	5.38	4.61
3	60	3	0.5	336.87	297.50	0.58	141.34	64	32	401.45	470.84	7.80	6.61
4	60	3	1.5	191.87	106.87	1.38	5.098	398	354	591.25	465.968	5.38	5.38
5	80	1	0.5	647.50	475	3.93	81.98	172	132	823.43	688.98	9.04	10.04
6	80	1	1.5	630	412.50	4.72	50.94	638	597	1272.72	1060.44	6.38	8.38
7	80	3	0.5	792	1287.50	4.24	305.48	175	187	971.24	1779.98	9.87	10.38
8	80	3	1.5	605	471.24	4.78	187.20	841	789	1450.78	1447.44	7.04	8.04
9	53.18	2	1	126.06	32.02	0.35	0.35	18	7	144.41	39.37	4.79	4.32
10	86.82	2	1	618.12	410.71	3.71	40	203	197	824.83	647.71	6.38	8.38
11	70	0.32	1	370.83	207.5	1.60	25.08	448	435	820.43	667.58	5.50	5.24
12	70	3.68	1 0	743	600	5.07	201.61	498	454	1246.07	1255.61	9.01	9.94
Trial	X ₁	X ₂	X ₃	MnP (U/gds)	LiP (U/gds)	Laccase (U/gds)	Σ enzyme values activities (U/gds)	Log10 viability	Trial	X ₁	X ₂	X ₃	MnP (U/gds)
				Brewery waste	Pomace	Brewery waste	Pomace	Brewery waste					Brewery waste
13	70	2	0.16	590	632.50	3.73	74.372	298	321	891.73	1027.872	7.50	8.24
14	70	2	1.84	420.83	550	3.33	28.67	574	543	998.16	1121.67	5.72	5.91
15	70	2	1	612	612	5.89	219.98	478	483.33	1095.89	1315.31	8.23	9.72
16	70	2	1	668.33	683.33	7.07	223.11	424	463	1099.4	1369.44	8.04	9.80
17	70	2	1	603.33	643.60	7.60	235.66	413	443	1023.93	1322.26	8.32	9.61
18	70	2	1	696.66	726	6.53	209.33	457	429	1160.19	1364.33	8.04	9.72
19	70	2	1	756	661.33	6.53	249.33	365	397	1127.53	1307.66	8.30	9.80
20-	70	2	1	603.33	639.73	7.87	226.26	476	455	1087.2	1320.99	8.01	9.61

Table 4. 3 Model coefficients estimated by central composite design and best selected prediction models; Where, M is Moisture, V A is Veratryl alcohol and CS is Copper sulfate

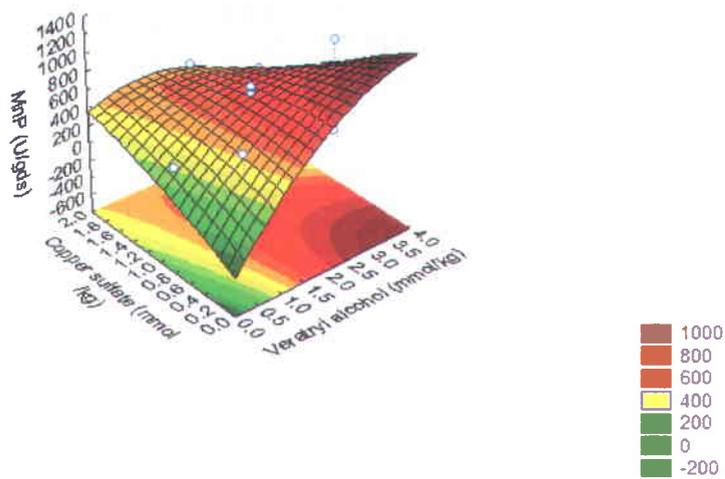
Coefficient	MnP (U/gds)		LiP (U/gds)		Laccase (U/gds)		Log10 viability	
	Brewery waste	Pomace	Brewery waste	Pomace	Brewery waste	Pomace	Brewery waste	Pomace
Constant	657.12	660.15*	6.92*	225.63*	435.87*	445.84*	8.13*	9.69*
Linear								
X ₁	375.53*	380.48*	3.04*	72.55*	202.40*	201.00*	1.43*	3.17*
X ₂	126.69*	242.38*	1.10*	110.22*	67.232	58.43	1.25*	1.45*
X ₃	-96.50*	-161.82*	0.16	-59.01*	317.96*	293.53*	-1.77*	-1.45*
Interactions								
X ₁ x X ₂	-0.063	186.87	-0.26	65.93	9.25	31.75	0.07	-0.50
X ₁ x X ₃	-8.625	-197.81	0.19	6.85	139.25	125.75	-0.46	-0.50
X ₂ X X ₃	-72.375	-261.87	0.21	-45.74	73.25	54.25	-0.34	-0.29
Quadratic								
X ₁	-207.84*	-299.70*	-3.53*	-124.84*	-234.62*	-252.84*	-1.47*	-2.16*
X ₂	-77.16	-170.74*	-2.61*	-58.96*	21.70	-10.66	-0.30	-1.28*
X ₃	-113.57	-38.16	-2.47*	-102.68*	-4.46	-19.50	-0.75	-1.64*
R-sqr	0.93	0.92	0.93	0.91	0.89	0.88	0.85	0.92

Reduced equations for enzyme production: best selected models: MnP (Brewery waste) = 660.14 + 380.48X₁ + 242.38 X₂ - 96.50 X₃ -207.84 X₁² - 113.57 X₃²; MnP (Pomace)= 657 + 375.53 X₁ + 126.699 X₂ - 6.50 X₃ - 299.70 X₁² - 170.740 X₂² + 186.87 X₁ x X₂ - 197.81 X₁ x X₃ - 170.74 X₂ x X₃; LiP (Brewery waste) = 6.92 + 3.04 X₁ + 1.10 X₂ - 3.53 X₁² - 2.61 X₂² - 2.47 X₃² ; LiP (Pomace) = 225.63 + 72.55 X₁+ 110.22 X₂ - 59.01 X₃ - 124.84 X₁² - 58.96 X₂² - 102.68 X₃²; Laccase (Brewery waste) = 445.84 + 202.40 X₁ + 317.96 X₃ - 234.62 X₁²; Laccase (Pomace) = 445.84 + 201 X₁+ 293.53 X₃ - 252.84 X₁²; Log10 viability(Brewery waste) = 8.13+ 1.43 X₁ - 1.77 X₃ + 1.25 X₂- 1.47 X₁²; Log10 viability (Pomace) = 9.69 + 3.17 X₁+1.45 X₂ - 1.45 X₃ - 2.16 X₁²- 1.28 X₂²- 1.64 X₃²;

* Significant (p < 0.05).

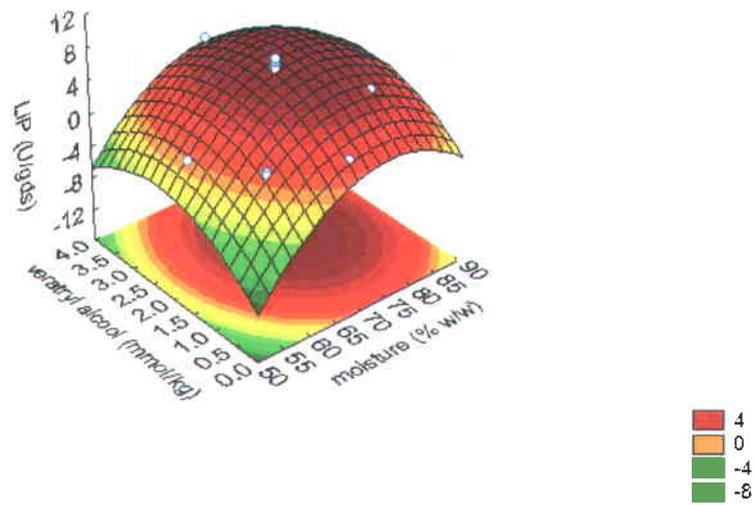


(a)

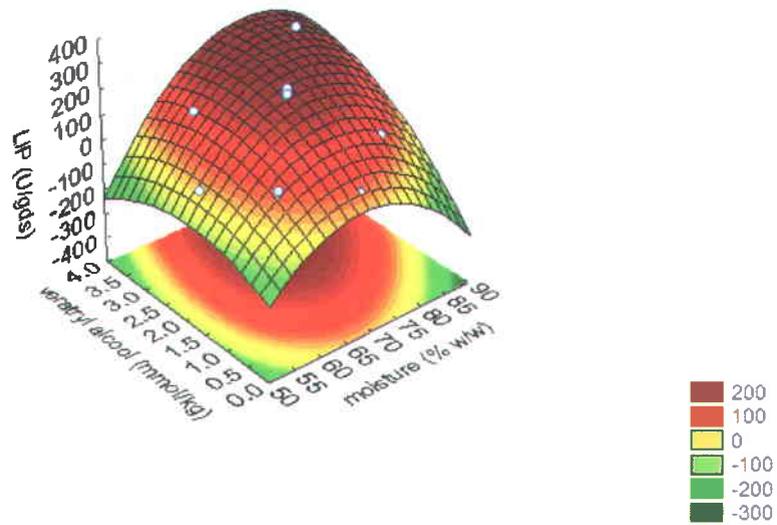


(b)

Figure 4. 1 Response surface of MnP production obtained by varying: concentration of copper sulfate (X_3) and the concentration of veratryl alcohol (X_2) and keeping the moisture (X_1) constant= 70% (w/w) a) : case of brewery waste; b) apple pomace; Negative values on z :axis are taken to demonstrate the actual contour of the plot, otherwise they do not carry any significance

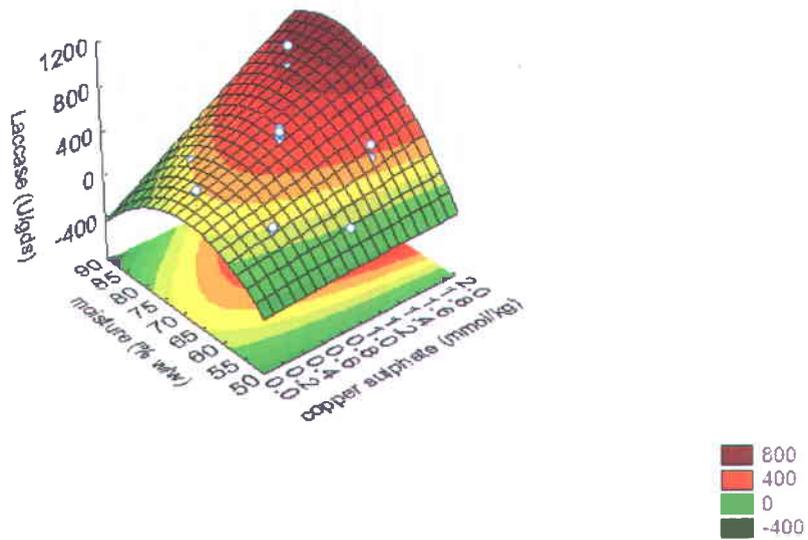


(a)

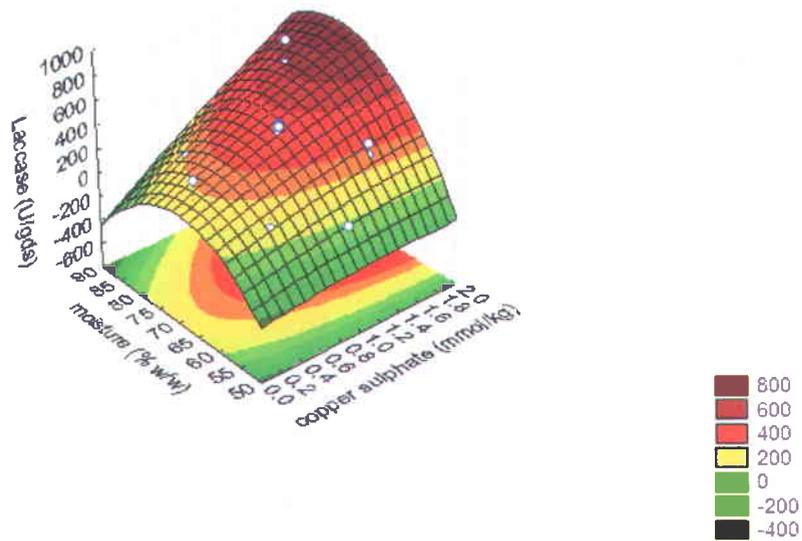


(b)

Figure 4. 2 Response surface of LiP production obtained by varying: moisture (X1) and the concentration of veratryl alcohol (X2) and keeping the concentration of copper sulfate (X3) constant= 1 mmol/kg a) case of brewery waste); b) apple pomace.

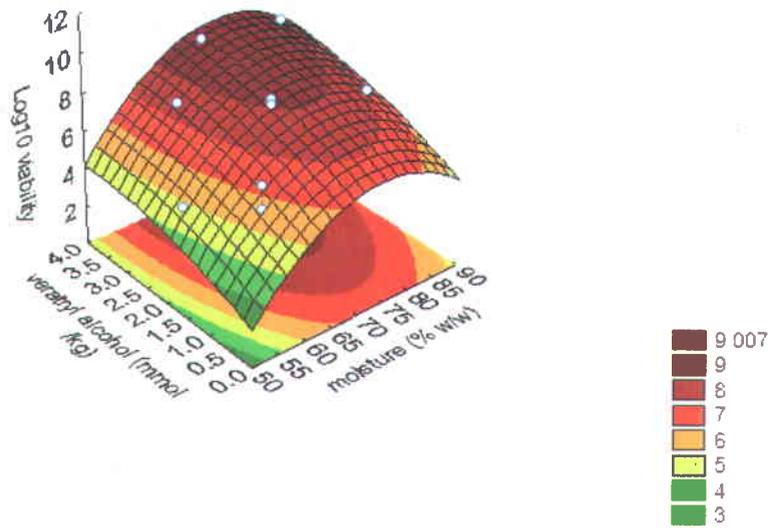


(a)

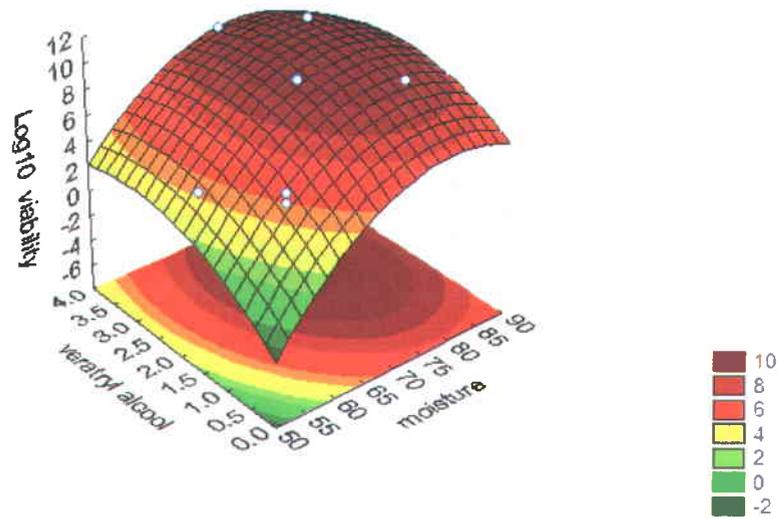


(b)

Figure 4. 3 Response surface of laccase production obtained by varying: moisture (X1) and the concentration of copper sulfate (X3) and keeping the concentration of veratryl alcohol (X2) constant = 2 mmol/kg a) case of brewery waste; b) apple pomace.



(a)



(b)

Figure 4. 4 Response surface of Log10 viability obtained by varying: moisture (X_1) and the concentration of veratryl alcohol (X_2) keeping the concentration of copper sulfate (X_3) constant =1 mmol/kg a) case of brewery waste; b) apple pomace

CHAPITRE III
PARTIE 3
LIGNIN ANALYSIS USING MICROWAVE DIGESTION

Fatma Gassara-Chatti, Ajila.C.M, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, M. Verma, J.R.

Valero

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

Biotechnology Letters. Accepté



RÉSUMÉ

La quantification de la lignine dans les déchets solides de jus de pomme a été réalisée en utilisant le système à micro-ondes. La digestion par micro-ondes a été utilisée pour remplacer le reflux traditionnel pendant l'étape d'acidolyse. Ceci a été réalisé afin d'augmenter la sélectivité de cette étape afin d'assurer le clivage des liaisons entre la lignine et les carbohydrates (cellulose et hémicellulose) et réduire le temps nécessaire pour quantifier la lignine. Les conditions de la digestion par micro-onde comme la pression, la température et le temps ont été optimisées, en utilisant la méthodologie de surface des réponses et les résultats ont été comparés avec la teneur en lignin obtenue par la méthodologie de Klason traditionnelle. Les résultats ont montré que la température et la pression ont exercé un effet positif significatif ($p < 0,05$) sur la digestion par micro-onde et la détermination de lignine. De plus, les meilleures conditions de digestion obtenues ont été : pression = 30 bar, température = 170 °C, temps = 15 min. Lorsque les conditions de digestion par micro-onde ont été optimisées, la teneur en lignine dans apple pomace trouvée (33% p/ps), a été plus élevée que la teneur obtenue par la méthodologie de Klason traditionnelle que (27% p/ps). La digestion par micro-onde a été plus précise ($p < 0,05$) que celle utilisant le reflux traditionnel.

Mots-clés: quantification de lignine, digestion par micro-onde, Klason lignine, apple pomace

ABSTRACT

Lignin quantification in apple pomace residues was carried out using microwave system. Microwave digestion was used to replace traditional refluxing during the mild acidolysis step. This was carried out in an attempt to augment the selectivity of this step towards cleaving lignin-carbohydrate bonds as well as reducing the overall intensity of this step towards inducing changes in the lignin structure and reduce the time needed to quantify lignin. The conditions of digestion using microwave, such as pressure, temperature and time were optimized by response surface methodology and the results were compared to the Klason lignin methodology. The results showed that temperature and pressure had a significant positive effect ($p < 0.05$) on microwave digestion and lignin determination. However, time showed a significant effect ($p < 0.05$) on lignin quantification. The best conditions of digestion were: pressure = 30 bar, temperature = 170 °C, time = 15 min. When the microwave digestion conditions were optimized, lignin content in apple pomace was (33 %) higher than Klason lignin (27% w/dw). The digestion using microwave was more accurate ($p < 0.05$) than the one using traditional refluxing.

Keywords: Lignin quantification, microwave digestion, Klason lignin, apple pomace

INTRODUCTION

Lignin is a complex biomacromolecule composed of methoxylated phenol units linked by ether and carbon bonds. It is the most abundant renewable source of aromatic polymer in nature, and its decomposition is indispensable for carbon recycling. It is chemically recalcitrant to breakdown by most organisms because of the complex, heterogeneous structure. This complex is present in all vascular plants, in fruits and vegetables. Vegetable and fruit processing in Canada and around the world produce large quantities of agro-industrial solid wastes that are rich in lignin. Apple pomace is one such solid residue containing lignin which is generated in large quantities in Canada and especially in Québec (16209 tons in 2007 in Québec) (Gassara *et al.* 2011). The presence of lignin in apple pomace favors its utilization in the production of many value products, such as organic acids, protein-enriched feeds, edible mushrooms, ethanol, aroma compounds, and enzymes, such as pectinases, pectin methylesterase, and lignocellulolytic enzymes, among others (Vendruscolo *et al.* 2008). Hence, the quantification of lignin in this waste and other ligninocellulosic wastes is very important. There are several methods known in literature to quantify lignin in wood and ligninocellulosic materials (Van Soest 1967; Alves *et al.* 2009). However, lignin concentration estimates vary widely among methods. Meanwhile, Klason lignin is the standard method of analysis for wood and ligninocellulosic materials (Lai and Sarkanen 1971; Kirk and Obst 1988). As long as lignin is insoluble in mineral acids, it can be analyzed gravimetrically after hydrolyzing the cellulose and hemicellulose fractions with sulphuric acid.

In an effort to further improve the yield and purity of the Klason protocol and reduce the time of digestion, a microwave reactor was used with the aim of replacing the traditional lengthy refluxing usually applied during the mild acidolysis step. This was performed in the anticipation that the lignin-carbohydrate bonds may be more severely cleaved, thus affording lignin in higher yield and purities (Guerra *et al.* 2006). Microwave irradiation has been successfully applied in many fields, such as organic chemistry (Lindstrom *et al.* 2001) with reported rapid reaction speeds, higher yields under milder reaction conditions, and improved product purities (Lindstrom *et al.* 2001; De la Hoz *et al.* 2005; Dallinger and Kappe 2007). Traditionally, organic synthesis at elevated temperatures is carried out by conductive heating with an external heat source (such as, an oil bath, sand bath, or heating jacket). This is a comparatively slow and inefficient method for transferring energy into a system as it depends on the thermal conductivity of various

materials that must be penetrated and results in the temperature of the reaction vessel being higher than that of the reaction mixture. In contrast, microwave irradiation produces efficient internal heating (in core volumetric heating) by direct coupling of microwave energy with the molecules (e.g. solvents, reagents, catalysts) that are present in a reaction mixture. The digestion is normally performed in reaction vessels typically made of (nearly) microwave transparent materials, such as borosilicate glass, quartz, or Teflon, supplying an inverted temperature gradient as compared to conventional thermal heating results. Efficient internal heat transfer results in lower digestion time and accurate quantification of lignin in wood, forage and agricultural wastes such as, apple pomace waste. The dielectric heating is generated by two major mechanisms: a dipolar polarization mechanism and a conduction mechanism. The possibility of performing reactions within a very short time period by the direct interaction of microwave energy with the reaction mixture as opposed to indirect energy transfer (using an oil bath or similar device) offers potentially reduced energy consumption and time savings, but, most significantly, increased efficiency and specificity of reactions. In this study, we have explored the influence of microwave heating during the mild acidolysis step to replace traditional refluxing in order to quantify lignin by Klason method. The conditions of digestion by microwave were optimized using response surface methodology. The use of microwave to perform the acidolysis of samples will decrease the time of treatment and increase the accuracy of this standard method widely used.

MATERIALS AND METHODS

Lignin quantification

Apple pomace waste was dried and its lignin content was quantified using standard Klason method (Hatfield *et al.* 1994) and with modified Klason method (traditional refluxing was replaced by microwave treatment to carry out the acidolysis). Traditional Klason lignin was determined as the ash-free residue from the two stage H₂SO₄ hydrolysis (Theander and Westerlund 1986; Hatfield *et al.* 1994). About 15 ml H₂SO₄ (13.5 M) was added to 1 g (W₁) dried apple pomace, held for 2 h at room temperature, transferred to a 1000 ml Erlenmeyer flask, diluted to 0.56 M acid concentration and

refluxed for 4 h and for different time intervals of 15, 25 and 35 min at various pressures (20, 30 and 75 bar) and temperature (130, 150 and 170°C) by microwave (power =1000 w). After acidolysis, the hydrolyzate was filtered and the filtrate (placed in crucible) was dried at $105 \pm 3^\circ\text{C}$ for 2 h or until constant weight was obtained. It was later cooled in the desiccator and weighed (W_2). The crucible and contents were placed in a muffle furnace and ignited at $575 \pm 25^\circ\text{C}$ for a minimum of 3 h, or until all moisture and volatile solid were removed. Finally, the crucible and contents was cooled in the desiccator and weighed (W_3). Percentage acid-insoluble lignin was calculated using Equation 1.

$$\% \text{ acid-insoluble lignin } \left(\frac{w}{w} \right) = \frac{W_2 - W_3}{W_1} \times 100\% \quad (1)$$

where:

W_1 = initial sample weight;

W_2 = weight of crucible, acid-insoluble lignin, and acid-insoluble ash;

W_3 = weight of crucible and acid-insoluble ash

Experimental design and optimization

Response surface methodology (RSM) was used to determine the optimum conditions for lignin quantification and cellulose and hemicellulose degradation. The experimental design and statistical analysis was performed using Statistica10 of STATSOFT Inc. (Thulsa, U. S. A). The experiments were based on a Box-Behnken design with a quadratic model in order to study the combined effects of three independent variables (temperature, pressure and time). Table 5. 1 presents a 12-trial experimental design, where each variable was tested in three different coded levels: low (-1), middle (0) and high (+1). The coded values correspond to temperature: -1 (130°C), 0 (150°C), +1 (170°C); Pressure: -1 (20), 0 (30), +1 (75); Time: -1 (15 min), 0 (25 min), +1 (35 min).

Once lignin content (% w/dw) was measured, a second-order polynomial model was fitted into the response data obtained from the design. The polynomial Equation 2 was obtained in the following form:

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (2)$$

where, Y_i = predicted response, b_0 is intercept term, b_1, b_2, b_3 linear coefficients, b_{11}, b_{22}, b_{33} squared coefficients and I refers to the response. There was one response (lignin content) which is a function of the level of factors. The response surface graphs indicated the effect of variables individually and in combination to determine their optimum levels for best lignin quantification.

Energy consumption

Electrical energy consumed during traditional refluxing and microwave digestion is determined by the Equation 3, but initial temperature was $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and final temperature was $100 \pm 1^\circ\text{C}$ and the time was 4 h.

$$E = \frac{P \times t}{1000} \quad (3)$$

where:

E: electric energy consumed for boiling (reflux digestion) (kJ)

P: power in (w), the power of the instrument used for heating the reflux was 800 w,

P=1000 w for the microwave

t: time (seconds), 4 h, 14400 s in the case of traditional refluxing, t= 15 min, 900 s in the case of the microwave

Statistical analyses of data

Factorial analysis of variance (ANOVA) was used to determine the effects of various experimental variables (treatment time, pressure and temperature) examined in this work based on the yield of lignin in apple pomace waste (Statistica10 of STATSOFT Inc. (Thulsa, U.S.)).

RESULTS AND DISCUSSION

Comparison of lignin yield from apple pomace using microwave digestion and Klason method

The optimal conditions for accurate quantification of lignin in apple pomace using the microwave (power = 1000 w) were: temperature=170°C; pressure=75 bar and time=15 min (Table 5. 1). Under these conditions, lignin content in apple pomace waste was 33% (w/w) (Table 5. 1). This yield was higher than that obtained by the traditional Klason method (27% w/w). The results were much higher than even those of Villas-Bôas *et al.* (2002) who found the lignin content in apple pomace by Klason method to be 24 % (w/w). The variation in results may be due to the quantity of rice husk added to apples to facilitate juice extraction which varies from one industry to another and affects the overall lignin content in apple pomace. In any case, lignin content in apple pomace using microwave digestion during acidolysis was higher than the traditional Klason method. These results may be explained by microwaves can liberating lignin efficiently from lignin-carbohydrate complexes that preclude lignin isolation in higher yields (Guerra *et al.* 2006). These data support the hypothesis that the concerted effect of cellulolytic action and mild acidolysis allowed effective isolation of lignin fragments which are not accessible by traditional Klason procedure.

Effect of time, temperature and pressure on lignin quantification

Box-Behnken design was used to find the suitable values of the variables on lignin quantification using microwave during acidolysis step. The data were fitted into a second-order polynomial function (Eq. 2), as it can be inferred from the good agreement of experimental data with those predicted by the model (Fig 5. 1). In this model, R-squared value was 0.97 which indicated that the model fitted well into the experimental results. The analysis of variance (Table 5. 2) and response surface of lignin content (Fig 5. 2 and Fig 5. 3) indicated that the model terms of X_1 (temperature), X_2 (pressure) had significant positive effect on lignin content ($p < 0.05$). This could be explained by the fact that high pressure and temperature ameliorate the process of acidolysis and the isolation of lignin from carbohydrate further improving its quantification. Time used in traditional process was 4 h as compared to microwave process (15, 25, 35 min). Hence, pressure and temperature must be high to achieve an efficient isolation and quantification of lignin. Lignin-carbohydrate linkages existing in ligninocellulosic materials of the benzyl ester, benzyl ether and phenyl glucoside types (Fengel *et al.* 1989). Such interactions between lignin and carbohydrates preclude the isolation of lignin in high yields and purities. All lignin-carbohydrate bonds are, however, susceptible to acid hydrolysis. Under the conditions used for lignin isolation, the complete cleavage of the phenyl glucoside bonds has been shown to occur on model compounds, whereas nonphenolic benzyl ether structures were found to be more stable under similar conditions (Lawoko *et al.* 2006). The rates of these reactions may actually be affected at different degrees under microwave conditions, especially pressure and temperature. Meanwhile, according to the results of response surface of lignin content (Table 5. 2,

Fig. 5. 2 and 5. 3), time showed a significant negative effect on lignin content ($p < 0.05$). This could be due to the alteration of lignin structure when digestion time was increased. The use of high pressure and high temperature for longer time will allow efficient isolation of lignin from carbohydrate but could also damage the structure of lignin. Hence, lignin content in apple pomace will automatically decrease. According to the results in Fig. 5. 2 and 5. 3, when pressure and temperature were low, the increase in time increased the lignin content which shows an interaction between the effects of variables.

Hence, it is possible to estimate the Klason lignin content by microwave method that replaces traditional refluxing. The optimal conditions of acidolysis using microwave were $170 \pm 1^\circ\text{C}$, 70 bar and 15 min. However, the acidolysis using traditional refluxing is achieved in 4 h. Hence, the use of microwave decreased the acidolysis duration and increased the lignin liberation efficacy. Energy consumption during acidolysis by traditional refluxing and microwave were calculated using Equation 3 and the values obtained were 11520 kJ and 900 kJ, respectively. The energy consumed during lignin quantification will decrease considerably using microwave method which can encourage the use of this methodology in lignin quantification in many materials and wastes. It will also encourage the use of microwave in lignin separation and purification from wood and ligninocellulosic materials.

CONCLUSION

Acidolysis using microwave protocol has been shown to offer higher lignin yield and purity from apple pomace wastes as compared to traditional Klason method. Using Box-Behnken, a set of recommended conditions were optimized as follows: temperature:

170°C, pressure: 70 bar and time: 15 min. The use of microwave reduced heating time and energy consumption. It is likely that this form of direct energy transfer in the reflux medium increases the rate of hydrolysis of the lignin-carbohydrate linkage via an ion conduction mechanism exerted on the acid by the magnetic field. Thus, microwave digestion is an efficient replacement of Klason method offering following advantages: 1) shorter analysis time; 2) higher yield; and 3) relatively higher purity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, FQRNT (ENC 125216) MAPAQ (No. 809051) and Projet Initiative Inde 2010 for financial support. The views or opinions expressed in this article are those of the authors.

REFERENCES

- Alves MA, Schwanninger M, Pereira H, Rodrigues J et al (2009) Analytical pyrolysis as a direct method to determine the lignin content in wood. Part 3. Evaluation of species-specific and tissue-specific differences in softwood lignin composition using principal component analysis. *J Anal Appl Pyrol* 85: 30-37.
- Dallinger D, Kappe CO (2007) Microwave-assisted synthesis in water as solvent. *Chem. Rev* 107: 2563–2591
- De la Hoz A, Diaz-Ortiz A, Moreno A et al (2005) Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem Soc Rev* 34: 164–178
- Fengel D, Wegener G (1989) Eds. Ultrastructure and reactions. In *Wood Chemistry*; de Gruyter: Berlin, Germany, 613 pp.
- Gassara F, Brar SK, Pelletier F, Verma M, Godbout S, Tyagi RD et al (2011) Pomace waste management scenarios in Québec—Impact on greenhouse gas emissions. *J Haz Mat*. doi:10.1016/j.jhazmat.
- Guerra A, Filpponen I, Lucia LA, Saquing C, Baumberger S, Argyropoulos DS et al (2006) Toward a better understanding of the lignin isolation process from wood. *J Agric Food Chem* 54: 5939–5947
- Hatfield RD, Jung HG, Ralph J, Buxton DR, Weimer PJA (1994) Comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *J Sci Food Agric* 65: 51-58
- Ikeda T, Holtman K, Kadla J, Chang H, Jameel H et al (2002) Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. *J Agric Food Chem* 50: 129–135
- Kirk TK, Obst JR (1988) Lignin determination. *Meth Enzymol* 161: 89-101
- Lai YZ, Sarkanen KV (1971) Isolation and structural studies. In: *Lignins, Occurrence, Formation, Structure and Reactions*, eds Sarkanen KV, Ludwig CH Wiley Interscience, New York, USA, pp 165-240.

- Lawoko M, Henriksson G, Gellerstedt G et al (2006) Characterization of lignin-carbohydrate complexes from spruce sulfite pulps. *Holzforschung* 60: 162–165.
- Lindstrom P, Tierney J, Wathey B, Westman J et al (2001) Microwave assisted organic synthesis: a review. *Tetrahedron* 57: 9225–9283
- Theander O, Westerlund EA (1986) Studies on dietary fiber. 3. Improved procedures for analysis of dietary fiber. *J Agric Food Chem* 34: 330-336
- Van Soest PJ (1967). Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. *J Anim Sci* 26: 119-128.
- Vendruscolo F, Albuquerque PM, Streit F et al (2008) Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol* 28:1–12
- Villas-Bôas SG, Esposito E, Mendonça MM. (2002) The novel lignocellulolytic ability of *Candida utilis* during solid-substrate cultivation on apple pomace. *World J Microb Biot* 18(6): 541–545
- Wu S (2003) Argyropoulos, D. S. An improved method for isolating lignin in high yield and purity. *J Pulp Pap Sci* 29: 235– 240

Table 5. 1Results of experimental plan by **Box-Behnken design** for acidolysis of apple pomace waste using microwave, shaded cells represent maximum value

Trial	Temperature (°C)	Pressure (bar)	Time (min)	Lignin (%w/dw)
1	130	20	15	11
2	130	30	35	13
3	130	75	25	16
4	150	20	35	9
5	150	30	25	11
6	150	75	15	20
7	170	20	25	19
8	170	30	15	33
9	170	75	35	27
10	150	30	25	11
11	150	30	25	12
12	150	30	25	13

Table 5. 2 Model coefficients estimated by Box-Behnken design and best selected prediction models; where, X_1 is temperature, X_2 is pressure and X_3 is time

Coefficient	Values
Constant	18.48
Linear	
X_1	13
X_2	8
X_3	-5
Quadratic	
X_1^2	-6.6
X_2^2	4.45
X_3^2	-3.6
R-sqr	0.973

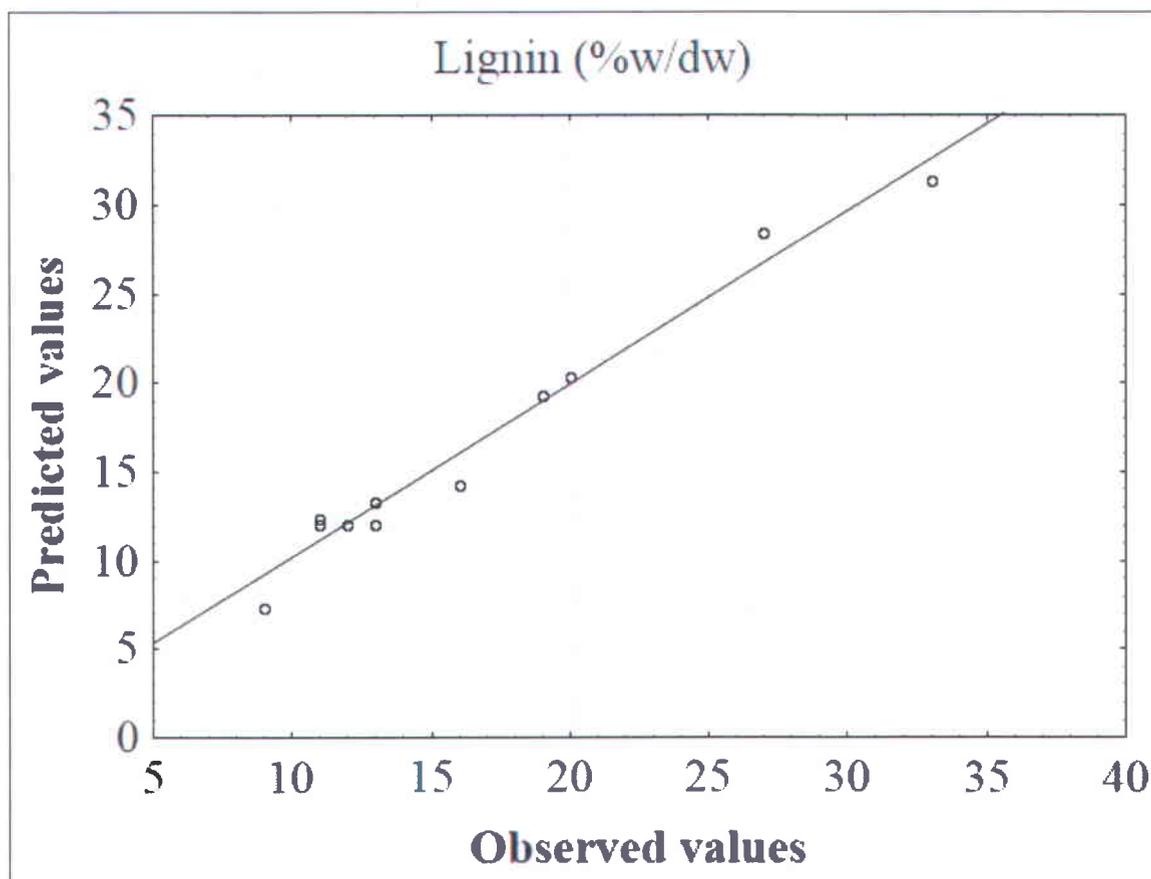


Figure 5. 1 Parity plot showing the distribution of experimental vs. predicted values of lignin content in apple pomace waste

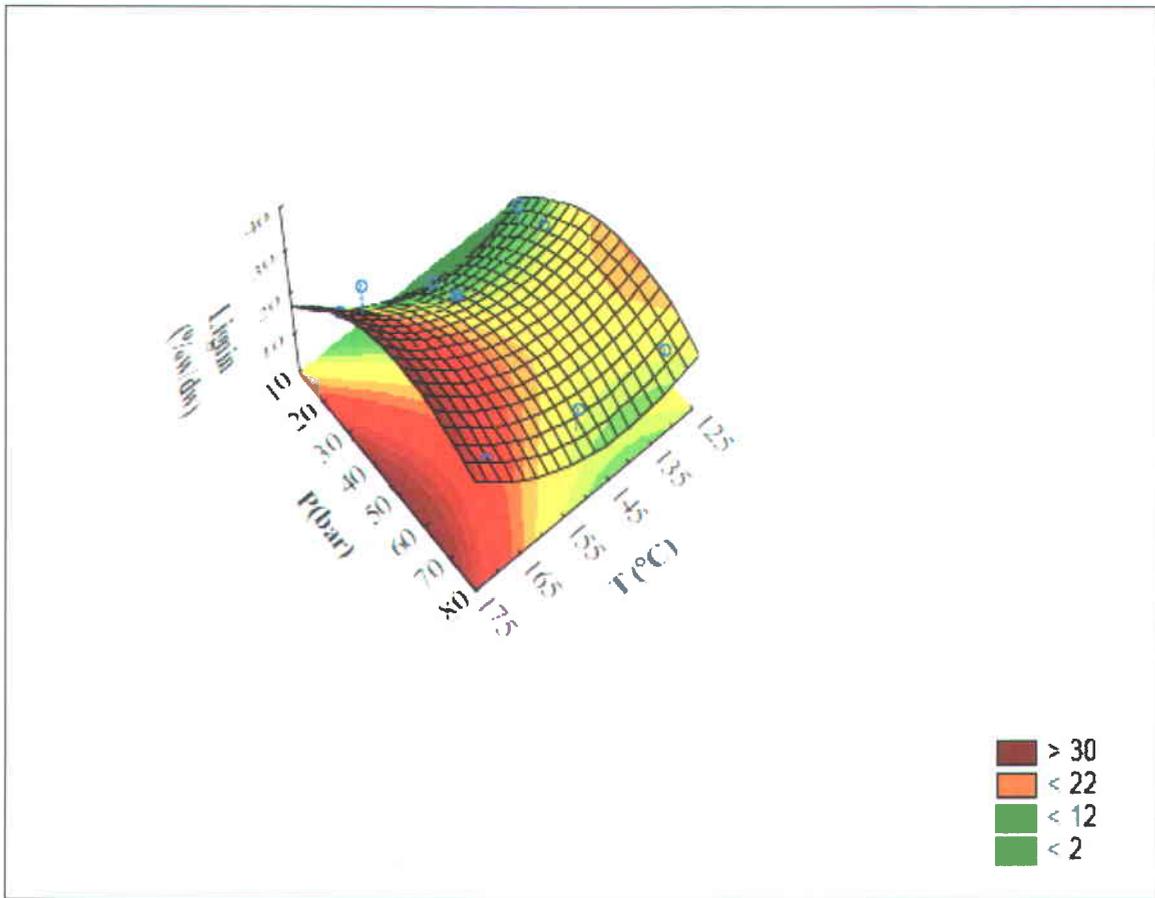


Figure 5. 2Response surface of lignin content obtained by varying: a) Temperature (X_1) and pressure (X_2), keeping time (X_3) constant

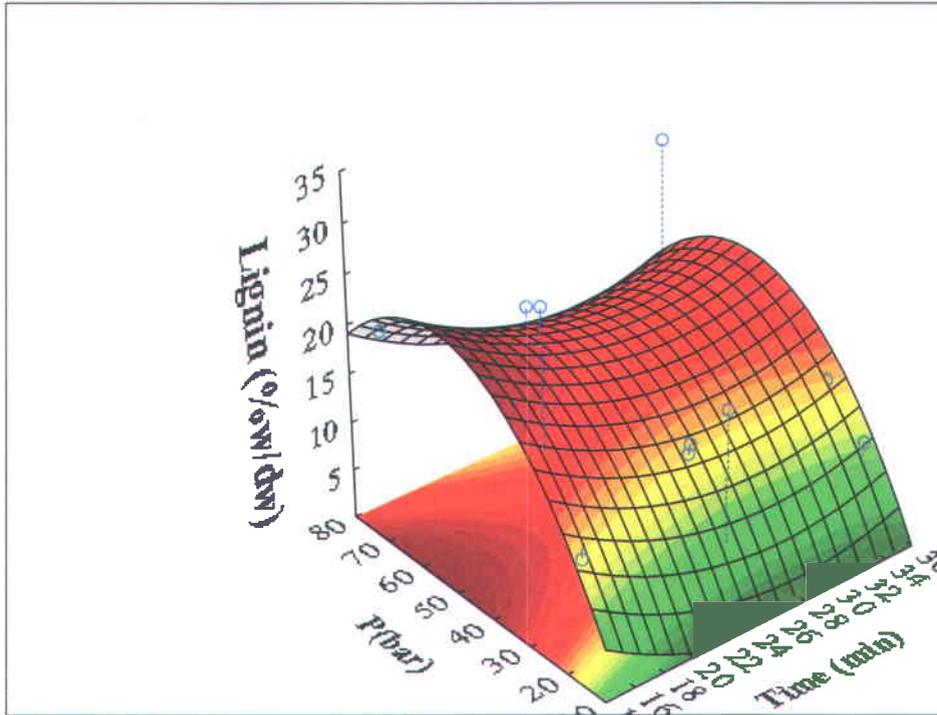


Figure 5. 3 Response surface of lignin content obtained by varying: a) pressure (X_2) and time (X_3) keeping temperature (X_1) constant

CHAPITRE IV
PARTIE 1
INFLUENCE OF AERATION AND AGITATION MODES ON
SOLID STATE FERMENTATION OF APPLE POMACE
WASTE BY A WOOD DECAY FUNGUS
“PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM” TO PRODUCE
LIGNINOLYTIC ENZYMES AND CO-EXTRACT
POLYPHENOLS

Fatma Gassara, Ajila.C.M, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, M. Verma, J.R. Valero

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

Biochemical Engineering Journal- (en revision)



RÉSUMÉ

L'effet de différents types d'agitation (1 : agitation continue (C) 2 : agitation continue, discontinue, continue (C / D / C); 3 : agitation discontinue, continue, discontinue (D / C / D)) et d'aération (0,87, 1,25, 1,66 VVM) sur la production d'enzymes ligninolytiques et l'extraction de composés polyphénoliques des cultures solides de *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 a été étudié en utilisant des déchets solides de jus de pomme. Les activités maximales de MnP (1690 ± 87 U/gss), LiP (387 ± 14 U/gss) et de laccase (898 ± 53 U / gss) et la libération maximale de composés polyphénoliques totaux (allant de $12,22 \pm 1,1$ à $30,12 \pm 0,88$ mg GAE / gss) ont été obtenues après 195, 147, 219 et 204 h de fermentation, respectivement. Cette production maximale d'enzymes ligninolytiques, accompagnée par une libération maximale de composés polyphénoliques a été obtenue en utilisant 1,66 VVM comme débit d'air et (C / D / C) comme mode agitation. La production maximale des enzymes et le contenu total en polyphénols ont été influencés par l'aération. Les valeurs les plus élevées ont été obtenues en utilisant 1,66 vvm comme débit d'air, suivi par 1,25 vvm et 0,83 vvm, respectivement. Ils ont été également influencés par l'agitation et les valeurs maximales ont été obtenues en utilisant C / D / C, suivie par D / C / D et l'agitation continue, respectivement.

Mots-clés : l'aération, l'agitation, fermentation en milieu solide, les enzymes ligninolytiques, polyphénol

ABSTRACT

The effect of different types of agitation (1: continuous agitation (C) 2: continuous, discontinuous, continuous agitation (C/D/C); 3: discontinuous, continuous, discontinuous agitation (D/C/D) and aeration (0.87, 1.25, 1.66 vvm) on ligninolytic enzyme production and polyphenolic compounds extraction by solid -state cultures of *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 was investigated by employing apple pomace. Higher production of MnP (1690.3 ± 87.6), LiP (387.9 ± 14.3) and laccase (898.9 ± 53.3 U/gds) and liberation of total polyphenolics (ranging from 12.22 ± 1.1 to 30.12 ± 0.88 mg GAE/ g DW) were obtained after 195, 147, 219 and 204 h of fermentation, respectively, using 1.66 vvm as air flow and (C/D/C) agitation mode. Maximal enzymes production and total polyphenolic content were influenced by aeration and higher values were obtained using 1.66 vvm as air flow rate, followed by 1.25 vvm and 0.83 vvm, respectively. They were also influenced by agitation and maximal values were obtained using C/D/C, followed by D/C/D and continuous agitation, respectively.

Keywords: aeration, agitation, solid state fermentation, ligninolytic enzymes, polyphenol

1. INTRODUCTION

Agro-food industries generate large quantities of liquid and solid wastes which must be suitably managed before being directly discharged to the environment. Apple pomace is a solid residue containing high moisture content (70%-75%) and biodegradable organic load (high BOD and COD values) [1]. This residue is left after juice extraction and constitutes about 25–35% of the weight of fresh fruit and contains 12.3% (Weight/fresh weight) fermentable sugar [2]. There are large quantities of agro-industrial solid wastes (apple pomace) produced round the world, including 16209 tons in 2007 in Québec [3]. In Quebec, this waste is mainly used as a source of crude animal feed by the farmers. Often only 20% is retrieved as animal feed and the rest 80% goes to landfill or composting sites which can cause environmental problems [4]. Thus, efficient strategy should be devised to manage agro-industrial wastes, such as apple pomace. Value addition of agricultural and food by-products has become one of the major issues in the modern world. There are many reports on efficient utilization of agro-industrial residues and by-products for the production of enzymes, bioactive compounds, and different types of biomolecules using economical substrates, such as apple and grape pomace, orange and pineapple waste, among others. Apple pomace has been used for the production of organic acids, protein-enriched feeds, edible mushrooms, ethanol, aroma compounds, and enzymes, such as pectinases, pectin methylesterase, and lignocellulolytic enzymes, among others [5]. Recently, solid state fermentation (SSF) has gained much popularity in the production of primary and secondary metabolites with high productivity in a relatively low cost process by using agro-industrial residues as substrates. SSF encompasses several advantages, such as reduction of the production costs, high volume productivity, relatively higher concentration of the products, less effluent generation, requirement for simple fermentation equipments and improved product recovery are outstanding [6]. Solid-state fermentation (SSF) is shown to be particularly suitable for the production of enzymes by filamentous fungi, more so the agro-residues, as they provide the conditions under which the fungi grow naturally [7, 8]. In fact, potential of apple pomace as a substrate for production of ligninolytic enzymes and release of polyphenols has been already investigated at flask level [9, 10].

It has been found that agitation facilitates the removal of volatile metabolic products, prevents the formation of agglomerates, enhances heat exchange, protects the medium against local desiccation or excessive moistening, and improves the conditions for microbial growth [11]. Agitation enables a more effective distribution of the spore suspension, of water required for moisture control, or of any other nutrient solutions if necessary [12]. Another benefit of agitation is a more evenly distributed airflow in the medium. The primary objective of aeration is to supply an appropriate amount of oxygen for microbial growth and to remove carbon dioxide. However, aeration also performs a critical function in heat and moisture transfer between the solids and the gas phase [13]. It is essential to note that excessive aeration can produce shear stress (which has a harmful effect on the filamentous fungus morphology) [13]. The need for sufficient aeration and agitation of the substrate reduces the possibility of employing the maximum volume of bioreactors, irrespective of their design. Thus, optimization of agitation and aeration is required to optimize the growth of the microorganism and the production of primary and secondary metabolites.

In the present study, the effect of different culture conditions, such as agitation and aeration on growth of *Phanerochaete chrysosporium* in SSF for ligninolytic enzymes production and co-extraction of polyphenols was investigated.

2. MATERIAL AND METHODS

2. 1 Microorganism and inoculum preparation

P. chrysosporium (ATCC 24275) strain was selected as a suitable organism for bio-processing of solid state fermentation for its potential for higher enzyme production. *P. chrysosporium* was maintained on potato–dextrose–agar (PDA) medium at 4 ± 1 °C. The culture of *P. chrysosporium* was grown on PDA Petri plate and incubated at 37 ± 1 °C. The spores were harvested from the sporulation medium plates, inoculated into sterile distilled water contained in test tubes, and stored in the freezer until use. The fermented broth was initially filtered through glass wool to remove mycelial contamination and recover only spores. The concentration of spore suspension used in the experiments was 2.5×10^6 spores per gram of solid.

2. 2 Solid state Fermentation

The fermentation was carried out in 12-L solid-state fermenter of rotating drum type, Terrafor (Infors HT, Switzerland). The sterilized medium containing 4.5 kg was

transferred into the sterilized bioreactor in an aseptic condition. For the fermentation, apple pomace was treated with inducers, such as copper sulfate (2 mmol/kg), veratryl alcohol (2 mmole/kg), and Tween-80 (0.1% v/v), and the pH was adjusted to 4.5. The inoculation was done with the spore suspension. The fermentation was carried out in a controlled environment at $37\pm 1^\circ\text{C}$, rotating speed of 2 rpm and aeration rate of 2 vvm. The fermentation was carried out for 10 days, and the sampling was done periodically (6h in the initial cycle and 12 h later). During this study, moisture content was analyzed and relative humidity was measured using the hygrometer.

2. 3 Enzyme assays

2. 3. 1 Lignin peroxidase (LiP)

Lignin peroxidase (LiP) activity was routinely assayed spectrophotometrically at $25\pm 1^\circ\text{C}$ using veratryl alcohol as a substrate and by monitoring the formation of veratryl aldehyde 254 by hydrogen peroxide at 310 nm [14]. One unit of LiP activity (U) is defined as the amount of enzyme which produces 1 μmol of veratryl aldehyde per min under the assay conditions.

2. 3. 2 Laccase activity

Laccase activity was assayed with 2,2-azino bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) in 0.1M phosphate-citrate buffer at pH 4. The transformation of ABTS to ABTS⁺ was determined by the increase in A₄₂₀ ($\epsilon_{420} = 36\text{mM/cm}$) [15]. One unit of enzyme activity (U) is defined as the amount of enzyme which produces 1 μmol of product per min under the assay conditions.

2. 3. 3 Manganese peroxidase (MnP)

The analysis of MnP activity was based on the transformation of Mn^{2+} to Mn^{3+} as described by Fujian et al. [16]. The reaction mixture contained 1.70 ml of citrate-phosphate buffer (pH 3; 0.1 mol/l), 0.05 ml of MnSO_4 (0.40 mol/l), 0.2 ml of enzyme and 0.05 ml of H_2O_2 (0.016 mol/l). One unit of MnP activity is defined as the amount of enzyme which results in 10% of OD₂₄₀ (optical density) nm increase/min.

2. 4 Viability assay

Viability assay was used as an indicator or measure of the amount of living fungal biomass in solid-state cultivation. Viability of broken fungal mycelium in samples containing mycelium and residual substrate was assayed with most probable number

(MPN) method as described by Gassara et al. (2010) [9]. Briefly, fermented broth was first diluted in sterile water. Later, adequate dilutions were performed for these samples after homogenization. At least five different dilutions per sample were used for the analysis. Each dilution was aseptically pipetted on an agar plate at six different spots. Experiments were carried out in duplicates. After the incubation of plates for 1 day, the growing spots on the plates were calculated. While calculating the results, the first dilution, where all the pipetted spots did not grow, and the last dilution, where at least one pipetted spot grew, and all the samples in between these combinations were taken into account. Hence, the results were calculated in colony forming units (cfu's).

2. 5 Extraction of polyphenolic compounds

The samples were accurately weighed to 10 g and 20 mL of 80% acetone and 80% ethanol was added as solvents. The samples were placed in an ultrasonication bath (Elma Hans Schmidhauer GmbH & Co. KG, Germany). The ultrasonic extraction was performed for 30 min at $40\pm 1^\circ\text{C}$. The mixture was later centrifuged at $7000 \times g$ for 20 min. The supernatant collected was analyzed for polyphenolic content and antioxidant activity.

2. 6 Estimation of total phenolic content

The content of total polyphenolics in the phenolic extract of sample was determined by the method of Swain and Hills (1959) [17]. The absorbance was recorded at 725 nm. Gallic acid was used as a standard. The content of total polyphenolics in the extract was expressed as gallic acid equivalents (GAE) in mg/ liter of the samples.

2. 7 Physico-chemical parameters

Five grams of solid medium or fermented product was dried to constant weight at $105 \pm 1^\circ\text{C}$, and the dry weight was recorded. The moisture content was calculated using Equation 1:

$$\text{Moisture content of solid medium or fermented product} = \frac{\text{weight of solid medium or fermented product} - \text{dry weight}}{\text{dry weight}} * 100 \quad (1)$$

pH of the medium was measured using ten milliliters of distilled water into 1.0 g of medium, and then it was shaken on a magnetic stirrer before measuring the pH.

Samples with different moisture content were placed in a sealed container at $25\pm 1^\circ\text{C}$ and water activity was determined by a hygrometer [18].

2. 8 Statistical Analyses

All the experiments were assayed in replicates, and an average of replicates was calculated along with the standard deviation. Database was subjected to an analysis of variance (ANOVA). One-way ANOVA followed by student test was used to determine significant differences among treatment groups. For all analysis, differences were considered to be significant at $P < 0.05$ [9].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3. 1 Enzyme production

3. 1. 1 Agitation rate optimization

Different modes of agitation were evaluated in order to identify the best type of agitation for the production of ligninolytic enzymes and polyphenol co-extraction. Three types of agitation was used: 1: continuous (C) agitation during all the fermentation process (2 rpm); 2: continuous agitation during lag phase, discontinuous (D) agitation during exponential phase, continuous agitation during stationary phase and lag phase (C/D/C agitation); 3: discontinuous agitation during stationary phase, continuous agitation during exponential phase, discontinuous agitation during stationary phase and lag phase (D/C/D agitation). The results of MnP, LiP and laccase production during the fermentation of apple pomace in fermenter using different types of agitation is presented in Figure 6. 1, Figure 6. 2, and Figure 6. 3. The results showed that agitation mode influenced ligninolytic enzymes production. During apple pomace fermentation using C/D/C agitation, higher production of MnP, LiP and laccase was 1030 ± 45 , 262.5 ± 23.2 and 312.5 ± 30.4 U/ gds, respectively. MnP, LiP and laccase production was obtained after 240, 228, 252 hour of fermentation, respectively. During apple pomace fermentation using D/C/D agitation, higher production of MnP, LiP and laccase was 845 ± 8.9 , 117.5 ± 7.6 and 300 ± 22.1 U/ gds, respectively. MnP, LiP and laccase production was obtained after 171, 195, 219 hour of fermentation, respectively. During apple pomace fermentation using continuous fermentation, highest production of MnP, LiP and laccase was 479.1 ± 31.2 , 33.1 ± 1.7 and 92.5 ± 4.9 U/ gds, respectively. MnP, LiP and laccase production was obtained after 242, 266, 266 h of fermentation, respectively. These results showed that the maximal enzyme production was obtained using C/D/C agitation, followed by D/C/D agitation and continuous agitation, respectively. Hence, the absence of agitation during exponential phase of *Phanerochaete chrysosporium* growth

increases ligninolytic enzymes production. This may be due to the fact that the agitation during the exponential phase can break mycelia and cause the alteration of the secondary metabolism of *Phanerochaete chrysosporium*. Mixing allowed the addition and distribution of water in the system and also enhanced efficient conductive heat transfer via the wall. However, mixing during SSF can have some negative effect on the growth of the microorganism especially during the exponential phase of growth. Mechanical action leads to change in the development of the morphology of the fungus and the breakage of hyphae [19, 20]. Some reports have indicated that the bed of solid substrate can be mixed continuously without detrimental effects. For example, Oostra et al. (2000) [21] found that continuous mixing did not impede spore formation of *Coniothyrium minitans* cultivated on oat grain. Nagel et al. (2001) [22] studied continuously mixed SSF with *A. oryzae* cultivated on wheat grain in a paddle mixer. They concluded that continuous mixing improves process control, because it allows addition and distribution of water during fermentation, reduces gradients in the bed, and improves heat transfer to the fermenter wall. They also concluded that continuous mixing does not have a negative impact on the fermentation by showing that respiration rates were comparable to those in unmixed cultures. Nagel et al. (2001) [22] also observed that the fungus grew primarily inside the wheat grain during continuously mixed SSF; hardly any mycelium was observed on the grain surface and the amount of aerial mycelium was negligible (F. J. I. Nagel, personal communication). In contrast, Han et al. (1999) [23] investigated the effect of intermittent mixing on enzyme production during cultivation of *Rhizopus* on soybeans and concluded that intermittent mixing may negatively affect enzyme production. Compared with the work of Nagel et al. (2001) [22] there are four differences: the morphology of the fungus; the structure and firmness of the solid substrate; the fermenter layout; and the mixing regime. Hence, mixing during SSF is beneficial, but it should be discontinuous rather than continuous. Our results clearly showed that the alternance between discontinuous and continuous agitation during SSF of *Phanerochaete chrysosporium* cultivated on apple pomace significantly increased ($p > 0.05$) the activity of ligninolytic enzymes, specially C/D/C mixing mode.

3.1.2. Aeration optimization

After the optimization of the agitation mode, different air flow rates (0.83, 1.25, 1.66 VVM) were evaluated in order to identify the best aeration for the production of the

highest enzyme activities. During the optimization of aeration, the optimized agitation mode was used.

MnP, LiP and laccase production during the fermentation of apple pomace in fermenter using different types of aeration are presented in Figure 6. 1, Figure 6. 2, and Figure 6. 3, respectively. These results showed that the level of aeration influenced ligninolytic enzymes production. During apple pomace fermentation using 0.83 vvm as air flow rate, higher production of MnP, LiP and laccase was 324.6 ± 21.2 , 10.4 ± 0.8 and 49.4 ± 3.4 U/gds, respectively. MnP, LiP and laccase production was obtained after 219 h of fermentation in all cases. During apple pomace fermentation using 1.25 vvm as air flow rate, higher production of MnP, LiP and laccase was 1030 ± 45 , 262.5 ± 23.2 and 312.5 ± 30.4 U/gds, respectively. MnP, LiP and laccase production was obtained after 240, 228, 252 h of fermentation, respectively. During apple pomace fermentation using 1.66 vvm as air flow rate, higher production of MnP, LiP and laccase was 1690.3 ± 87.6 , 387.9 ± 14.3 and 898.9 ± 53.3 U/gds, respectively. MnP, LiP and laccase production was obtained after 195, 147 and 219 h of fermentation, respectively. These results showed that the maximal enzymes production was obtained using 1.66 vvm as air flow rate, followed by 1.25 vvm and 0.83 vvm, respectively. When increasing aeration, ligninolytic enzyme production increases and *Phanerochaete chrysosporium* incubation duration needed to obtain activity of enzymes decreases. The aeration is normally a very important parameter in solid state fermentation of aerobic microorganisms. Aeration of solid state culture plays four functions, namely to maintain aerobic conditions, the elimination of carbon dioxide, the regulation of temperature in culture and the regulation of water content [24]. Aeration in liquid state culture is often the limiting factor for microbial growth because of the low solubility of oxygen in the water. Aeration during solid state fermentation is easier than in liquid fermentation because on the one hand, the rapid diffusion of oxygen in the wet film surrounding the particles substrate, and also because too large contact surfaces between the gas phase, the substrate and aerial mycelia. Typically, oxygen is not a limiting factor in solid state fermentation when the substrate is particulate. However, it was shown in this study that the increase of air flow rate increases secondary metabolites production such as ligninolytic enzymes and increases the activity of *Phanerochaete chrysosporium*. The lack of aeration decreases the heat and mass transfer in solid state cultures [13, 25]. Thus, at 0.83 vvm of aeration,

the ligninolytic enzymes production was not higher. During this study 1.66 vvm gives the highest production of ligninolytic enzymes

3. 2 Liberation of polyphenolic compounds

3. 2. 1 Agitation optimization

The liberation of polyphenolic compounds during the solid state fermentation with different agitation modes is provided in the Figure 6. 4. The total polyphenolic compounds during fermentation of apple pomace with continuous agitation, C/D/C agitation, D/C/D agitation ranged from 12.22±0.1 to 20.56±0.5 mg GAE/ g dry weight; 12.2±1.1 to 28.9±0.64 mg GAE/ dry weight 12.2±1.1 to 24.8±0.72 mg GAE/ dry weight with maximum total polyphenolic content at 192,19 and 180 h of fermentation. The maximum liberation of polyphenolic compounds was observed during apple pomace fermentation with C/D/C agitation, followed by D/C/D agitation and continuous agitation, respectively. The liberation of polyphenolic content followed the same trend of production of enzymes such as MnP, LiP and laccase during the fermentation as described earlier. The absence of agitation during exponential phase of *Phanerocheate chrysosporium* growth increases enzymes production which in turn affects the liberation of total polyphenolic content. The polyphenol content increased with increase in fermentation period and after a maximum level; there was decline in the polyphenolic compounds. The increase in polyphenolic content during the first phase of fermentation may be due to the release of free phenolic compounds by the action of carbohydrate metabolizing enzymes. Later decrease in the polyphenolic content may be due to the polymerization of the phenolics which in turn make them hydrophobic and decrease their solubility [10, 26]. Earlier, it was found that the total phenolics content for the tray and fermentor methods was significantly higher than flask fermentation [10]. It was reported that extracellular enzymes produced from the white-rot fungi, such as lignin-peroxidases, Mn-peroxidases, and laccase, play an important role in the removal of phenols from olive residues and other waste waters rich in polyphenols [27].

3. 2. 2 Aeration optimization

The liberation of polyphenolic content during solid state fermentation of apple pomace with different aeration rates are given in Figure 6.4. The results demonstrated that the rate of aeration influenced the enzyme production and liberation of polyphenolic content. During apple pomace fermentation using 0.83 VVM as air flow rate, the total polyphenol

content ranged from 12.26 ± 0.1 to 24.54 ± 0.5 mg GAE/g DW of apple pomace and the maximum polyphenolic content was obtained at 192 h of fermentation. During apple pomace fermentation using 1.25 VVM as air flow rate, the polyphenol content was in the range of 12.24 ± 1.1 to 27.96 ± 0.64 mg GAE/ g DW and liberation of polyphenol content was maximum at 192 h of fermentation. During apple pomace fermentation using 1.66 VVM as air flow rate, the higher liberation of polyphenolic content was found at 204 h of fermentation and was in the range of 12.22 ± 1.1 to 30.12 ± 0.88 mg GAE/ g DW of apple pomace. The maximal liberation of enzymes production and liberation of total polyphenolic content was obtained during fermentation using 1.66 VVM as air flow rate, followed by 1.25 VVM and 0.83 VVM respectively. When increasing aeration, enzyme production increases and which in turn affects the liberation of polyphenolic content.

3. 3 Viability

The results of *Phanerochaete chrysosporium* viability during the fermentation of apple pomace in fermenter using different types of aeration and agitation are presented in figure 6. 5. These results showed that the level of aeration influenced the viability of *Phanerochaete chrysosporium*. During apple pomace fermentation using 0.83 VVM as air flow rate, higher viability of *Phanerochaete chrysosporium* (2.10×10^8 CFU/g) was obtained after 147 hour of incubation. During apple pomace fermentation using 1.25 VVM as air flow rate, higher viability of *Phanerochaete chrysosporium* (3.08×10^{10} CFU/g) was obtained after 144 hour of incubation. During apple pomace fermentation using 1.66 VVM as air flow, higher viability of *Phanerochaete chrysosporium* (1.11×10^{10} CFU/g) was obtained after 147 hour of incubation. When changing the level of aeration, the duration needed to obtain the maximum of viability was not changed. However, while increasing the level of aeration, viability value increased. Thus, aeration has a strong influence on *Phanerochaete chrysosporium* viability while increasing the air flow from 0.83 VVM to 1.66 VVM. The higher viability (1.11×10^{10} CFU/g) of *Phanerocheate chrysosporium* using 1.66 VVM as air flow was lower than the viability (3.08×10^{10} CFU/g) produced using 1.25 as air flow. Thus, the growth of *P. chrysosporium* decreased when using 1.66 VVM as air flow. In fact, an air flow higher than 1.66 VVM was not chosen to prevent the decrease of aeration and eventually lower the enzyme production. The use of excessive aeration can produce shear stress (which has a harmful effect on the filamentous fungus morphology) [13] and can decrease the production of ligninolytic enzymes.

The results of *Phanerochaete chrysosporium* viability during solid state fermentation using different agitations modes showed that the agitation mode influenced the viability. During apple pomace fermentation using C/D/C agitation, higher *Phanerochaete chrysosporium* viability (3.08×10^{10} CFU/ gds) production was obtained after 144 h of fermentation. During apple pomace fermentation using D/C/D agitation, higher *Phanerochaete chrysosporium* viability (1.10×10^{10} CFU/ gds) production was obtained after 147 h of fermentation. During apple pomace fermentation using continuous fermentation, higher *Phanerochaete chrysosporium* viability (2.43×10^{10} CFU/ gds) production was obtained after 180 h of incubation. These results showed that maximal viability was obtained faster using C/D/C agitation, followed by D/C/D agitation and continuous agitation, respectively. Hence, the absence of agitation during exponential phase accelerates the growth of *Phanerochaete chrysosporium*. This may be due to the fact that the agitation during the exponential phase can break mycelia and decelerate the growth of *Phanerochaete chrysosporium*. Hence, continuous agitation decelerates the growth of the microorganisms. These results were in agreement with the results of Han et al. (1999) [23] that showed that intermittent mixing during the cultivation of *Rhizopus* on soybeans negatively affected microorganism growth and enzyme production. However our results were in contrast with the results of Nagel et al. (2001) [22] who concluded that continuous mixing improves process control and does not have a negative impact on the fermentation by showing that continuous mixing allows the addition and distribution of water during fermentation and improves heat transfer to the fermenter wall. Our results clearly showed that the alternance between discontinuous and continuous agitation during SSF of *Phanerochaete chrysosporium* cultivated on apple pomace increased significantly ($p > 0.05$) the viability, activity of ligninolytic enzymes specially during C/D/C mixing mode. Therefore, further research is required to show clearly the effect of mixing on the growth of *Phanerochaete chrysosporium* and ligninolytic enzyme production.

3. 4 Physicochemical parameters

The results of physico-chemical parameters using different types of aeration and agitation, water activity, the pH and moisture content of the fermented medium were evaluated and are presented in Figure 6.6 and table 6.1. The level of aeration influenced the variation of water activity, pH and moisture content during fermentation. During apple

pomace fermentation using different air flow rates, following first order rate equation of water activity profile were obtained:

$$0.83 \text{ vvm: water activity} = -0.0003 * (\text{incubation time}) + 0.8 \quad (2)$$

$$1.25 \text{ vvm: } -0.0005 * (\text{incubation time}) + 0.817 \quad (3)$$

$$1.66 \text{ vvm: water activity} = -0.001 * (\text{incubation time}) + 0.81 \quad (4)$$

During all fermentation modes, water activity decreased considerably from the beginning to the end of fermentation. Changes in water activity may be due to evaporation caused by metabolic heat, substrate hydrolysis and metabolic water production. The water activity corresponds to the available water for microbial activity and it is different than the water bound to the substrate that is unavailable to microorganisms. During solid state fermentation, the available water is consumed by microorganisms to sustain its growth and metabolism which explains negatives slopes of water activity profiles during. When increasing the level of aeration, the slope of water activity profile decreased and water activity decreased faster during fermentation. This is due to the fact that aeration performs a critical function in heat and moisture transfer between the solids and the gas phase [13]. Normally, when water activity is higher, the growth of microorganism will be enhanced and enzymes production will be more. In this study, when air flow increased, water activity decreased faster, but *Phanerocheate chrysosporium* was higher and enzyme production was also higher (figure 6.1, 6.2, 6.3, 6.5, 6.6). Water activity is very important parameter in solid state fermentation that affects microorganism growth and its metabolism. However, in this study, the effect of aeration on enzyme production was more significant than the effect of water activity ($p > 0.05$).

During apple pomace fermentation using different agitation modes, following equations of water activity profile were obtained:

$$\text{C/D/C agitation: water activity} = -0.0005 * (\text{incubation time}) + 0.81 \quad (5)$$

$$\text{D/C/D agitation water activity} = -0.0001 * (\text{incubation time}) + 0.78 \quad (6)$$

$$\text{Continuous mode: water activity} = -0.0008 * (\text{incubation time}) + 0.80 \quad (7)$$

The water activity decreased faster using continuous agitation followed by D/C/D agitation and C/D/C agitation, respectively. Continuous agitation accelerated the reduction of water activity. This is due to the fact that evaporation increased due to heat produced during agitation. Using this type of agitation, water activity decreased faster,

Phanerochaete chrysosporium viability and ligninolytic enzyme production were not higher (figure 6.1, 6.2, 6.3, 6.5). Hence, agitation and water activity had an important effect on ligninolytic enzymes.

pH (4 to 4.5) (Table 6.1) showed small variation during fermentation. Variations in pH result from substrate consumption (e.g. protein hydrolysis) and/or metabolite production (e.g. organic acids). They are indicators of changes in metabolic activity [29] (Bellon-Maurel et al., 2003). In SSF, no existing electrode can record pH in the solid medium because of the lack of free water [30].

Moreover, during apple pomace fermentation using 0.83 VVM as air flow rate, the moisture content was almost constant (75 % w/w). While, during apple pomace fermentation using 1.25 VVM as air flow rate, moisture content decreased from 75 % (w/w) in the beginning of fermentation to 70 % (w/w) at the end of fermentation. Likewise, during apple pomace fermentation using 1.66 VVM as air flow, moisture content decreased from 75 % (w/w) in the beginning of fermentation to 60 % (w/w) at the end of fermentation. These results showed that when the level of aeration increased, the moisture content decreased faster during fermentation. The heat produced by aeration increased evaporation and caused faster decrease of moisture content [13]. Furthermore, moisture content of the fermented medium was influenced by agitation modes. During apple pomace fermentation using C/D/C agitation, moisture content decreased from 75 % (w/w) in the beginning of fermentation to 70 % (w/w) at the end of fermentation. During apple pomace fermentation using D/C/D agitation, moisture content decreased from 75 % (w/w) in the beginning of fermentation to 64 % (w/w) at the end of fermentation. During apple pomace fermentation using continuous fermentation, moisture content decreased from 75 % (w/w) in the beginning of fermentation to 70 % (w/w) at the end of fermentation. These results showed that the presence of agitation during exponential phase accelerates the decrease of moisture. This may be due to the fact that during the exponential phase of growth, microorganisms multiplied, they needed more water to sustain its metabolism and agitation during this phase increases the heat transfer and increases the evaporation. Hence, the consumption of water was more important due to the metabolism of microorganism and also the evaporation caused by heat that was generated by mixing. The evaluation of physicochemical parameters during solid state fermentation of apple pomace cultivated by *Phanerochaete*

chrysosporium using different modes of agitation and aeration showed that the variation of agitation and aeration affected considerably the water activity and moisture content in the medium. However, this variation did not have a significant affect ($p>0.05$) on the pH of the medium.

4. CONCLUSION

In view of the results obtained for solid-state fermentation of apple pomace by *P. chrysosporium* to produce ligninolytic enzymes and extract polyphenolics compounds using different types of agitation and aeration following conclusions can be drawn:

- (1) Maximal enzyme production and total polyphenolic content obtained using C/D/C, followed by D/C/D and continuous agitation, respectively.
- (2) Maximal enzymes production and liberation of total polyphenolic content were obtained using 1.66, followed by 1.25 and 0.83 vvm as air flow, respectively.
- (3) Water activity, moisture content and viability were influenced by agitation and aeration types and the maximal viability was obtained using C/D/C agitation and 1.25 vvm as air flow rate.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Grant 355254, Canada Research Chair), FQRNT (ENC 125216), MAPAQ (No. 809051) and Initiative Inde 2010 (MELS) for financial support. The views or opinions expressed in this article are those of the authors.

ABBREVIATIONS

VVM: Volume per Volume per Minute

COD: Chemical oxygen demand

BOD: Biochemical oxygen demand

ATCC: American type culture collection;

cfu: Colony forming unit;

gds: Gram dry substrate;

LiP: Lignin peroxidase ;

MnP: Manganese peroxidase;

MPN: Most probable number;

OD: Optical density;

PDA: Potato dextrose agar;

SSF: Solid state fermentation;

U/gds: Units per gram dry substrate;

gdw : Gram dry weight

REFERENCES

- [1] S. Bhushan, K. Kalia, M. Sharma, B. Singh, P.S. Ahuja, Processing of apple pomace for bioactive molecules, *Crit. Rev. Biotechnol.* 28 (2008) 285–296.
- [2] Y. D. Hang, E. E. Woodams, Solid state fermentation of apple pomace for citric acid production, *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 2 (1986) 283-287.
- [3] Institut de la statistique de Québec, ISQ, 2007.
- [4] F. Gassara, S.K. Brar, F. Pelletier, M. Verma, S. Godbout, R.D. Tyagi, Pomace waste management scenarios in Québec—Impact on greenhouse gas emissions, *J.Haz. Mat.* (2011) doi:10.1016/j.jhazmat.2011.06.026.
- [5] F. Vendruscolo, P.M. Albuquerque, F. Streit, Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications, *Crit. Rev. Biotechnol.* 28 (2008) 1–12.
- [6] G. Viniegra-González, N. Favela-Torres, C.N. Aguilar, S.J. Romero-Gómez, G. Díaz-Godínez, C. Augur, Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems, *Biochem. Eng. J.* 13 (2003) 157-167.
- [7] K. Brijwani, H.S. Oberoi, P.V. Vadlani, Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran, *Process. Biochem.* 45 (2010) 120–128.
- [8] A. Zilly, G.S.C. Bazanella, C.V. Helm, C.A.V. Araújo, C.G.M. Souza, A. Bracht, Solid-state bioconversion of passion fruit waste by white-rot fungi for production of oxidative and hydrolytic enzymes, *Food. Bioproc. Technol.* (2011) doi:10.1007/s11947-011-0532-8.
- [9] F. Gassara, S.K. Brar, R.D. Tyagi, M. Verma, R.Y. Surampalli, Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerocheate chrysosporium*, *Biochem. Eng. J.* 49 (2010) 388-394.
- [10] C. M. Ajila, F. Gassara, S.K. Brar, M. Verma, R.D. Tyagi, J.R. Valéro, Polyphenolic antioxidant mobilization in apple pomace by different methods of solid-state fermentation and evaluation of its antioxidant activity, *Food. Bioproc. Technol.* (2011) DOI: 10.1007/s11947-011-0582-y

- [11] D. Mitchell, M. Berovic, Solid state fermentation, in: M. Berovic (ed.), Bioprocess Engineering Course, National Institute of Chemistry. Ljubljana, 1998, pp. 128–166.
- [12] S. Suryanarayan, Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. *Biochem. Eng. J.* 13 (2003) 189–195.
- [13] S. A. Shojaosadati, V. Babaeipour, Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solidstate bioreactor, *Process. Biochem.* 37 (2002) 909-914.
- [14] M. Tien, T.K. Kirk, Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81 (1984) 2280-2284.
- [15] P.J. Collins, A.D.W. Dobson, Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 3444-3450.
- [16] X. Fujian, C.H. Zhang, L. Zuohn, Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam exploded straw as substrate, *Biores. Technol.* 80 (2001) 149-151.
- [17] T. Swain, W.E. Hillis, The phenolic constituents of *Prunus domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food. Agric.* 10 (1959) 63–68.
- [18] S.S. Yang, Quantitative determination of soil gas with regard to soil microbial activities, *National Science Council Monthly.* 5 (1977) 478–502.
- [19] M.B. Palma, A.M.F. Milagres, A.M.R. Prata, I.M. de Mancilha, Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*, *Process Biochem.* 31 (1996) 141-145.
- [20] Y.J. Cho, H.J. Hwang, S.W. Kim, C.H. Song, J.W. Yun, Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during

- red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor, J. Biotechnolog. 95 (2002) 13-23.
- [21] J. Oostra, J. Tramper, A. Rinzema, Model-based bioreactor selection for largescale solidstate cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats, Enzyme. Microbial. Techno. 27 (2000) 652-663.
- [22] F. J.I. Nagel, J. Tramper, M.S. N. Bakker, A. Rinzema, Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation, Biotechnol. Bioeng. 72 (2001) 219-230.
- [23] B. Han, J.L. Kiers, R.M.J. Nout, Solid-substrate fermentation of soybeans with *Rhizopus* spp.: Comparison of discontinuous rotation with stationary bed fermentation, J. Biosci. Bioeng.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=PublicationURL&_tokey=%23TOC%236260%231999%23999119997%23140190%23FLP%23&_cdi=6260&_pubType=J&view=c&_auth=y&_acct=C000051292&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1072239&md5=65fd10c6fdf8f172e71a01f3926d1ff1
(1999) 205-209.
- [24] M. Raimbault, General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electron. J. Biotechnol. 1 (1998) 26-27.
- [25] A. Pandey, C.R. Soccol, D. Mitchell, New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products, Process. Biochem. 35 (2000) 1153-1169.
- [26] D.A. Vatter, K. Shetty, Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. Process. Biochem. 39 (2003) 367- 379.
- [27] M. Kissi, M. Mountadar, O. Assobhei, E. Gargiulo, G. Palmieri, P. Giardina, G. Sannia, Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water, Appl. Microbiol. Biotechnol. 57 (2001) 221-226.

- [28] B.K. Lonsane, N.P. Ghildyal, S. Budiartman, S.V. Ramakrishna, Engineering aspects of solid state fermentation, *Enzyme. Microbial. Techno.* 7 (1985) 258-265.
- [29] V. Bellon-maurel, O. Orliac, P. Christen, Sensors and measurements in solid state fermentation : a review, *Process. Biochem.* 38 (2003) 881-896.
- [30] A. Dunand, R. Renaud, J. Maratray, S. Almanza, M. Diez, INRA-Dijon reactors for solid state fermentation: designs and applications, *J. Sci. Ind. Res.* 55 (1996) 317-332.

Table 6. 1pH and moisture content variations during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration; \pm represents standard error calculated using triplicate sets

Time	Continuous agitation		C/D/C agitation, 1.25 VVM		D/C/D agitation		Aeration 1.66 VVM		Aeration 0.83 VVM	
	pH	Moisture content (% w/w)	pH	Moisture content (% w/w)	pH	Moisture content (% w/w)	pH	Moisture content (% w/w)	pH	Moisture content (% w/w)
0	4 \pm 0.01	75.3 \pm 1.2	4 \pm 0.01	74.12 \pm 1.9	4 \pm 0.01	74.17 \pm 1.8	4.45 \pm 0.02	74.3 \pm 1.9	4.56 \pm 0.12	75.13 \pm 1.9
12	4.02 \pm 0.01	75.6 \pm 1.5	4.02 \pm 0.1	74.16 \pm 0.9	4.08 \pm 0.02	73.49 \pm 2.1	4.43 \pm 0.05	75.2 \pm 1.7	4.49 \pm 0.09	74.8 \pm 2.1
24	4.01 \pm 0.02	76.5 \pm 1.7	4.02 \pm 0.02	74.22 \pm 1.7	4.06 \pm 0.01	73.72 \pm 1.8	4.39 \pm 0.06	74.1 \pm 1.9	4.43 \pm 0.07	74.9 \pm 1.8
36	4.03 \pm 0.02	71.15 \pm 1.3	4.05 \pm 0.01	74.24 \pm 2.3	4.07 \pm 0.03	73.23 \pm 1.6	4.46 \pm 0.04	73.9 \pm 2.1	4.46 \pm 0.13	75.1 \pm 1.7
48	4.02 \pm 0.01	76.9 \pm 1.5	4.02 \pm 0.03	74.28 \pm 1.4	4.05 \pm 0.02	74.16 \pm 1.4	4.52 \pm 0.1	73.7 \pm 1.9	4.47 \pm 0.21	74.7 \pm 2.4
60	4.02 \pm 0.03	74.5 \pm 2.1	4.04 \pm 0.02	73.46 \pm 1.6	4.03 \pm 0.01	72.96 \pm 1.6	4.51 \pm 0.12	73.6 \pm 1.7	4.45 \pm 0.06	74.6 \pm 2.4
72	4.04 \pm 0.01	79.8 \pm 1.9	4.05 \pm 0.02	71.12 \pm 1.5	4 \pm 0.02	70.88 \pm 2.4	4.43 \pm 0.08	72.7 \pm 1.8	4.41 \pm 0.05	74.9 \pm 1.6
80	4.04 \pm 0.01	73.2 \pm 1.7	4.05 \pm 0.01	76.42 \pm 1.9	4.07 \pm 0.03	71.94 \pm 1.9	4.36 \pm 0.09	72.5 \pm 2.3	4.49 \pm 0.09	75 \pm 1.7
98	4.05 \pm 0.02	70.9 \pm 2.3	4.07 \pm 0.03	76.12 \pm 1.8	4.06 \pm 0.04	72.97 \pm 2.2	4.38 \pm 0.1	71.8 \pm 3.1	4.38 \pm 0.13	74.8 \pm 2.3
105	4.07 \pm 0.03	78.8 \pm 1.4	4.08 \pm 0.02	74.18 \pm 2.1	4.04 \pm 0.03	74.8 \pm 1.9	4.29 \pm 0.05	71 \pm 2.2	4.43 \pm 0.08	74.7 \pm 1.8
123	4.07 \pm 0.02	70.4 \pm 1.7	4.06 \pm 0.03	72.48 \pm 1.9	4.08 \pm 0.02	73.65 \pm 1.7	4.23 \pm 0.05	67.6 \pm 1.9	4.39 \pm 0.09	74.6 \pm 1.6
133	4.24 \pm 0.04	74.4 \pm 1.2	4.21 \pm 0.04	76.12 \pm 1.9	4.05 \pm 0.03	74.17 \pm 1.8	4.25 \pm 0.07	66.5 \pm 1.8	4.41 \pm 1.2	74.5 \pm 2.3
147	4.18 \pm 0.01	72.2 \pm 2.1	4.13 \pm 0.02	76.82 \pm 1.7	4.2 \pm 0.05	69.3 \pm 2.1	4.17 \pm 0.1	65.2 \pm 1.7	4.51 \pm 0.09	74.7 \pm 1.8
171	4.12 \pm 0.01	71.24 \pm 1.9	4.02 \pm 0.02	72.42 \pm 1.9	4.15 \pm 0.02	67.2 \pm 1.7	4.19 \pm 0.08	64.3 \pm 1.6	4.43 \pm 1.3	75 \pm 1.7
195	4.06 \pm 0.03	70.28 \pm 1.7	4.02 \pm 0.01	71.46 \pm 1.8	3.9 \pm 0.03	65.06 \pm 1.5	4.13 \pm 0.13	63 \pm 1.8	4.39 \pm 1.2	74.3 \pm 2.3
219	4.08 \pm 0.02	70.16 \pm 2.2	4.02 \pm 0.02	70.18 \pm 1.7	3.83 \pm 0.01	64.36 \pm 1.2	4.1 \pm 0.09	62.7 \pm 1.7	4.41	74.1 \pm 1.9
243	4 \pm 0.03	75.3 \pm 1.9	4 \pm 0.01	74.12 \pm 2.1	3.8 \pm 0.02	64.72 \pm 1.4	4.45 \pm 0.08	60.3 \pm 1.7	4.56	73.9 \pm 1.8
250										74.2 \pm 1.6
288										73.8 \pm 2.3
300										73.7 \pm 1.9

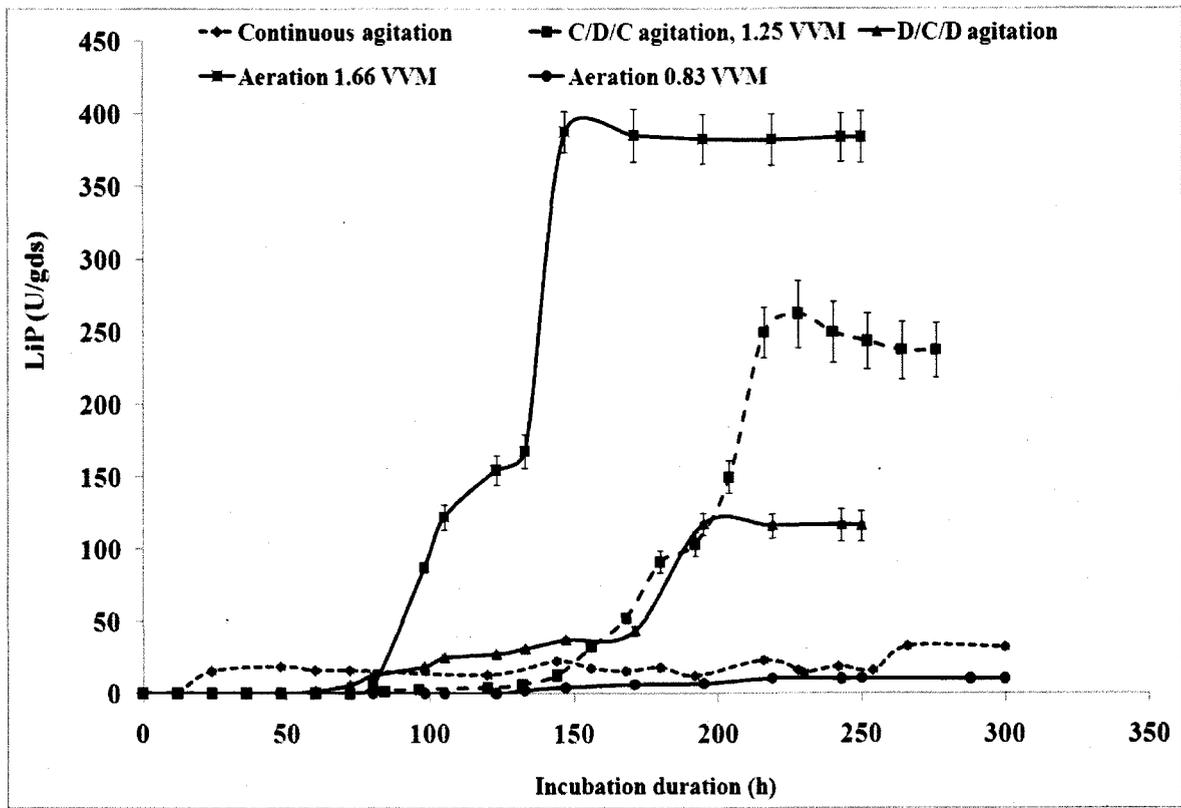


Figure 6. 1 LiP production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration

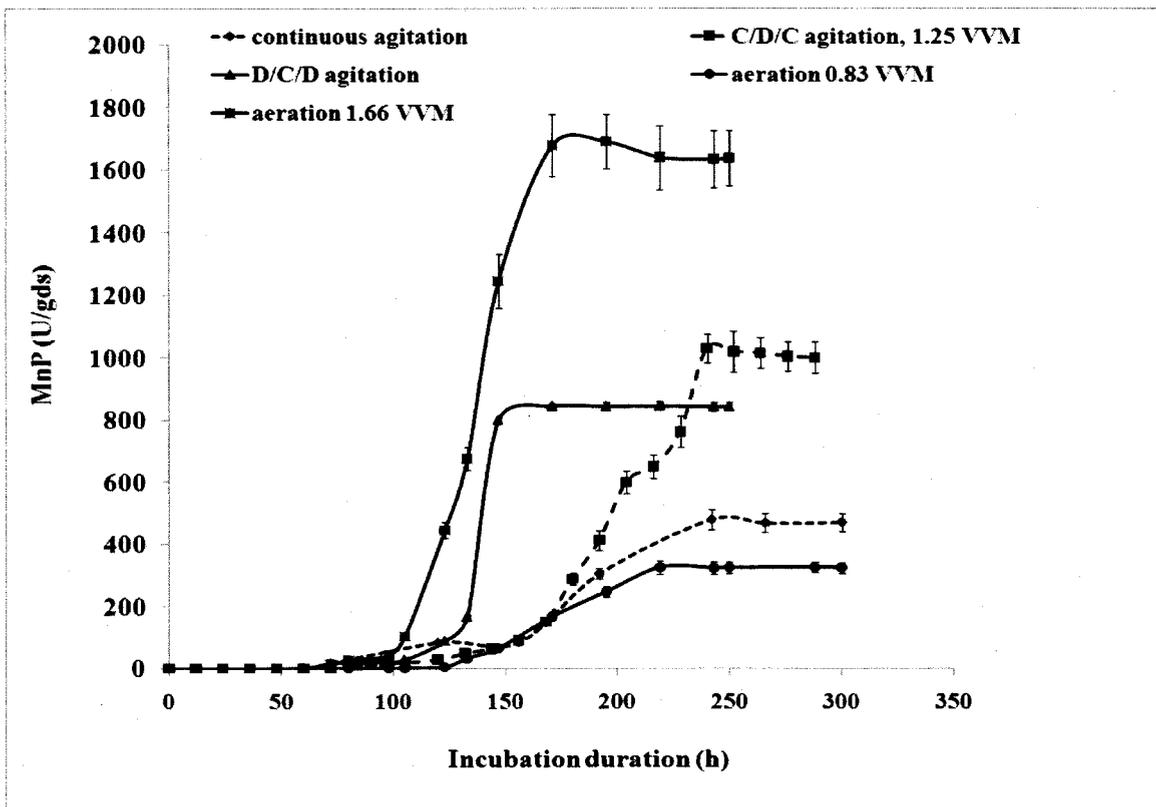


Figure 6. 2 MnP production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration

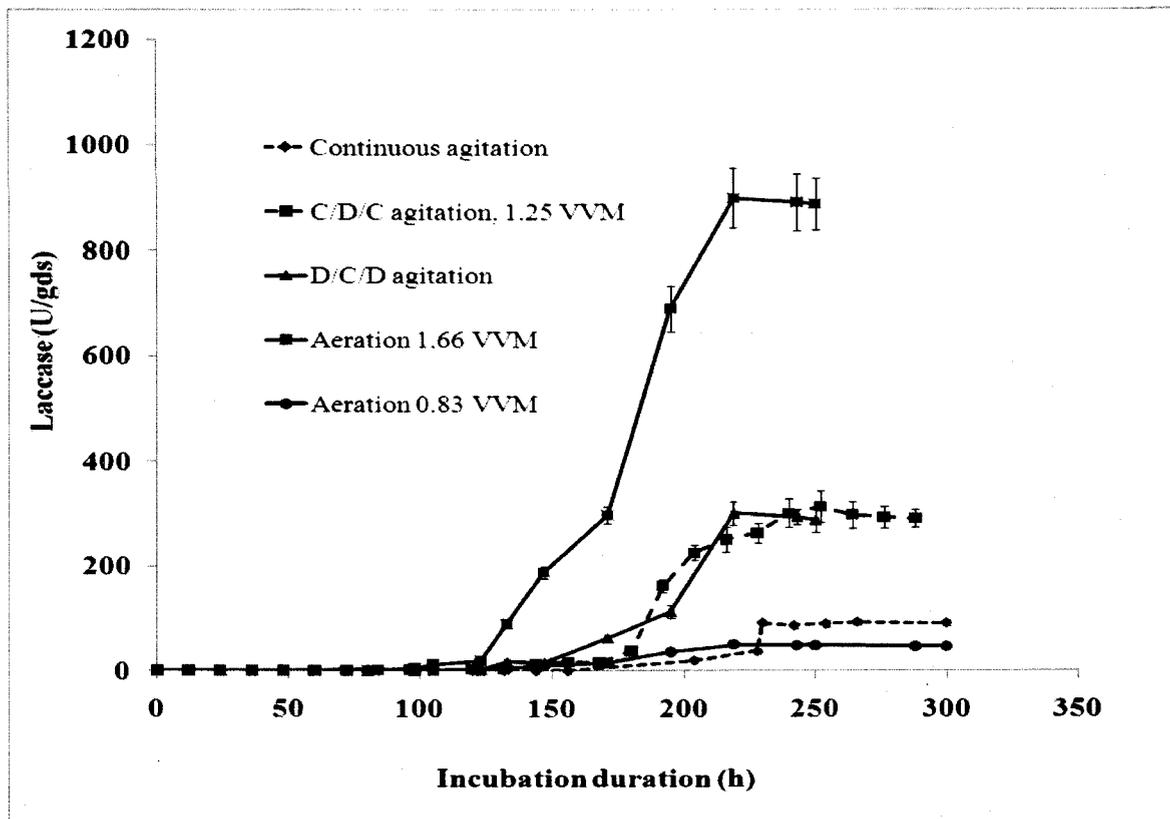


Figure 6. 3 Laccase production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration

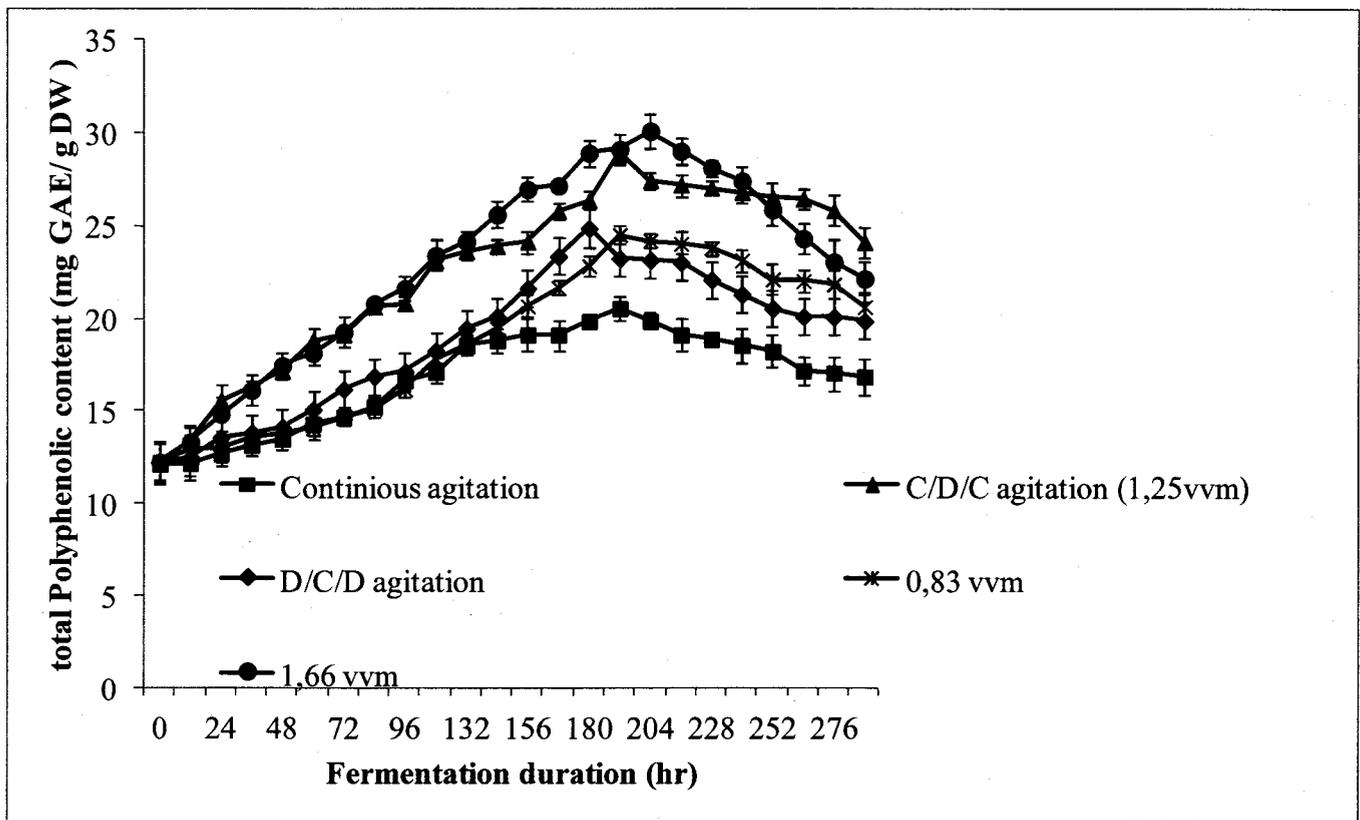


Figure 6. 4Liberation of total polyphenolic compounds production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of aeration and agitation

Values are expressed as means of three replicates \pm standard deviation

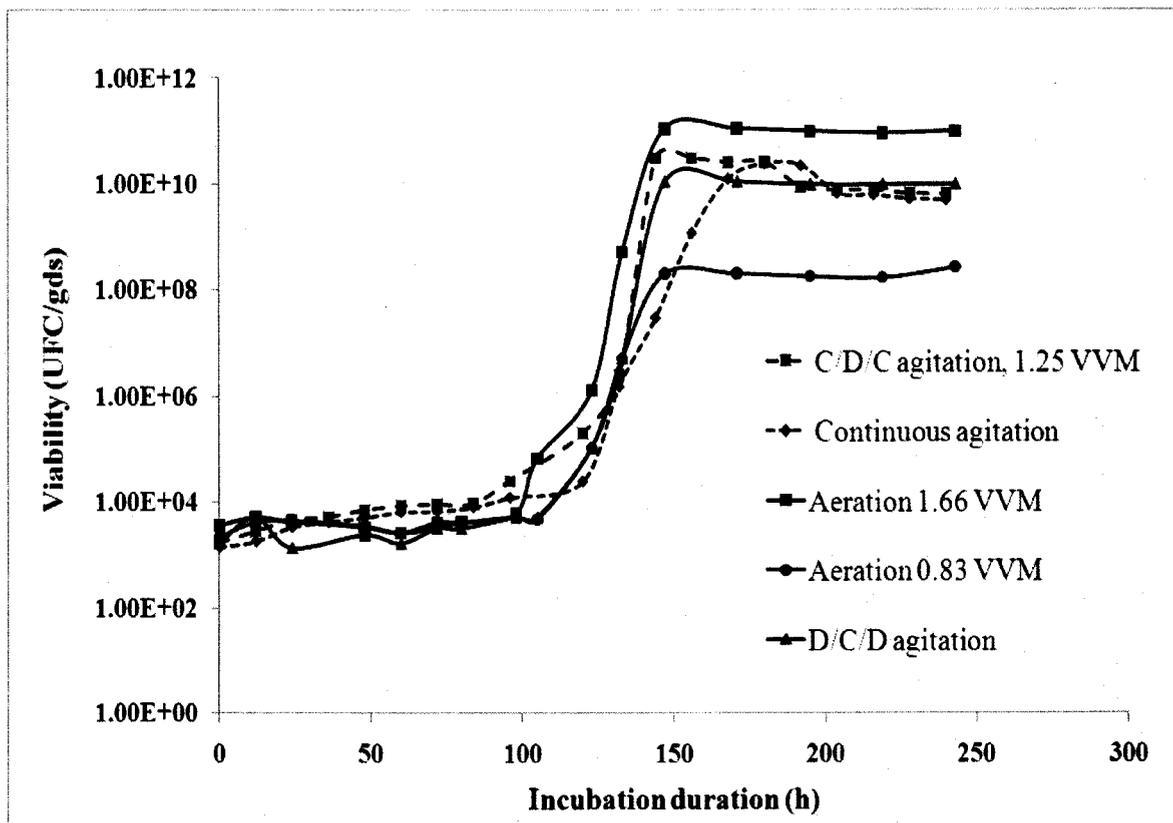


Figure 6. 5 *Phanerocheate chrysoporium* viability during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration

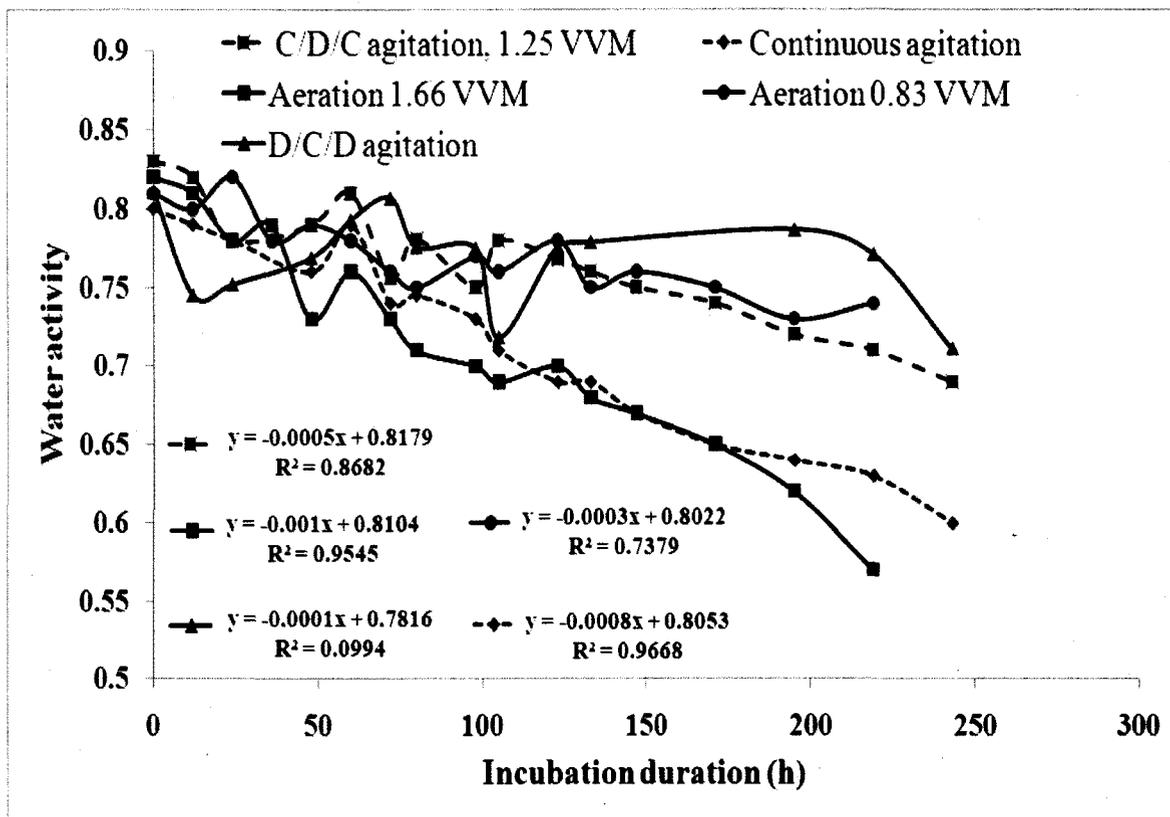


Figure 6. 6 Water activity variation during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration

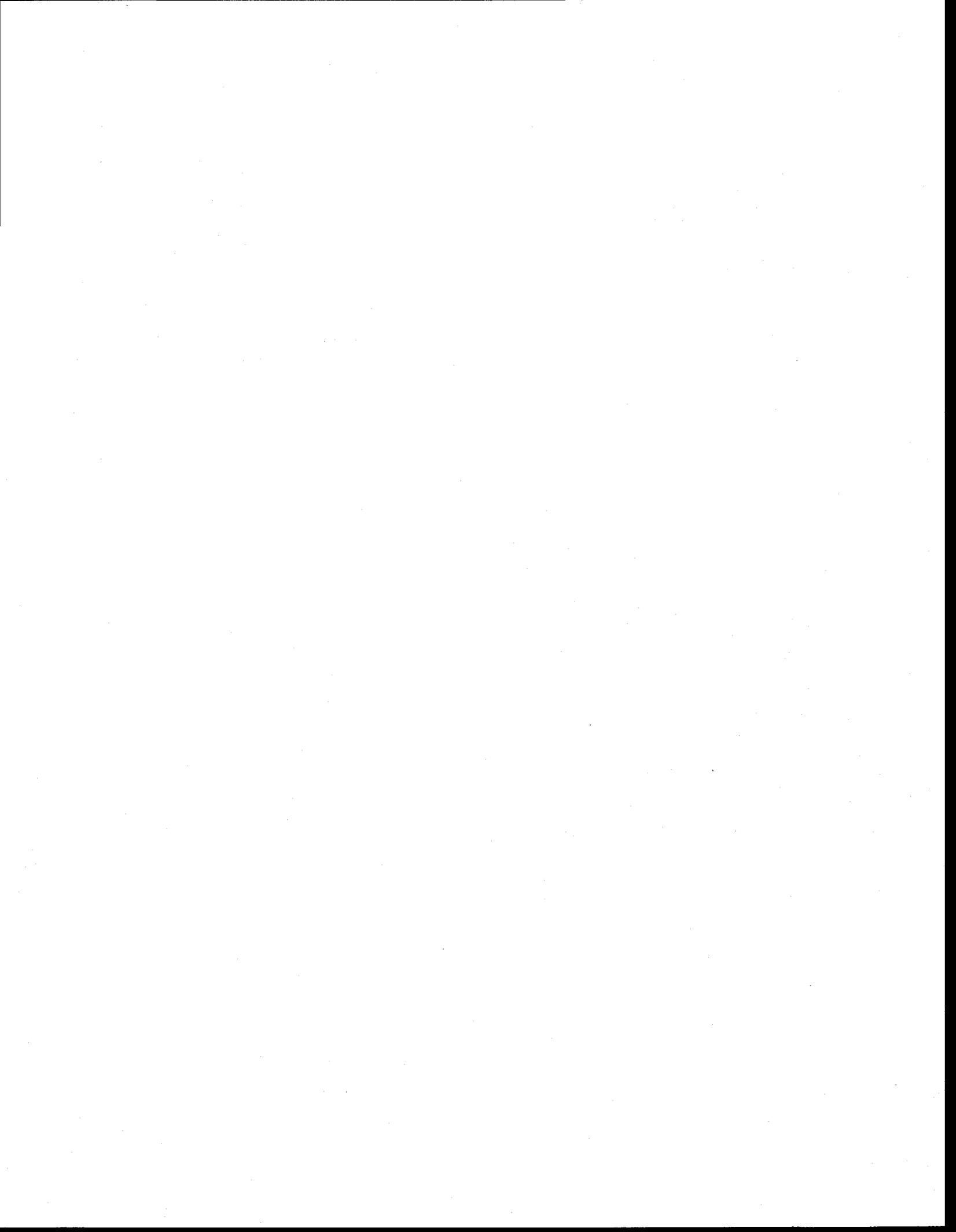


CHAPITRE IV
PARTIE 2:
**LIQUID STATE FERMENTATION OF APPLE POMACE
SLUDGE FOR THE PRODUCTION OF LIGNINOLYTIC
ENZYMES AND LIBERATION OF POLYPHENOLIC
COMPOUNDS**

Fatma Gassara, Ajila.C.M, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, M. Verma, J.R. Valero

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

Process biochemistry- Accepté



RÉSUMÉ

La production des enzymes ligninolytiques et l'extraction simultanée des composés polyphénolique par fermentation à l'état liquide de *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 24275) ont été étudiées en utilisant la boue d'ultrafiltration de jus de pomme et un milieu synthétique. Différents paramètres physico-chimiques et biologiques à savoir la viscosité, le potentiel zêta, la taille des particules, la viabilité et la production d'enzymes ont été étudiés. La production d'enzymes ligninolytiques était plus élevée dans la boue d'ultrafiltration de jus de pomme (45 U / L de laccase, 220 U / L de MNP et 6,5 U / L de LiP) que dans le milieu synthétique (17 U / L de laccase, 37 U / L de MnP et 6 U / L). Ces activités maximales ont été obtenues à la fin de la phase stationnaire et début de la phase de déclin de *P. chrysosporium*. Il a été également constaté que la production d'enzymes était fortement corrélée avec la viabilité de *P. chrysosporium* à la fois dans le milieu synthétique et la boue d'ultrafiltration de jus de pomme. Par ailleurs, les paramètres physico-chimiques tels que la taille des particules, le potentiel zêta et la viscosité étaient fortement corrélées à la viabilité de *P. chrysosporium* et à la production d'enzymes ligninolytiques. Une augmentation de la teneur en polyphénols extraits par l'acétone (383 à 720 mg GAE / litre) a été observée lors de la fermentation de la boue d'ultrafiltration de jus de pomme. De plus, il a été constaté que la teneur en polyphénols extraits à l'éthanol a augmenté de 1,5 fois jusqu'à 67 heures de fermentation et a diminué par la suite. On a remarqué ensuite que l'activité antioxydante est passée à 35%, puis a finalement baissé vue les changements dans la teneur en polyphénols.

Mots-clés: enzymes ligninolytiques, polyphénols, marc de pomme de boues, liquides de fermentation

ABSTRACT

Ligninolytic enzyme production and polyphenolic compound extraction by liquid-state culture of *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24275 was investigated by employing apple pomace sludge and synthetic medium. Different physico-chemical and biological parameters namely viscosity, zeta potential and particle size, viability and enzyme production were investigated. The ligninolytic enzyme production was higher in apple pomace sludge (45 U / L of laccase, 220 U/L of MnP and 6.5 U/L of LiP) than in synthetic medium (17 U/ L of laccase, 37 U/L of MnP and 6 U/L). These maximal activities were found during the stationary and decline phase. It was also found that enzyme production was strongly correlated with *P. chrysosporium* viability in both synthetic medium and apple pomace sludge. Moreover, physico-chemical parameters, such as particle size, zeta potential and viscosity were strongly correlated to the viability of *P. chrysosporium* and to the ligninolytic enzyme production. An increase in polyphenol content extracted by acetone (383 to 720 mg GAE/Litre) was observed during fermentation of apple pomace and it was found that the polyphenol content extracted by ethanol increased ~ 1.5 fold until 67 hours of fermentation and later it decreased. It was found that antioxidant activity increased to 35% and eventually decreased based on the change in the polyphenol content.

Keywords: Ligninolytic enzymes, polyphenol, apple pomace sludge, liquid fermentation

1. INTRODUCTION

White-rot basidiomycetes can degrade lignin, cellulose and hemicelluloses into low-molecular-weight compounds that can be assimilated for fungal nutrition. The degradation of cellulose, hemicelluloses and lignin is carried out by specific extracellular hydrolytic (cellulases and hemicellulases) and oxidative (ligninolytic) enzymes [1]. The ligninolytic enzyme complexes of white-rot fungi differ in their composition. These fungi secrete extracellular enzymes that are essential for lignin degradation: lignin peroxidase, Mn-dependent peroxidase, and a copper-containing phenoloxidase, laccase. Ligninolytic enzymes have shown high potential in industrial application, such as pulp and paper delignification [2], dye decolorization, wastewater and contaminated soil treatment [3] as well as in organic synthesis [4], biosensor applications [5] and inhibition of HIV-1 reverse transcriptase [6]. However, a major limitation for extensive industrial application of fungal enzymes is their high cost often associated with the raw materials. Thus, it is mandatory to search for inexpensive substrates as an alternative to high cost raw materials to reduce the production cost of ligninolytic enzymes. Recently, considerable interest has been focused on agro-industrial wastes for the production of enzymes, bioactive compounds, and different types of biomolecules using inexpensive substrates, such as apple and grape pomace, orange and pineapple waste, cassava bagasse, coffee husk, rice, and wheat bran [7-, 9]. Apple pomace and apple pomace sludge are important waste sources in many countries, and globally, several million tones of apple pomace and apple pomace sludge are produced annually in Canada [10]. In Canada, thousands of tons of apple pomace and apple pomace sludge are produced by apple processing industries. In 2008–2009, out of world's total apple production (69603640 tones), Canada contributed 455, 361 tones (more than 25% in Quebec alone) [10]. During the apple juice production processing, about 25–30% w/w apple pomace and 5–10% w/w apple pomace sludge is produced [11]. These wastes contain fermentable sugars and proteins which can lead to putrefaction necessitating a rapid management method. Apple pomace sludge (total carbon 51.9 g/l, total nitrogen 2.94 g/l, carbohydrates 66.0 ± 1.7 g/l, lipids 5.9 ± 0.32 g/l, protein 33.8 ± 2.0 g/l) is a lucrative alternative for the apple processing industries [11]. Hence, this waste can be used as fermentation substrate to produce many high value products, such as citric acid [11]. Apple processing byproducts are also found to be a rich source of polyphenols, and antioxidants [12]. The polyphenolic compounds in apple pomace have shown many health benefits, such as

anti-viral properties [13]. Recently, it was reported that enrichment of apple pomace with polyphenolic antioxidants can be carried out by solid-state fermentation by using white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* (*P. chrysosporium*) [14].

The aim of the present study is bio-production of ligninolytic enzymes using apple pomace sludge as a novel substrate through submerged fermentation by *P. chrysosporium* with simultaneous extraction of the polyphenolic compounds from fermented apple pomace sludge.

There has been no study reported in literature so far to the best of our knowledge dealing with: (1) utilization of apple pomace sludge for ligninolytic enzyme production; (2) influence of physico-chemical parameters (viscosity, zeta potential and particle size) on ligninolytic enzymes production under submerged culturing conditions and; (3) comparison of production of ligninolytic enzymes in apple pomace sludge with synthetic medium incorporating simultaneous extraction of polyphenolic compounds.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Media

Apple pomace ultrafiltration sludge (Lassonde Inc., Rougemont, Montreal, Canada) was selected as fermentation medium due its nutrient enrichment I to produce ligninolytic enzymes and simultaneously extract polyphenolic compounds. Apple pomace sludge refers to liquid sludge obtained after the ultrafiltration of crude juice. Before performing fermentation, the pH of the medium was adjusted to 4.5 ± 0.1 .

Another liquid state fermentation was carried out using a synthetic medium as described by Tien and Kirk [15]. The synthetic medium was used as control to compare the enzyme production with apple pomace sludge.

2.2 Microorganism and inoculum preparation

P. chrysosporium (ATCC 24275) strain was selected as a suitable organism for bio-processing of liquid state fermentation for its potential for higher enzyme production. *P. chrysosporium* was maintained on potato-dextrose-agar (PDA) medium at 4 ± 1 °C. The culture of *P. chrysosporium* was grown on potato-dextrose-broth (PDB) medium, incubated at 37 ± 1 °C. This medium was used as inoculum for liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium. The inoculum was transferred aseptically to 7.5 L fermenter after 48 h of incubation in flasks.

2.3. Fermentation

A fermenter of 7.5 L capacity (Infors AG, Switzerland) with 4L working volume was used separately for synthetic medium and apple pomace sludge (sterilized at $121\pm 1^\circ\text{C}$ for 30 min) to produce extracellular ligninolytic enzymes. The medium was inoculated with 10 % (v/v) inoculum. Temperature and pH of the fermentation medium was controlled at $37\pm 1^\circ\text{C}$ and 4.5 ± 0.1 , respectively. To maintain dissolved oxygen concentration above 20% saturation (critical oxygen concentration), the medium was initially agitated at a speed of 200 rpm and finally increased up to 600 rpm and the air flow rate was controlled automatically using a computer controlled system. Samples were withdrawn from the fermenter at 12 h intervals for the analysis of viability, ligninolytic enzyme activity, polyphenol extraction, viscosity, zeta potential, and particle size until the depletion phase of *P. chrysosporium* growth and maximal enzyme production.

2. 4 Enzyme assays

The analysis of lignin peroxidase (LiP) activity was based on the transformation of veratryl alcohol to veratryl aldehyde as described by Tien and Kirk (1984) [16].

Laccase activity was assayed using 2,2-azino bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS as described by Collins and Dobson (1992) [17].

The analysis of manganese peroxidase (MnP) activity was based on the transformation of Mn^{2+} to Mn^{3+} as described by Xu et al. (2001) [18].

2. 5 Viability assay

Viability assay was used as an indicator of the amount of living biomass in the fermented medium. Viability of broken fungal mycelium in samples containing mycelium and residual substrate was assayed with most probable number (MPN) method as described by Gassara et al. 2010 [7].

2. 6 Extraction of polyphenolic compounds

The samples were accurately weighed to 10 g and 20 mL of 80% acetone and 80% ethanol was added as solvents. The ultrasonic extraction was performed for 30 min at $40\pm 1^\circ\text{C}$ in an ultrasonication bath (Elma Hans Schmidhauer GmbH & Co. KG,

Germany). The mixture was later centrifuged at 7000 x g for 20 min and supernatant was used for the measurement of polyphenolic content and antioxidant activity.

2. 7 Estimation of total phenolic content and free radical scavenging activity of polyphenolic extracts

Total polyphenolics in the phenolic extract of sample was determined by the method of Swain and Hills (1959) [19]. The free radical scavenging activity of polyphenolic extracts was determined as described by Ajila et al [14].

2. 8 Physico-chemical parameters

2. 8. 1 Viscosity

During fermentation, the rheological properties (viscosity) of fermented broth were measured at 12 h and 24 h interval using a rotational viscometer (Cole-Palmer Inc., Toronto, Canada).

2. 8. 2 Particle size

Particle size analysis of the fermented medium was performed using Fritsch Laser particle sizer analysette 22 (Fritsch GmbH, Germany). These tests can measure the average diameter of 10%, 43%, 50% and 90 % particles (D10, D43, D50, and D90) in the range of 0.1 to 1000 μm . The particle size analysis was performed to establish a relationship with the viability of *P. chrysosporium*, production of MnP, LiP and laccase in apple pomace sludge at different time intervals.

2. 8. 3 Zeta potential

The zeta potential analysis was studied to establish the relationship between the particle charge of the fermented broth, viability of the microorganism and production of ligninolytic enzymes. Particle charges and interaction between them are strongly influenced by particle size and pH of the medium. The zeta potential was analyzed using a zetaphoremeter (Zetaphoremeter IV and Zetacompact Z8000, CAD Instrumentation, Les Essarts King, France) taking into account an average of 10 measurements.

2.9 Statistical Analyses

All the experiments were assayed in replicates and an average of 3 replicates was calculated along with the standard deviation. Database was subjected to an analysis of variance (ANOVA) using statistical Analysis System Software (STATGRAPHICS Centurion, XV trial version 15.1.02 year 2006, StatPoint, Inc., USA) was used to carry

out multiple range tests among data and the results which have $P < 0.05$ were considered as significant.

3. RESULTS & DISCUSSION

3.1 Production of ligninolytic enzymes and viability of *Phanerochaete chrysosporium* during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium

Ligninolytic enzymes production (MnP, LiP, laccase) and profile of viability of *P. chrysosporium* during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium were studied and are presented in Fig. 7.1 and Fig. 7.2, respectively. The lag phase of this fungus was longer in synthetic medium (66 h) compared with apple pomace sludge (30h). The exponential phase was longer in apple pomace sludge (more than 50 h) than in the synthetic medium (Figure 7.2). This can be explained by the availability of nutrients (especially, sugar) in apple pomace sludge. Furthermore, the viability of *Phanerochaete chrysosporium* in apple pomace sludge showed a maximum (3.08×10^7 UCF/ mL) similar to that obtained in synthetic medium (7.25×10^8 CFU/ mL). The viability study was carried out to verify the correlation with ligninolytic enzymes production. According to this study, the viability of the microorganism was strongly correlated with enzyme production (Figure 7.1, 7.2). In addition, overall maximal activities of the ligninolytic enzymes (LiP, MnP, and laccase) were obtained during the stationary phase and decline phase of the growth of microorganism. This proves the fact that ligninolytic enzymes were produced during the secondary metabolism of *Phanerochaete chrysosporium*. The analysis of the enzymes activities produced by *P. chrysosporium* grown on apple pomace sludge showed that the maximum activities of laccase, LiP and MnP were 45 U/L, 6.5 U / L and 220 U/ml respectively. These activities were obtained after 84 h, 102 h and 102 h of fermentation, respectively. These maximal activities were obtained at the beginning of the decline phase of *P. chrysosporium* growth (from 88 h to 114 h) (Fig. 1). This is explained by the fact that ligninolytic enzymes are secondary metabolites secreted by white rot fungi in wood. Secondary metabolite production occurs often upon entering the stationary phase of microbial growth. In addition, the maximal activities of laccase, LiP and laccase obtained in liquid culture are 10000 times, 40000 times (305 U/L) and 6000 times (1287.5U / gds) lower

than the activities obtained in a solid culture of apple pomace waste (305 U/gss, 1287.5U/gds, respectively) [20]. Furthermore, ligninolytic enzymes production in this culture was lower than the values obtained by Xu et al. (2001) [18] (2600 U/L of LiP, 1375 U/L of MnP) while using the same strain in a medium (containing steam-exploded wheat straw). The enzyme production in this study was lower than these of other many studies used in literature using different strains cultivated on wastes such as wood, corn cob, barley straw [21, 22]. The lower values could be attributed to the absence of lignin in apple pomace sludge and lack of all nutrients in this sludge, especially nitrogen source. Apple pomace waste contained rice husk, rich in lignin that has been used in the juice extraction process to facilitate filtration process. The higher lignin content in solid apple pomace, barley straw, corn cob, wheat straw makes them more favorable for ligninolytic enzymes production unlike apple pomace sludge that contains lower quantity of lignin. The addition of nutrient source and ligninolytic enzyme inducer, such as veratryl alcohol and copper sulfate can improve laccase, MnP, LiP production by *P. chrysosporium* in apple pomace sludge [23,24].

Maximal laccase, MnP, LiP production in the synthetic medium used in this study were 17 U/L, 6 U/L and 37U/L, respectively (Figure 7.1). These activities were obtained after 156 h, 132 h, 120 h of fermentation. Hence, the maximal enzymes production in the synthetic medium was obtained during the stationary phase of *P. chrysosporium* (Figure 7.2) and remained stable until the end of fermentation. Enzyme production in synthetic medium was lower than apple pomace sludge. This was due to the absence of lignin in the synthetic medium that induces the ligninolytic enzyme production by white-rot fungi.

3. 2 Comparison of physico-chemical parameters

The physico-chemical properties of the medium are known to affect the product of fermentation. The viscosity, particle size and zeta potential were studied and are presented in figure 7.3a, 7.3b, and 7.3c. The parameters are correlated to the viability and ligninolytic enzyme production. When microorganisms grew and the mycelia were synthesized, the viscosity increased (from 111.58 mPa.s at 55 h to 32.58 mPa.s at 114 h of fermentation in APS, from 1.34 mPa.s to 13.31 mPa.s at 96 h in SM), particle size increased (from (D43= 35.67 μ m D50=20.32 μ m D90=79.65 D10=2.83 μ m) at 38 h to (D43=467.64 μ m, D50= 574.04, D90= 681.80 μ m, D10=42.61 μ m) at 60 h) increased and zeta potential increased (from -14.34 Mv at 60 h to -21.9 mV at the end of

fermentation of apple pomace sludge). This was related to microorganism growth and mycelial synthesis which made the liquid medium more and more viscous [25]. Moreover, when viscosity decreased in apple pomace sludge due to higher agitation (900 rpm) to increase the dissolved oxygen above 20%, particle size decreased and zeta potential decreased despite the increase of viability. This decrease can be also attributed to the production of cellulase by *P. chrysosporium* that could decrease the viscosity of the medium [26]. Higher viscosity in the medium decreases the oxygen transfer to microorganism that will automatically affect its growth and product synthesis. Thus, when there was an increase in viscosity after 60 h of fermentation in apple pomace sludge when the aeration and agitation of the medium was increased to improve the oxygen transfer. Furthermore, when particle size of the medium increase, the air surface decreases and the growth of microorganisms decreases resulting in poor product synthesis. Generally, smaller particles provide greater air / surface which promotes the binding of microorganisms on the substrate and, therefore, it is a desirable factor. However, very small particles can cause agglomeration of the substrate, which can interfere with microbial respiration thus resulting in lower growth. The zeta potential usually depends on particle size and pH of the medium. During fermentation, pH was maintained constant at 4.5, the zeta potential was then related to the particle size of the medium. There was a relationship between these values as shown in figure 3b and 3c. Hence, zeta potential must not be very high to conserve the particle size that facilitates the growth of microorganisms and enzyme production.

3. 3 Liberation of polyphenolic compounds during fermentation and evaluation of its antioxidant activity

The polyphenol content in the acetone and ethanol extracts from apple pomace by liquid fermentation are given in Figure 4a and the polyphenol content was higher in acetone extract than alcohol. It was found that the polyphenol content in acetone increased from 383 to 720 mg GAE/litre of samples during liquid fermentation and the polyphenol content in ethanol increased from 408 to 639 mg GAE/ litre samples. The polyphenol content in apple pomace slowly increased ~ 1.5 fold until 67 h of fermentation. After 67 h of fermentation, the polyphenol content decreased from 720 to 617 mg GAE/ L and 639 to 508 mg GAE/L in acetone and ethanol extract of fermented apple sludge. The increase in polyphenol content during the exponential phase may be due to the release of free phenolics caused by the production of carbohydrate metabolizing enzymes, such

as β -glucosidase [27] and the decrease in total polyphenol content during the stationary phase may be due to the polymerization and lignification of the released polyphenolics by the lignifying and tannin forming peroxidases and enzymes produced by the *P.chrysosporium* [14, 28]. The total phenolics content significantly ($P < 0.05$) changed during fermentation from 24 h onwards.

The radical inhibition capacity was measured by DPPH scavenging activity and was higher at 67 h and correlated with the increase in the total polyphenolic content (Figure 4b). A significant difference ($P < 0.05$) in the free radical scavenging activity was observed in the ethanol and acetone extracts indicating that most of these antioxidants having radical quenching capacity were acetone extractable. A rapid decrease in free radical scavenging activity may be due to polymerization and degradation of polyphenolic compounds by ligninolytic enzymes during the later stages of growth. It has been reported that the enrichment of polyphenol can be achieved by solid state fermentation of apple pomace [19]. In liquid state fermentation, the polyphenol content slowly increased ~ 1.5 fold until 67 h of fermentation followed by a decrease.

4. CONCLUSION

Ligninolytic enzymes production using apple pomace sludge (45 U/ L of laccase, 220 U/L of MnP and 6.5 U/L of LiP) was higher than the synthetic medium (17 U/ L of laccase, 37 U/L of MnP and 6 U/L). *P.chrysosporium* growth correlated well with ligninolytic enzyme production in both apple pomace sludge and synthetic medium. Viscosity, particle size and zeta potential affected the oxygen transfer, the growth of the microorganism and ligninolytic enzymes production. An increase in polyphenol content was observed during liquid state fermentation of apple pomace and the polyphenol content slowly increased ~ 1.5 fold until 67 h of fermentation and later showed a decreasing trend.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Grant 355254, Canada Research Chair), FQRNT (ENC 125216) and MAPAQ (No. 809051) for financial support. The views or opinions expressed in this article are those of the authors.

ABBREVIATIONS

ATCC: American type culture collection

cfu: Colony forming unit

LiP: Lignin peroxidase

MnP: Manganese peroxidase

MPN: Most probable number

OD: Optical density

PDA: Potato dextrose agar

U/ml: Units per mL of medium

REFERENCES

- [1] Huang DL, Zeng GM, Feng CL, Hu S, Zhao MH, Lai C, et al. Mycelial growth and solid-state fermentation of lignocellulosic waste by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* under lead stress. *Chemosphere* 2010; 81: 1091-1097.
- [2] Camarero S, Ibarra D, Martinez AT, Romero J, Gutierrez A, DelRio JC. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme Microb Technol* 2007; 40: 1264-1271.
- [3] Wu Y, Teng Y, Li Z, Liao X, Luo Y. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil. *Soil Biol Biochem* 2008; 40: 789-796.
- [4] Ncanana S, Burton S. Oxidation of 8- hydroxyquinoline catalyzed by laccase from *Trametes pubescens* yields an antioxidant aromatic polymer. *J Mol Cat B: Enz* 2007; 44, 66-71.
- [5] Santhiago M, Vieira IC. L-Cysteine determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on laccase from *Aspergillus oryzae*. *Sens Act B: Chem* 2007; 128, 279-285.
- [6] Wang J, Wang HX, Ng TB, A peptide with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom *Russula paludosa*. *Peptides* 2007; 28, 560-565.
- [7] Gassara F, Brar SK, Tyagi RD, Verma M, Surampalli RY. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerocheate chrysosporium*. *Biochem Eng J* 2010; 49: 388-394.
- [8] Torrado AM, Cortés S, Salgado JM, Max B, Rodríguez N, Bibbins BP, Converti A, Domínguez JM. Citric acid production from orange peel wastes by solid state fermentation. *Braz J Microbiol* 2011; 42, 394-409.
- [9] Huang DL, Zeng GM, Jiang XY, Feng CL, Yu HY, Liu HL. Bioremediation of Pb-contaminated soil by incubating with *Phanerochaete chrysosporium* and straw. *J Hazard Mater* 2006; B134: 268-276
- [10] Statistics Canada (2010). Fruits and vegetable production. Agriculture division, crops section. pp. 1-44, <http://www.statcan.gc.ca>.
- [11] Dhillon GS, Brar SK, Verma M, Tyagi RD. Utilisation of different agroindustrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biochem Eng J*, doi:10.1016/j.bej.2011.02.002.
- [12] Četkovic G, Čanadanović-Bruneta J, Djilasa S, Savatovića S, Mandića A, Tumbasa V. Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chem* 2008; 109: 340-347.

- [13] Suárez B, Álvarez AL, García YD, Barrio G, Lobo AP, Parra F. Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food Chem* 2010; 120, 339–342.
- [14] Ajila CM, Gassara F, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valéro JR. Polyphenolic antioxidant mobilization in apple pomace by different methods of solid-state fermentation and evaluation of its antioxidant activity. *Food Bioprocess Technol* 2011; DOI: 10.1007/s11947-011-0582-y
- [15] Tien M, Kirk TK. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *Methods in Enzymology*, 1988; 238–248.
- [16] Tien M, Kirk TK. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2280-2284.
- [17] Collins PJ, Dobson ADW. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3444-3450.
- [18] Xu FJ, Chen ZH, Li ZH. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam exploded straw as substrate. *Biores Technol* 2001; 80: 149-151.
- [19] Swain T, Hillis WE. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 1959; 10(1): 63–68.
- [20] Gassara F, Brar SK, Tyagi RD, John RP, Verma M, Valero JR. Parameter Optimization for Production of Ligninolytic Enzymes Using Agro-industrial Wastes by Response Surface Method. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2011; 16: 343-351.
- [21] Ferraz A, Cordova AM, Machuca A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. *Enzyme Microb Technol* 2003; 32:59–65.
- [22] Tychanowicz GK, De Souza DF, Souza CGM, Kadowaki MK, Peralta RM. Copper improves the production of laccase by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Brazil Arch Biol Technol* 2006; 49:699–704.
- [23] Alvarez, JM, Canessa, P, Mancilla RA, Polanco R, Santibáñez PA, Vicuna R. Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispora* is mediated by an ACE1-like copper-binding transcription factor. *Fungal Genet Biol* 2009; 46: 104-111.
- [24] Rosale E, Rodríguez-Couto S, Sanromán A. Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme Microb Technol* 2007; 40: 1286–1290.
- [25] Mishra P, Srivastava P, Kundu S. A comparative evaluation of oxygen mass transfer and broth viscosity using Cephalosporin-C production as a case strategy. *World J Microbiol Biotechnol* 2005; 21: 525-530.

- [26] Lewis SM. chap 2.1 Industrial Enzymology 2nd edn, MacMillan Press, London; 1996.
- [27] Vatter DA, Shetty K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochem* 2003; 39 (3): 367-379.
- [28] Duhalt RV, Westlake DWS, Fedorak PM. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60(2): 459-66.

Table 7. 1 Physico-chemical composition of apple pomace sludge

Components	
pH±0.1	3.3±0.1a
Total solids (TS) (g/l)	115±5.0
Total volatile solids (TVS) (g/l)	38±2.4
Suspended solids (SS) (g/l)	41.5±2.0
Total carbon (Ct)	44.3 g/l
Total nitrogen (Nt)	2.2 g/l
Carbohydrates (g/l)	56.2±1.3
Lipids (g/l)	5.1±0.2
Protein (g/l)	28.8±1.2
Al (mg/kg)	259.4±5.2
Ca (mg/kg)	912.2±58
Cd (mg/kg)	0.02±0.01
Cr (mg/kg)	0.57±0.03
Cu (mg/kg)	13.4±1.2
Fe (mg/kg)	333.1±45
K (mg/kg)	6825.3±30
Pb (mg/kg)	0.3±0.02
S (mg/kg)	2200±128
Zn (mg/kg)	18.1±2.5
Na (mg/kg)	405.2±3

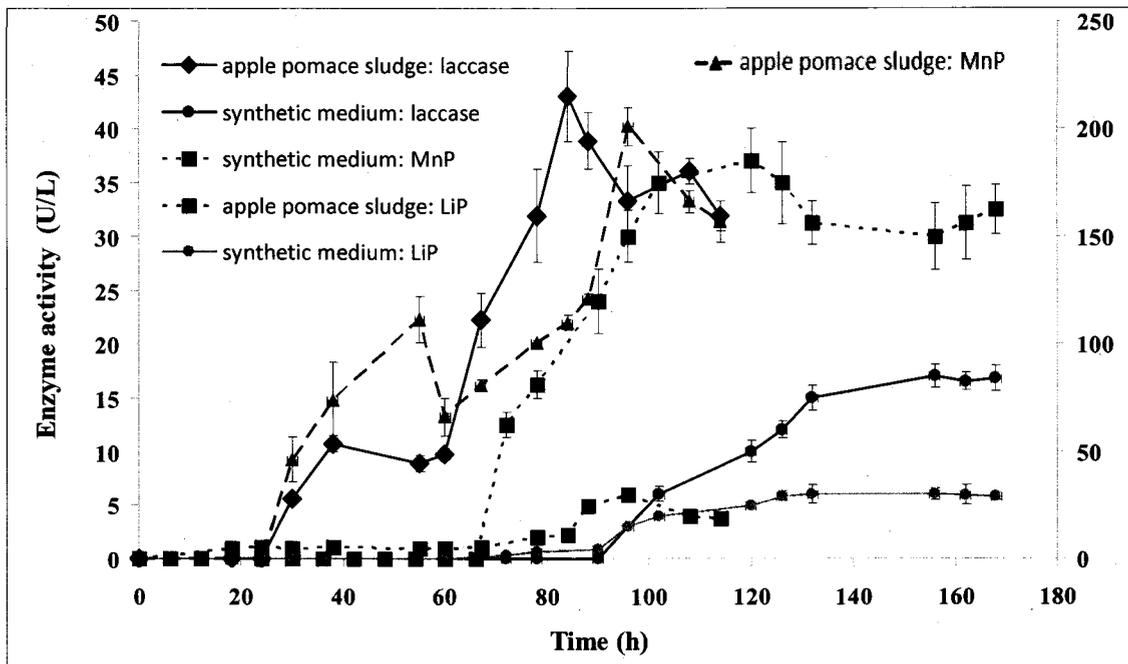


Figure 7. 1 Lignolytic enzymes production during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium. Values are expressed as means of three replicates \pm standard deviations.

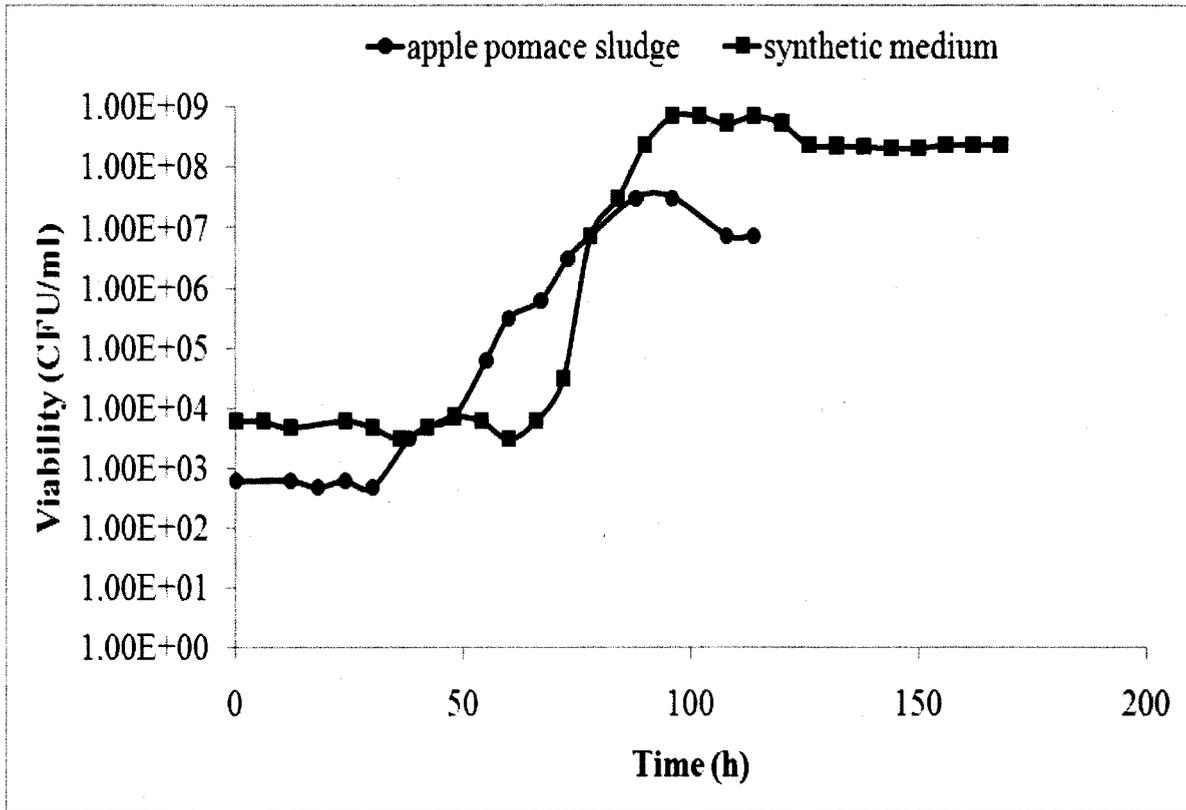


Figure 7. 2 Viability of *Phanerochete chrysosporium* during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium.

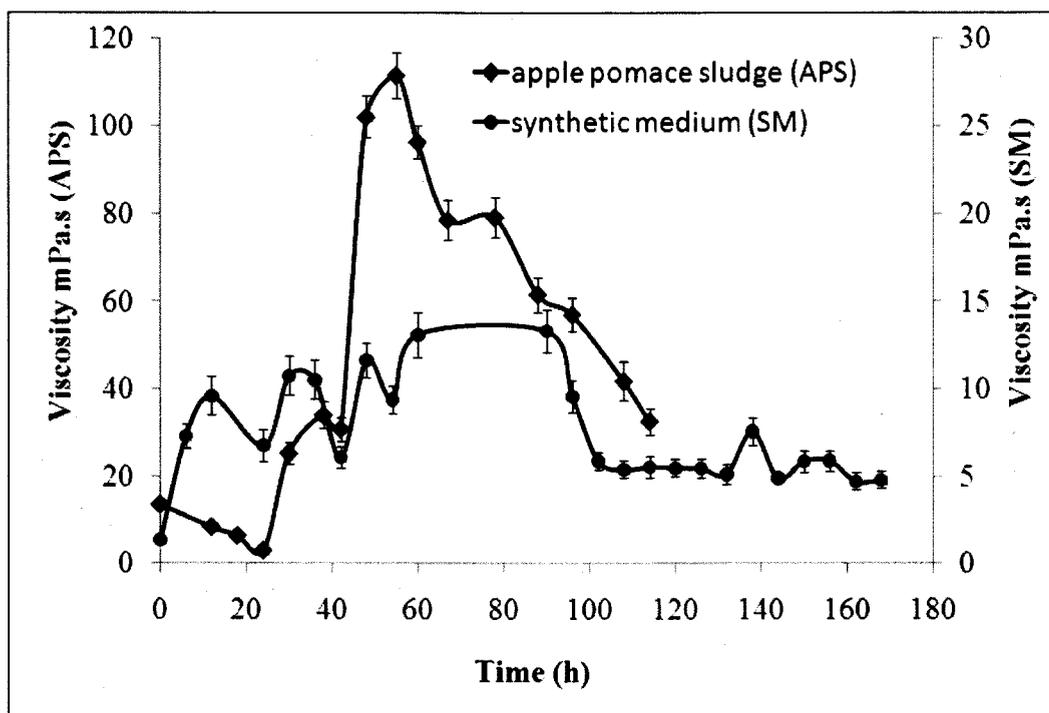


Figure 7. 3a Viscosity trends during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium. Values are expressed as means of three replicates \pm standard deviations.

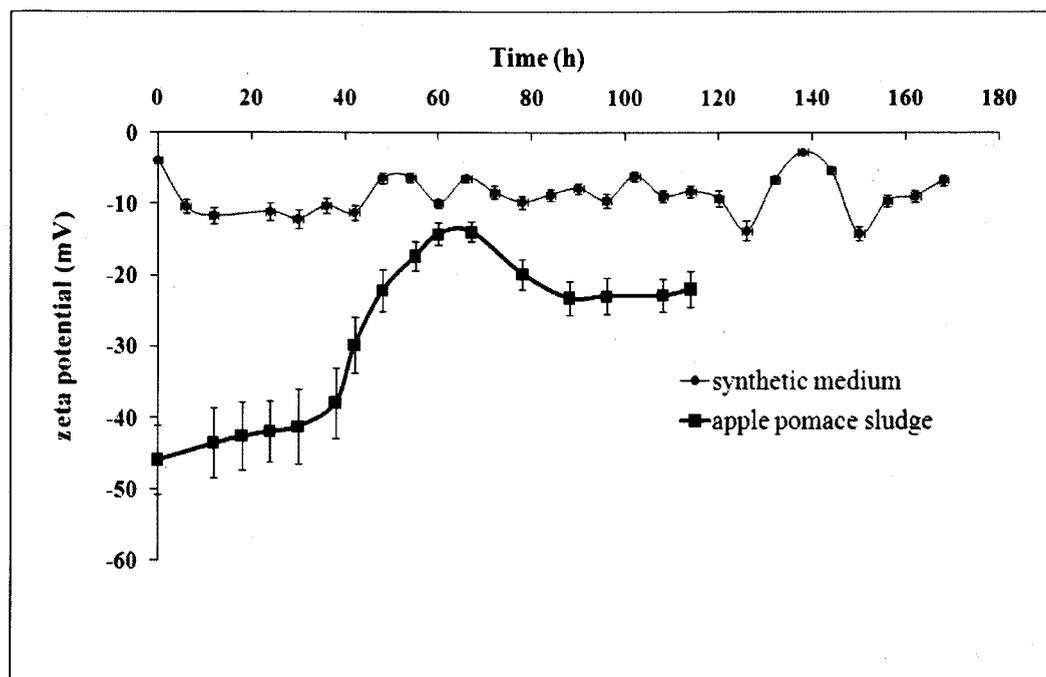


Figure 7. 3b Zeta potential during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium. Values are expressed as means of nine replicates \pm standard deviations.

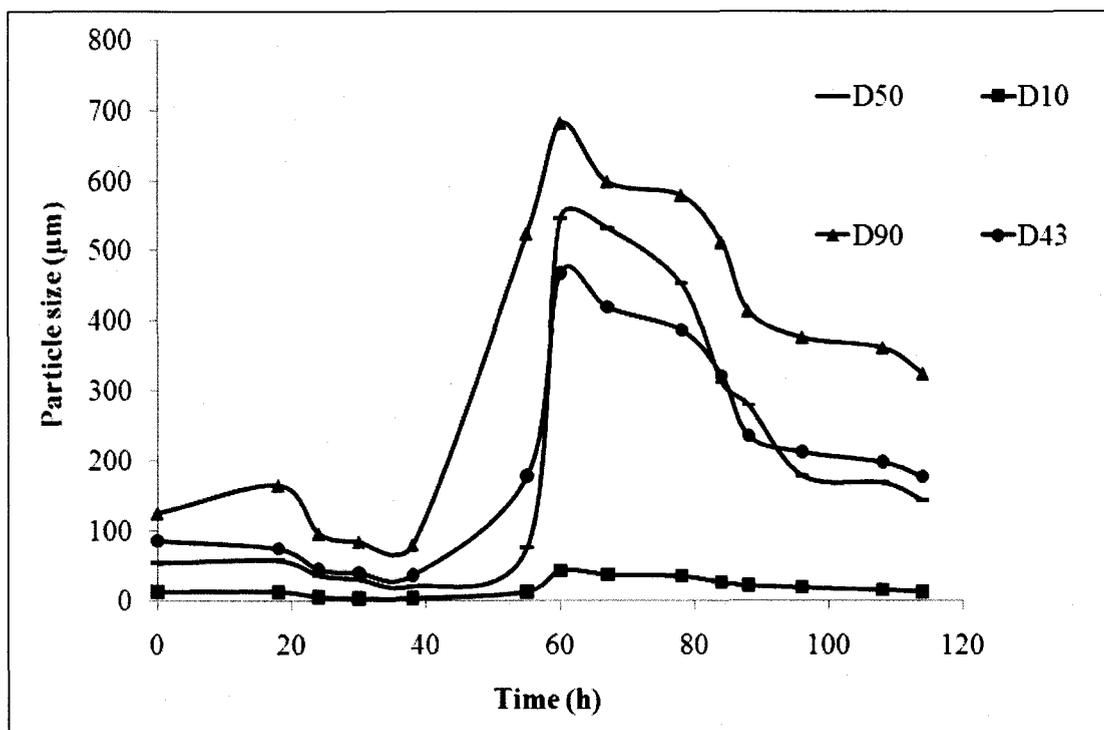


Figure 7. 3c Particle size analysis during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium.

Figure 7. 3 Physicochemical properties of liquid medium during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium

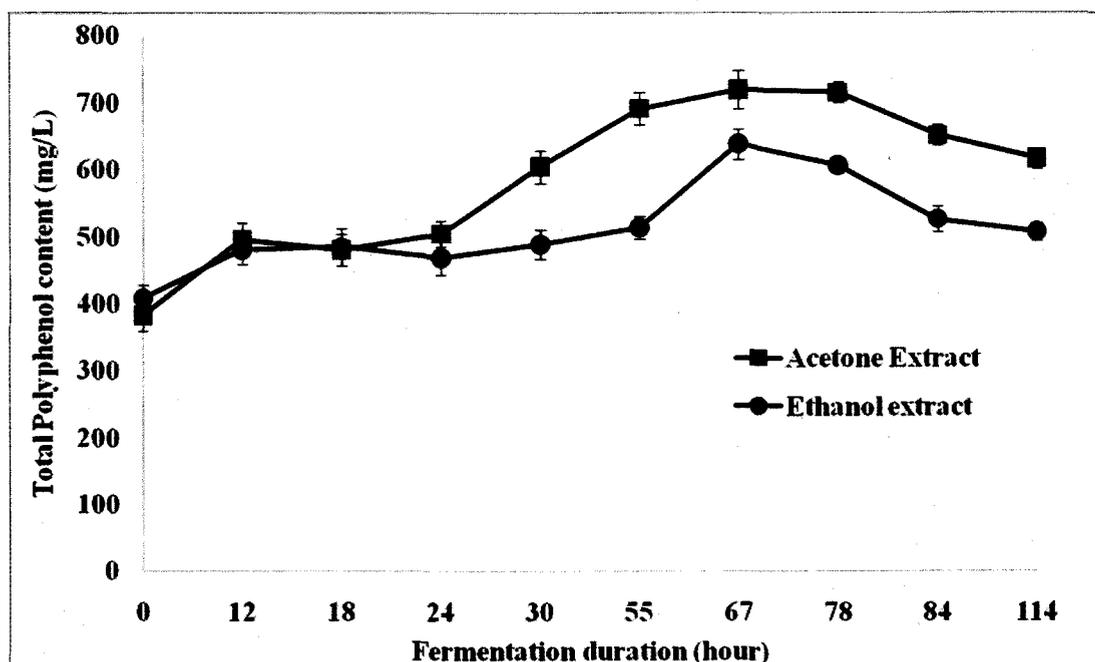


Figure 7. 4a Total polyphenolic content of acetone and ethanol extracts of apple sludge during liquid fermentation. Values are expressed as means of three replicates \pm standard deviations.

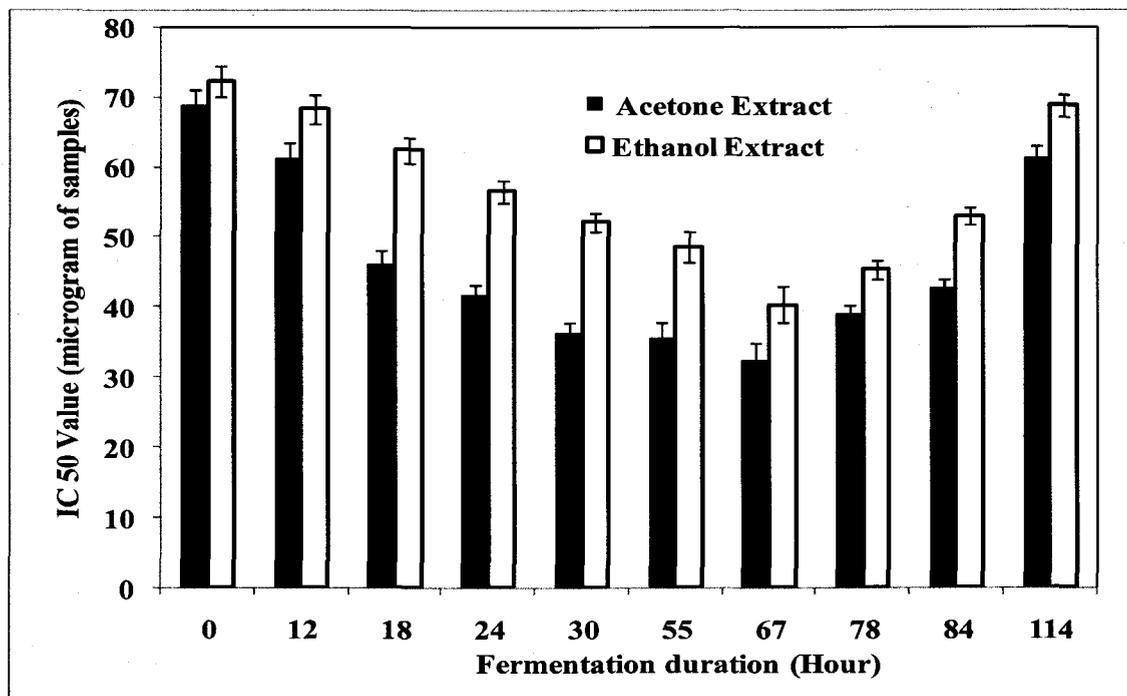


Figure 7. 5a IC₅₀ value for free radical scavenging activity of acetone and ethanol extracts of apple sludge during liquid fermentation. Values are expressed as means of three replicates \pm standard deviations.

CHAPITRE V
PARTIE 1
ENCAPSULATION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES AND ITS
APPLICATION IN CLARIFICATION OF JUICE

Fatma Gassara-Chatti, Ajila.C.M, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, M. Verma, J.R.

Valero

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

Food chemistry. En révision



RÉSUMÉ

La stabilité thermique, les propriétés physico-chimiques et l'effet sur la clarification du jus, des formulations en hydrogel d'enzymes ligninolytiques, produites par *Phanerochaete chrysosporium* ont été évalués. Les résultats ont montré que l'encapsulation a augmenté significativement ($P < 0,05$) la stabilité thermique des enzymes à 75 ° C et à 4 ° C. À 75 ° C, l'activité de laccase, MnP, LiP, libre a diminué jusqu'à non détectable, 7,9%, non détectable, respectivement. Cependant, l'activité à 75° C de laccase, MnP, LiP piégés dans les micogels de polyacrylamide / pectine, polyacrylamide / gélatine et polyacrylamide / CMC a diminué jusqu'à : (94% de laccase, 97% de MnP, 93% de LiP), (94% de laccase, 98% de MnP, 88% de LiP) et (87% de laccase, 91% de MnP, 87% de LiP) respectivement. Il a été trouvé que l'augmentation de la taille des particules et la viscosité de la formulation a amélioré la stabilité des enzymes ligninolytiques. La réduction des composés polyphénoliques et l'amélioration de la clarté du jus de grenade et de fruits rouges ont été plus significatives ($p > 0,05$) en utilisant des enzymes encapsulées. Ainsi, le traitement enzymatique peut offrir une solution efficace et économique pour la clarification des jus de fruits, qui peut remplacer la méthode traditionnelle d'ultrafiltration.

Mots clés : enzymes ligninolytiques, gel de polyacrylamide, encapsulation d'enzymes, clarification des jus

ABSTRACT

The thermal stability, physico-chemical properties and effect on juice clarification of hydrogel formulations of ligninolytic enzymes from *Phanerochaete chrysosporium* were evaluated. The results showed that enzyme entrapment significantly increased ($P < 0.05$) the thermal stability of enzymes at 75°C and 4°C. At 75 °C, maximum activity decreased down to non detectable, 7.9 %, non- detectable for free laccase, MnP, LiP respectively; to 94, 97, 93% for laccase, MnP and LiP entrapped into Polyacrylamide/ pectin, 94, 98, 88 % for laccase, MnP and LiP encapsulated respectively into Polyacrylamide/ gelatine and to 87%, 91, 87 % for for laccase, MnP and LiP entrapped, respectively into polyacrylamide/CMC. When particle size and viscosity of the formulation increased, enzyme stability increased. The polyphenolic reduction and clarity amelioration in berry pomegrante juice was more significant ($p > 0.05$) using encapsulated enzymes treatment than free enzymes. Hence, enzymatic treatment is more economical for the juice clarification than traditional ultrafiltration method.

Key words: ligninolytic enzymes, polyacrylamide gel, enzyme encapsulation, juice clarification

1. INTRODUCTION

Recent advances in enzyme biochemistry, material science, and computational technology have promoted the study of chemical and biological modification of enzymes to obtain enhanced stability and catalytic performance against adverse conditions that deactivate the enzyme. The incorporation of enzymes into polymeric nanostructures (Kim et al., 2008) is particularly promising method as the flexibility in designing structures of the polymers offers immense possibilities for tailoring enzymes for various applications, such as nonaqueous catalysis, bionanodevices, intelligent molecular machines, and artificial cells (Borner, 2009). Nanosize hydrogels (nanogels) have attracted growing interest especially in relation to their biomedical applications. In general, chemically cross-linked nanogels are synthesized by microemulsion polymerization or a crosslinking reaction of intramolecularly associated polymer molecules (Kabanov & Vinogradov, 2009). It has been reported that a self-assembly method for preparation of physically crosslinked nanogels by controlled association of hydrophobically modified polymers in water (Akiyoshi & Sunamoto, 1996). For example, hydrophobized polysaccharides self-assembled in dilute aqueous solutions and formed monodisperse nanogels in which the association of hydrophobic groups provided crosslinking sites. In particular, nanogels of polyacrylamide interact with different protein and molecules, such as enzymes (Nishikawa, Akiyoshi, & Sunamoto, 1994). These features enable polyacrylamide nanogel to be utilized as a protein-carrier (Ayame, Morimoto, & Akiyoshi, 2008). Polyacrylamide nanogel/protein complexes are already in use in clinical trials as cancer vaccines (Ikuta et al., 2002).

Bioconjugation is a useful method for modifying the function of proteins and enzymes for pharmaceutical, biotechnological and agroindustrial applications. Chemical conjugation of proteins with synthetic polymers enables their colloidal stability or thermal stability to be enhanced, and their enzyme activity to be controlled (Treetharnmathurot & Ovartharnporn, 2008). However, chemical conjugation has the difficulties that the synthesis is not always easy, and conjugation sometimes induces a decrease in the activity of the proteins (Treetharnmathurot & Ovartharnporn, 2008). The supramolecular approach to bioconjugation has the advantages of easy preparation and versatility for various proteins (Yuan, Harada, Yamasaki, & Kataoka, 2005). Biological polymers have certain advantages, such as low cost, nontoxic and biocompatible property, easy interactions with enzymes through their functional groups. Hydrogels of natural

polymers, such as gelatin, alginate, chitosan, pectin, carboxy methyl cellulose, xanthan, and agarose have been conveniently used in both wet and dried states, although these supports suffer from low mechanical strength and ease of microbial degradation (T Tümtürk, Demirel, Altınok, Aksoy, & Hasirci, 2008). Mechanical strength of the corresponding hydrogels can be enhanced by preparing interpenetrating polymer networks (IPNs) or semi-interpenetrating polymer networks (semi-IPNs) (Demirel, Özcetin, Sahin, Tümtürk, Aksoy & Hasirci, 2006). IPNs have been defined as combination of two polymers, each in network form, at least one which has been synthesized and/or cross-linked in the presence of the other. Semi-IPNs can be prepared by dissolving a preformed linear polymer in hydrophilic monomer and cross-linking agent mixture which is subsequently polymerized. In this way, a synthetic network is formed around primary polymer chain which is modifying the behavior of the hydrogel. Ligninolytic enzymes are complexes of enzymes degrading lignin. The enzymes are produced extracellularly by white-rot fungi. The essential extracellular enzymes that are essential for lignin degradation: lignin peroxidase, Mn-dependent peroxidase, and a copper-containing phenoloxidase, laccase. Ligninolytic enzymes shows high potential for application in different industries, such as pulp and paper delignification, dye decolorization, waste water, and contaminated soil treatment, as well as uses in organic synthesis, biosensor applications, inhibition of HIV-1 reverse transcriptase (Sarnthima, Khammuang, & Svasti, 2009) and juice clarification (Neifar et al.2010). The main purpose of the juice clarification is to reduce the amount of phenolic compounds and decrease the astringency of the product (Alper & Acar, 2004). Ultrafiltration (UF), which removes all substances larger than the membrane molecular weight cutoff (MWCO), is commonly used to stabilize fruit juices (Siebert, 1999). One disadvantage of this technique is that ultrafiltered juices are not always stable, but rather tend to produce pronounced subsequent haze, caused by reactive phenolic compounds that cannot be retained by the UF membrane (Stutz, 1993). An enzymatic pretreatment technique, hyperoxidation of raw juice with laccase (p-diphenol-oxidoreductase, E.C. 1.10.3.2) (Maier, Frei, Wucherpfennig, Dietrich, & Ritter, 1994) and pectinase (Lieu Abdullah, Sulaiman, Aroua, & Megat Mohd Noor, 2007) prior to UF has been introduced as an alternative to treatment with physical-chemical adsorbents. In these studies, enzymatic pretreatments to clarification of fruit juices have been investigated by free enzymes, such as pectinase and laccase and several factors affecting the clarification such as

incubation time, incubation temperature and enzyme concentration have been studied using by response surface methodology (RSM).

The main purpose of this study is to prepare new matrices for the encapsulation of ligninolytic enzymes and investigate alternative usage of these encapsulated enzymes in juice clarification.

In the present study, hydrogel of of P(AAm)/ Gel, P(AAm)/ Pec and P(AAm)/CMC were prepared. Different concentrations of gelatin, pectin and CMC were tested. Ligninolytic enzymes (MnP, Laccase, LiP) were encapsulated in these hydrogels by entrapment as this process takes place under mild conditions and do not cause any significant damage to the native structure of the enzyme. Stability, pH, viscosity, zeta potential of these hydrogels were examined. These hydrogels were used for juice clarification to select the best formulation.

2. MATERIALS AND METHODS

2. 1 Solid state fermentation

Ligninolytic enzymes were produced using solid state fermentation of apple pomace by *Phanerochaete chrysosporium*. The fermentation was carried out in 12-L solid-state fermenter of rotating drum type, Terrafor (Infors HT, Switzerland). The sterilized medium containing 4.5 kg was transferred into the sterilized bioreactor under aseptic conditions. For the fermentation, apple pomace was treated with inducers, such as copper sulfate (2 mM), veratryl alcohol (2 mM), and Tween-80 (0.1% v/v), and the pH was adjusted to 4.5. The inoculation was carried out using the spore suspension. The fermentation was carried out in a controlled environment at $37\pm 1^\circ\text{C}$, rotating speed of 2 rpm and aeration rate of 2 vvm. After fermentation, the enzymes were extracted by centrifugation after adding 50mM sodium-phosphate buffer (10/1, v/w) at pH6.5.

2.2. Enzyme formulation

Different formulations were produced which depended on the type of process involved. The polyacrylamide gel was suspended in phosphate buffer solution (M, pH 7.2) with different concentrations (0.1%, 0.2% and 0.5%) while stirring. The suspensions were sonicated for 15 min at room temperature using a probe type sonicator (Sonifier 250, Branson Co., Ltd., CT, USA). After sonication, the suspensions were filtered through

0.45 μm (vinylidene fluoride) (PVDF) filters (Millex-HV, Millipore Co., Ltd., MA, USA) to remove dust. Finally, clear suspensions were obtained. The next step involved complexation between PA Nanogel and ligninolytic enzymes. For complexation, an appropriate amount of ligninolytic enzyme solution was co-incubated for 1 h at 25 °C with nanogel in phosphate buffer containing gelatin, CMC, pectin ($6\text{mg}/\text{mL}^{-1}$) and PA nanogel ($5\text{--}6\text{mg}/\text{mL}$). The mixture was incubated for 1 h at 25 °C and PA nanogel-enzyme complex was obtained.

After incubation, different analyses of micro-encapsulated enzymes, such as particle size, enzyme stability, and zeta potential were performed.

2. 3 Enzyme assays

2. 3. 1 Lignin peroxidase (LiP)

Lignin peroxidase (LiP) activity was routinely assayed by spectrophotometer at $25\pm 1^\circ\text{C}$ using veratryl alcohol as a substrate and by monitoring the formation of veratryl aldehyde by hydrogen peroxide at 310 nm (Tien & Kirk, 1984). One unit of LiP activity (U) is defined as the amount of enzyme which produces 1 μmol of veratryl aldehyde per min under the assay conditions.

2. 3. 2 Laccase activity

Laccase activity was assayed with 2,2-azino bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) in 0.1M phosphate-citrate buffer at pH 4. The transformation of ABTS to ABTS⁺ was determined by the increase in A_{420} ($\epsilon_{420} = 36\text{mM}/\text{cm}$) (Collins & Dobson, 1997). One unit of enzyme activity (U) is defined as the amount of enzyme which produces 1 μmol of product per min under the assay conditions.

2. 3. 3 Manganese peroxidase (MnP)

The analysis of MnP activity was based on the transformation of Mn^{2+} to Mn^{3+} as described by Xu, Chen, & Li (2001). The reaction mixture contained 1.7 ml of citrate-phosphate buffer (pH 3; 0.1 mol/l), 0.05 ml of MnSO_4 (0.40 mol/l), 0.2 ml of enzyme and 0.05 ml of H_2O_2 (0.016 mol/l). One unit of MnP activity is defined as the amount of enzyme which results in 10% of $\text{OD}_{240\text{ nm}}$ increase/min.

2.4. Physico-chemical parameters of enzymes formulations

2.4.1. Viscosity

After the entrapment of enzymes into different hydrogels, the viscosities of these formulations were measured using a rotational viscometer (Cole-Palmer Inc., Toronto, Canada). The viscometer spindle diameter was 1.2 cm, with a gap size of about 2.5 mm between the spindle and the walls of the reservoir. Three different spindles were used during this study – LV1, LV2 and ultra-low centipoise adapter. The viscosity study was carried out in order to establish a relationship between stability and the activity of ligninolytic enzymes and viscosity of the formulation.

2. 4. 2 Particle size analysis

Particle size analysis of the different formulations was performed using Laser Scattering Particle Size Distribution Analyser LA-950 HORIBA (Edison New Jersey, USA). The principle is based on the diffraction of laser beams to measure the particle size ranging from 0.01 to 3000 microns. This measurement is carried out in 60 seconds, with high reliability and reproducibility. This method is based on the principles of Fraunhofer diffraction and Mie scattering. During entire analysis, ultrasonic function was switched off to avoid breakage of apple pomace sludge particle. The stirrer speed and recirculation pump speed were kept moderate at 250 rpm and 500, respectively to minimize the breakage/damage of apple pomace sludge particles. During the analysis, each sample was diluted approximately 250-fold in tap water, before being analyzed 3 times (for each sample). The average result was then calculated to determine the particles size distribution of fermented broth. These tests can measure the average diameter of 10%, 43%, 50% and 90 % particles (D_{10} , D_{43} , D_{50} and D_{90}). The results can be expressed as s/s (surface areas of particles having a specific diameter out of the total surface area of particles); n/n (number of particles having a specific diameter out of the total surface area of particles) and percent v/v (volume of particles having a specific diameter out of the total volume of particles). In this case, the particles are assumed to have a spherical shape. This instrument can measure the size of particles ranging between 0.1 to 1000 μm . The particle size analysis of formulations was performed out in order to establish a relationship between stability and the activity of ligninolytic enzymes and particle of the formulation.

2. 4. 3 Zeta potential

After enzyme encapsulation, the zeta potential of different hydrogels was studied in order to establish the relationship between this chemical parameter and enzyme stability inside hydrogels. Particle charge and interaction between them are strongly influenced by particle size and pH of the medium. For this reason, establishing a correlation between the size of particles, their charge, and the growth of microorganisms is important.

The zeta potential was determined after diluting the samples with filtered deionized water at room temperature (200 µl of each sample in 250 ml of deionized water). The zeta potential analysis was performed using a zetaphoremeter (Zetaphoremeter IV and Zetacompact Z8000, CAD Instrumentation, Les Essarts King, France). The zeta potential values were obtained after taking the average of 10 measurements.

2. 5 Statistical Analyses

All the experiments were assayed in 3 replicates, and an average of replicates was calculated along with the standard deviation. Database was subjected to an analysis of variance (ANOVA). Statistical Analysis System Software (STATGRAPHICS Centurion, XV trial version 15.1.02 year 2006, StatPoint, Inc., USA) was used to carry out multiple range tests among data and the results which have $P < 0.05$ were considered as significant. Fisher's least significant difference procedure was used to discriminate among the means.

2. 6 Juice treatment by enzymes

For each experiment, about 4 ml juice (Oasis, berry pomegranate antioxia, Lassonde Inc., Rougemont, Montreal, Canada) was subjected to different enzymatic treatment.

2.6.1. Physico-chemical analyses of juice

The content of total polyphenolics in the juice before and after enzyme treatment was determined by the method of Swain & Hills (1959). The absorbance was recorded at 725 nm. Gallic acid was used as a standard. The content of total polyphenolics in the juice was expressed as gallic acid equivalents (GAE) in mg/ liter of the samples. The clarity of the juice before and after treatment with enzyme was studied by measuring the absorbance at 650 nm) and color was detected by measuring the absorbance at 420 nm.

2. 7 Stability of the native enzyme and enzyme nanogel at high temperatures

The thermal stability of the native enzyme and the enzyme nanogel was determined by incubating the enzyme formulations at different temperatures (from 4 to 75 °C) for a given period of time (3 h). After the incubation, ligninolytic enzyme activities (MnP, LiP, laccase) were analyzed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3. 1 Effect of temperature

The effect of temperature on the activities of free and encapsulated enzymes were investigated within temperature range of 4–75 °C and the obtained relative activities are presented in Fig.s 8.1, 8.2 and 8.3. The optimum temperatures for all systems (enzymes and different formulations) were found to be 40 °C, 20, 40°C for MnP, LiP and laccase respectively (Fig. 8.1, Fig. 8.2 and Fig. 8.3). However, between 20 and 40 °C, the entrapped MnP, LiP and laccase activities were higher than 90%. Entrapment creates a kind of protection for the encapsulated enzymes causing higher stability in the activities compared to free enzyme, against temperature changes. This property of encapsulated ligninolytic enzymes make the systems suitable for industrial applications working in the mentioned temperature ranges. For free laccases, optimum temperatures have been also reported as 40 °C by other researchers (Dodor, Hwang, & Ekunwe, 2004). On the other hand, optimum temperatures for laccases immobilized by adsorption and covalent binding have been reported as 45 °C (Hu, Zhau, & wang, 2007) and 50 °C (Hublik, & Schinner, 2000), respectively. As the temperature was increased to 75 °C, maximum activity decreased down to non detectable for free laccase; to 94 % for P(AAm)/ pectin, 94, 89, 87 % for P(AAm)/ gelatin at concentrations of 0.01, 0.02 and 0.05 % w/v respectively and 0.87, 82, 73% for P(AAm)/CMC at concentrations of 0.01, 0.02 and 0.05 % w/v. In the case of MnP, when the temperature increased to 75 °C, maximum activity decreased down to 7.9 % for free MnP; to 97 % for P(AAm)/ pectin (0.01% w/v), 98 % for P(AAm)/gelatin (0.02% w/v) and 91 % for P(AAm)/CMC. However, when temperature increased to 75 °C, maximum LiP activity decreased to 0 % for free MnP; to 93 % for P(AAm)/ pectin (0.01% w/v), 88 % for P(AAm)/gelatin (0.02% w/v) and 87 % for P(AAm)/CMC (0.02% w/v). Entrapment involves physical enclosure of the enzyme in

micro spaces formed in the matrix structures. In this method, enzymes do not chemically bond to polymeric matrices. Therefore, it is expected that the enzyme would preserve its original three-dimensional conformation while the active sites having no interaction with the polymeric matrices upon encapsulation and optimum parameters (pH and temperature) of the encapsulated enzyme are comparable to the free enzyme (Han, & Juan, 2000). In this study, laccase was entrapped into P(AAm)/Pec, P(AAm)/Gel and P(AAm)/CMC matrices, where these support materials were prepared under moderate conditions forming high water containing biocompatible hydrogel structures. All these formulations were more stable than free enzymes in high temperature (60 and 75° C) and low temperature (4°C). However, ligninolytic enzymes entrapped into P(AAm)/Pec are more stable than the ligninolytic enzymes entrapped in other hydrogels. Hence, pectin with polyacrylamide gives higher protection of ligninolytic enzymes from inactivation at high temperatures. Laccase activity stability in all formulations was higher when compared to Yamak, Kalkan, Altinok, Aksoy & Hasirci (2009). In this study, when temperature increased to 70°C, maximum activity decreased down to 12.2% for free laccase; to 29.6%, 62.5% and 64.7% for P(AAm-NIPA)/Alg-L, P(AAm-NIPA)-L and P(AAm)/Alg-L, respectively. Hence, the formulation increased the stabilization of ligninolytic enzymes by preventing them from inactivation.

3. 2 Physico-chemical analyses of different formulations

3. 2. 1 Particle size

The particle size analysis of all formulations formed by enzymes entrapped into P(AAm)/Pec, P(AAm)/Gel and P(AAm)/CMC) are presented in Fig. 8.4. The mean size of the particles of all formulations was between 7 and 800 µm. When the concentration of polymer was increased, particle size of the formulation increased due to the agglomeration of enzymes and polymer. Thus, particle size of the formulation containing pectin and gelatin was higher than the formulation containing CMC. The activities of the enzymes inside the hydrogels containing pectin and gelatin were higher than with the formulation containing CMC. Hence, when particle size of the formulation increased, enzyme stability increased. When particle size increased due to the agglomeration by polymer, enzyme will be well entrapped preventing its inactivation and increasing its thermal stability.

3. 2. 2 Viscosity

The viscosity of different liquid formulations formed by enzymes entrapped into P(AAm)/Pec, P(AAm)/Gel and P(AAm)/CMC were studied and are presented in Fig. 8. 5. The viscosities of all formulations were higher than the viscosity of free enzyme solution. This is due to the polymer addition in enzymes solution. When the polymer concentration changed (0.01%, 0.02%, 0.05% w/v), the viscosity of the formulation did not change. Viscosity of formulation did not change as stirring intensity and mixing were increased when the concentration of polymer increased to homogenize the formulations. However, the viscosities of the hydrogels containing pectin and CMC were higher than the viscosity of the formulation containing gelatin. The thermal stability of the formulation containing pectin was higher than the formulation containing gelatin and CMC, respectively. Hence, there is no significant difference ($p < 0.05$) between the viscosities of the different formulations and the concentration of various polymers did not have a significant effect ($p < 0.05$) on the viscosity of the formulations.

3. 2. 3 Zeta potential

The zeta potential of different liquid formulations formed by enzymes entrapped into P(AAm)/Pec, P(AAm)/Gel and P(AAm)/CMC was studied and is presented in Fig. 8. 6. There was no relationship between enzyme inactivation and zeta potential profile. However, zeta potential of all formulations except P(AAm)/Gel (0.02%) were higher than that of the free enzyme. This can be due to the polymer addition than can flocculate some protein present in enzyme solution and increase the zeta potential. It is well known that some biological polymers, such as gelatin have been used as flocculants in some agro-industries, such as juice industry. Clarification of apple juice with gelatin and bentonite is a common industrial practice (Benitez & Lozano, 2007). These fining agents work either by sticking to the particles, or by using charged ions to cause particles to stick to each other, in any case making them heavy enough to sink to the bottom by the action of gravity.

3. 3 Application of formulations in juice clarification

3. 3. 1 Polyphenolic compounds quantification

The content of total polyphenolics in the juice before and after enzyme treatment was determined and is presented in Fig. 8. 7. The different formulations of ligninolytic enzymes produced were used to treat berry pomegranate juice for 5 h at ambient

temperature. Polyphenolic compounds with relatively low molecular weights were found to be responsible for the physico-chemical deterioration of fruit juices during storage (Maier, Frei, Wucherpfennig, Dietrich & Ritter, 1994). Ligninolytic enzymes, especially laccase treatment was important in the removal of polyphenols, converting them into oligomers and polymers that were easily removed by membrane filtration or other separation means (Alper & Acar, 2004). In this case, separation was performed using centrifugation. Fig. 8.7 shows the effect of treatment by free ligninolytic enzymes and different formulations (ligninolytic enzymes entrapped into P(AAm)/Pec, P(AAm)/Gel and P(AAm)/CMC) with different polymer concentration (0.01, 0.02 and 0.05 % w/v) on polyphenols content of the berry pomegranate juice. The polyphenolic compound reduction using encapsulated enzymes treatment (more than 60% in all treatment) was more significant ($p > 0.05$) than using free enzymes (45 %). The most important reduction in polyphenol content was found using ligninolytic enzymes entrapped into P(AAm)/CMC (0.05 %) (81.5%) followed by enzymes entrapped into P(AAm)/Gel (0.02 %) (79%) and P(AAm)/ Pec (0.01 %) (73.6%) respectively. The enzymes entrapped into P(AAm)/CMC and enzymes entrapped into P(AAm)/Gel were more effective in the juice clarification than enzymes entrapped into P(AAm)/ Pec. This was due to the presence of carboxymethylcellulose and gelatin which are good flocculant agents (Benitez & Lozano, 2007, Hebeish, Higazy, El-Shafei & Sharaf, 2010) and hence would have increased the clarification of fruit juice.

The use of formulated enzymes increased its activities in juice clarification and polyphenols compounds elimination. The encapsulation prevents the inactivation of enzymes related to the presence of some compounds and conditions (such as pH, temperature) that affect the activity of these enzymes. The efficacy of polyphenolic compounds removal depended on the type of polymer contained in the hydrogel that can increase the flocculation of some particles and considerably ameliorate the polyphenolic compounds removal from berry pomegranate juice. The juice clarification by enzymes can be ameliorated by increasing the temperature that has a positive effect on the rate of enzymatic treatment for clarification process as the temperature is below the denaturation point.

3. 3. 2 Juice clarity study

The clarity and the color of the juice before and after enzyme treatment was determined and is presented in table 8.1. Clarified juice is a natural juice that is pulpless and does not have a cloudy appearance (Lieu Abdullah, Sulaiman, Aroua & Megat Mohd Noor, 2007). The phenolic compounds present in the raw fruit juices are responsible for the formation of cloudy appearance of juices during storage (Spanos & Wrolstad, 1992). Throughout the enzymatic treatment, ligninolytic enzymes catalyze the oxidation of juice phenols to o-quinones, which are highly reactive compounds. They undergo spontaneous polymerization to produce high molecular weight compounds (brown pigments) (Oszmianski & Lee, 1990). These compounds could be discarded by centrifugation, whereas low molecular weight phenols (oligomers) remain in the supernatant and can lead to brown and cloud juice characterized by high absorbance values at 420 and 650 nm, respectively. Berry pomegranate juice treated by formulated enzymes was clearer than the one treated by free enzymes. Hence, the formulation prevented the enzyme from inactivation, improved its stability and efficacy to clarify the juice.

In this study, it was shown that ligninolytic enzymes (LiP, MnP and laccase) are able to clarify successfully the juice and can replace the conventional ultrafiltration process in order to make the clarification process more economical for the juice manufacturing industries.

4. CONCLUSION

In view of the results obtained for ligninolytic enzymes (LiP, MnP and laccase) from *Phanerochaete chrysosporium* encapsulation into three hydrogel structures, namely semi-interpenetrating networks of poly(acrylamide)/ gelatin, P(AAm)/Gel poly(acrylamide)/pectin and poly(acrylamide) CMC P(AAm)/CMC and berry pomegranate juice treatment by enzymes formulations, following conclusions can be drawn:

- (1) All enzyme formulations were more stable than free enzymes at high temperature (60 and 75° C) and low temperature (4°C).
- (2) Ligninolytic enzymes entrapped into P(AAm)/Pec were better stable than the ligninolytic enzymes entrapped in tow other hydrogels. Pectin with polyacrylamide protects more ligninolytic enzymes from inactivation at higher temperatures.

(3) When particle size and viscosity of the formulation increased, enzyme stability increased. However, there was no clear relationship between the zeta potential of the formulation and enzyme activity.

(4) The most important reduction in polyphenol content was found while using ligninolytic enzymes entrapped into P(AAm)/CMC (0.05 %) (81.5%) followed by enzymes entrapped into P(AAm)/Gel (0.02 %) (79%) and P(AAm)/Pec (0.01 %) (73.6%), respectively.

(5) The use of formulated enzymes increased its activities in juice clarification and polyphenols compounds removal.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Grant 355254, Canada Research Chair), FQRNT (ENC 125216) MAPAQ (No. 809051) and Initiative Inde 2010 (MELS, Quebec) for financial support. The views or opinions expressed in this article are those of the authors.

ABBREVIATIONS

ATCC: American type culture collection

LiP: Lignin peroxidase

MnP: Manganese peroxidase

MPN: Most probable number

OD: Optical density

PDA: Potato dextrose agar

U/ml: Units per mL of medium

References

- Akiyoshi, K., & Sunamoto, J. (1996). Supramolecular assembly of hydrophobized polysaccharides. *Supramolecular Science*, 3, 157–163.
- Alper, N., & Acar, J. (2004). Removal of phenolic compounds in pomegranate juices using ultrafiltration and laccase-ultrafiltration combinations. *Nahrung*, 48, 184–187.
- Ayame, H., Morimoto, N., & Akiyoshi, K., (2008). Self-assembled cationic nanogels for intracellular protein delivery system. *Bioconjugate Chemistry*, 19, 882-890.
- Benitez, E. I., & Lozano, J. E. (2007). Effect of gelatine on apple juice turbidity. *Latin American Applied Research*. 37, 261-266.
- Borner, H. S.(2009). Strategies exploiting functions and self-assembly properties of bioconjugates for polymer and materials sciences. *Progress in Polymer Science*, 34, 811–851.
- Collins, P. J., & Dobson, A. D. W. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3444-3450.
- Demirel, G., Ozcetin, G., Sahin, F., Tunturk, H., Aksoy, S., & Hasirci, N. (2006). Semi-interpenetrating polymer networks (IPNs) for entrapment of glucose isomerase. *Reactive and Functional Polymers*, 66,389–94.
- Dodor, D. E., Hwang, H., & Ekunwe, S. I. N. (2004). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 210–217.
- Han, S. L., & Juan, H. (2000). Kinetics of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase: anomeric reactivity of d-glucose in kinetic model. *Journal of Biotechnology*, 84, 145–153.
- Hebeish, A., Higazy, A., El-Shafei, A., & Sharaf, S. (2010). Synthesis of carboxymethyl cellulose (CMC) and starch-based hybrids and their applications in flocculation and sizing. *Carbohydrate polymers*, 79, 60-69.
- Hublik, G., & Schinner, F. (2000). Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 330–336.
- Hu, X., Zhau, X. H., & wang, H. (2007). Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. *Chemosphere*, 66, 1618–26.
- Ikuta, Y., Katayama, N., Wang, L., Okugawa, T., Takahashi, Y., Schmitt, M., Gu, X., Watanabe, M., Akiyoshi, K., Nakamura, H., Kuribayashi, K., Sunamoto, J., & Shiku, H. (2002). Presentation of a major histocompatibility complex class 1-binding peptide by polysaccharide- truncated HER2 protein complex: implications for polyvalent immuno-cell therapy. *Blood*, 99, 3717–3724.

- Kabanov, A. V., & Vinogradov, S. V. (2009). Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 5418-5429.
- Kim, J., Grate, J. W., & Wang, P. (2008). Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends in Biotechnology*, 26, 639-646.
- Lieu Abdullah, A. G., Sulaiman, N. M., Aroua, M. K., & Megat Mohd Noor, M. J. (2007). Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering*, 81, 65-71.
- Maier, G., Frei, M., Wucherpfennig, K., Dietrich, H., & Ritter, G. (1994). Innovative processes for production of ultrafiltrated apple juices and concentrates. *Fruit Process*, 5, 134-138.
- Neifar, M., Elleouze-Ghorbel, R., Kamoun, A., Baklouti, S., Mokni, A., Jaouani, A., & Ellouze Chaabouni, S. (2011). Effective clarification of pomegranate juice using laccase treatment optimized by response surface methodology followed by ultrafiltration. *Journal of Food Process Engineering*, 34, 1199-1219.
- Nishikawa, T., Akiyoshi, K., & Sunamoto, J. (1994). Supermolecular assembly between nanoparticles of hydrophobized polysaccharide and soluble protein complexation between the self-aggregate of cholesterol-bearing pullulan and α -chymotrypsin. *Macromolecules*, 27, 7654-7659.
- Osznianski, J., & Lee, C. Y. (1990). Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38, 1202-1204.
- Sarnthima, R., Khammuang, S., & Svasti, J. (2009). Extracellular ligninolytic enzymes by *Lentinus polychrous* Lév. under solidstate fermentation of potential agro-industrial wastes and their effectiveness in decolorization of synthetic dyes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14, 513-522
- Sibert, K. J. (1999) Protein-polyphenol haze in beverages. *Food Technology*, 53, 54-57.
- Stutz, C. (1993). The use of enzymes in ultrafiltration. *Fruit Process*, 7, 248-252.
- Spanos, G. A., & Wrolstad RE (1992) Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage – a review. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40, 1478-1487.
- Swain, T. & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(1), 63-68.
- Tien, M., & Kirk, T. K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 2280-2284.
- Treethammathurot, B., Ovartharnporn, C., Wungsintaweekul, J., Duncan, R., & Wiwattanapatee, R. (2008). Effect of PEG molecular weight and linking

- chemistry on the biological activity and thermal stability of PEGylated trypsin. *International Journal of Pharmaceutics*, 357(1-2), 252-259.
- Tumturk, H., Demirel, G., Altinok, H., Aksoy, S., & Hasirci, N. (2008). Immobilization of glucose isomerase in surface modified alginate gel beads. *Journal of Food Biochemistry*, 32, 234-246.
- Xu, F. J., Chen, Z. H., & Li, Z. H. (2001). Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam exploded straw as substrate. *Bioresource Technology*, 80, 149-151.
- Yamak, O., Kalkan, N. A., Altinok, H., Aksoy, S., & Hasirci, N. (2009). Semi-interpenetrating polymer networks (semi-IPNs) for entrapment of laccase and their use in acid orange 52 decolorization. *Process Biochemistry*, 44, 440-445.
- Yuan, X., Harada, A., Yamasaki, Y., & Kataoka, K. (2005). Stabilization of lysozyme-incorporated polyion complex micelles by the omega-end derivatization of poly(ethylene glycol)-poly(alpha,beta-aspartic acid) block copolymers with hydrophobic groups. *Langmuir*, 21, 2668-2674.

Table 8. 1 Color and clarity studies during juice treatment by different ligninolytic enzymes formulations

	Polymer concentration	Pectin	Gelatin	CMC	Free enzyme
Clarity (OD 650 nm)	0.01%	0.66	1.07	0.87	
	0.02%	0.72	0.87	0.58	
	0.05%	0.65	1.6	0.49	1.91
Color (OD 420 nm)	0.01%	2.7	3.07	3.05	
	0.02%	2.91	2.57	2.98	
	0.05%	3.24	3.76	2.44	4.7

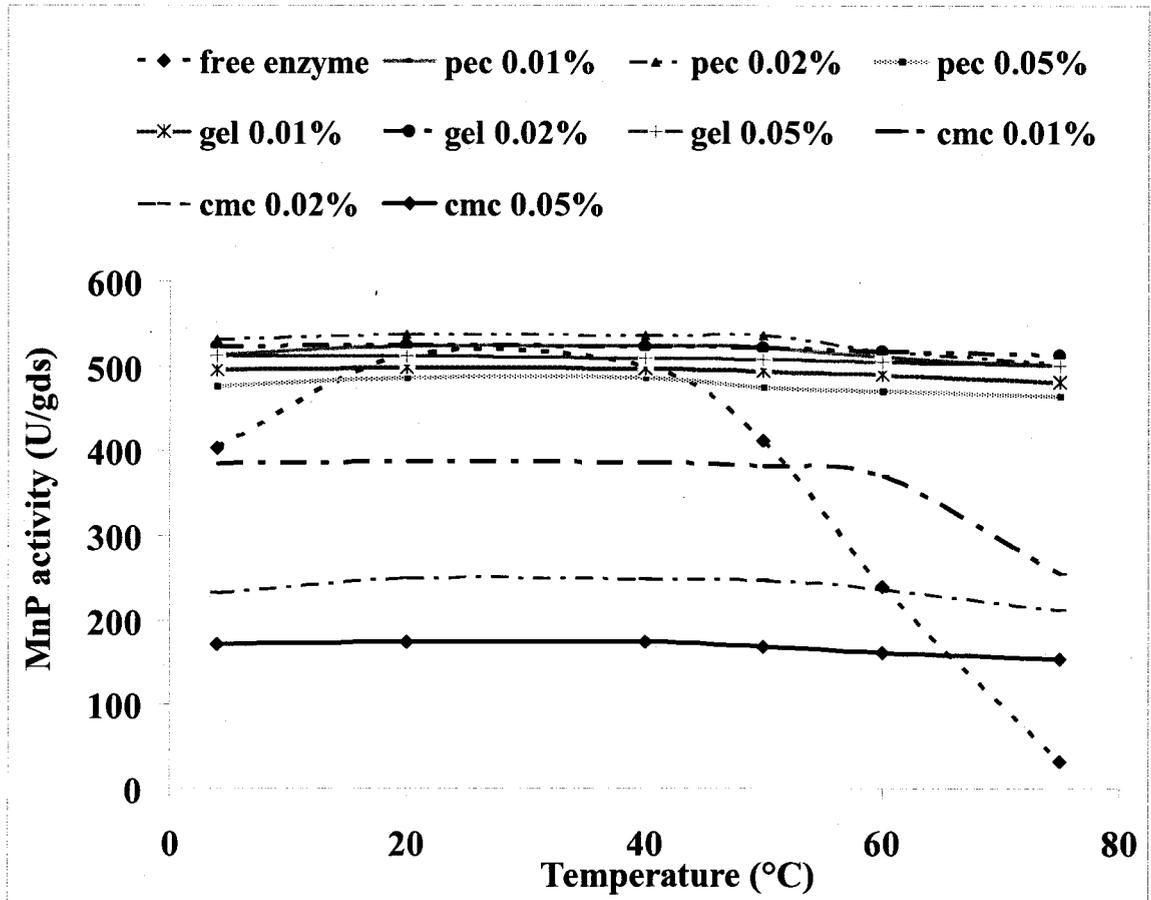


Figure 8. 1 Thermal stability of MnP inside different hydrogelformulations

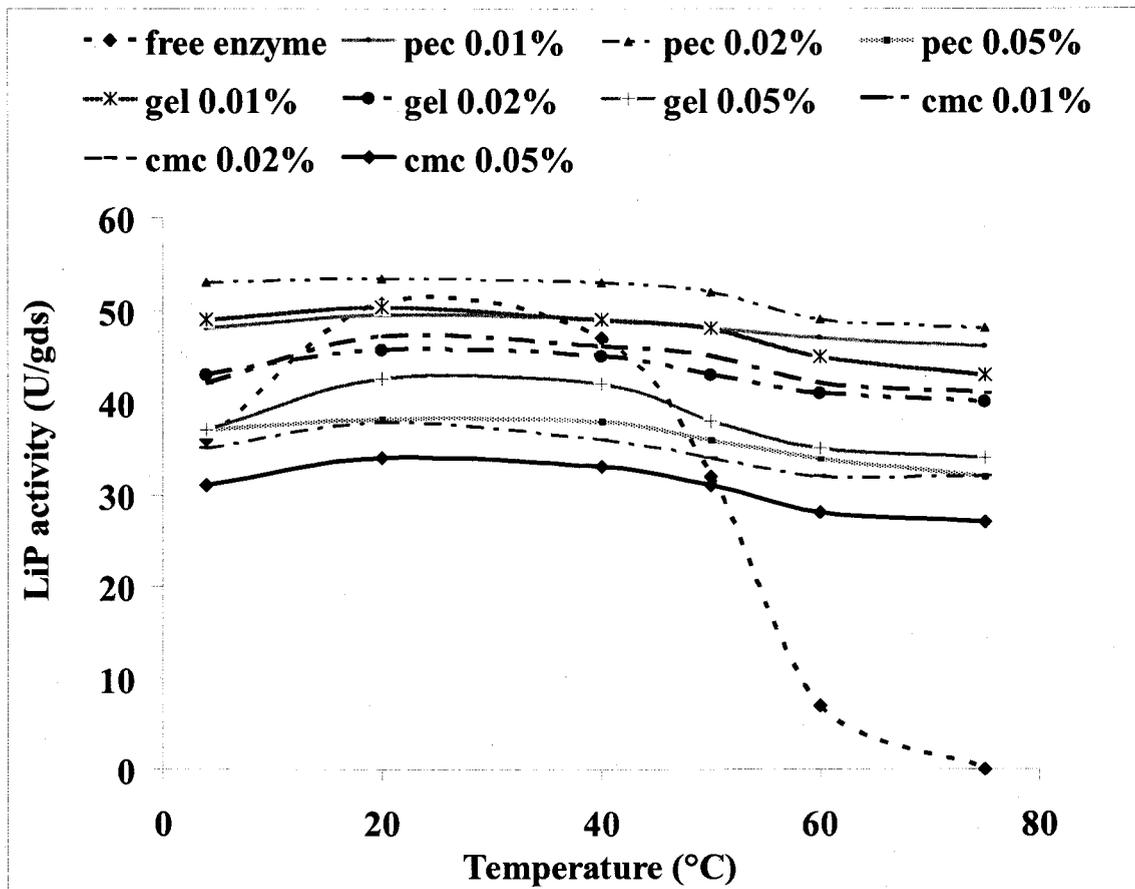


Figure 8. 2 Thermal stability of LiP inside different hydrogel formulations

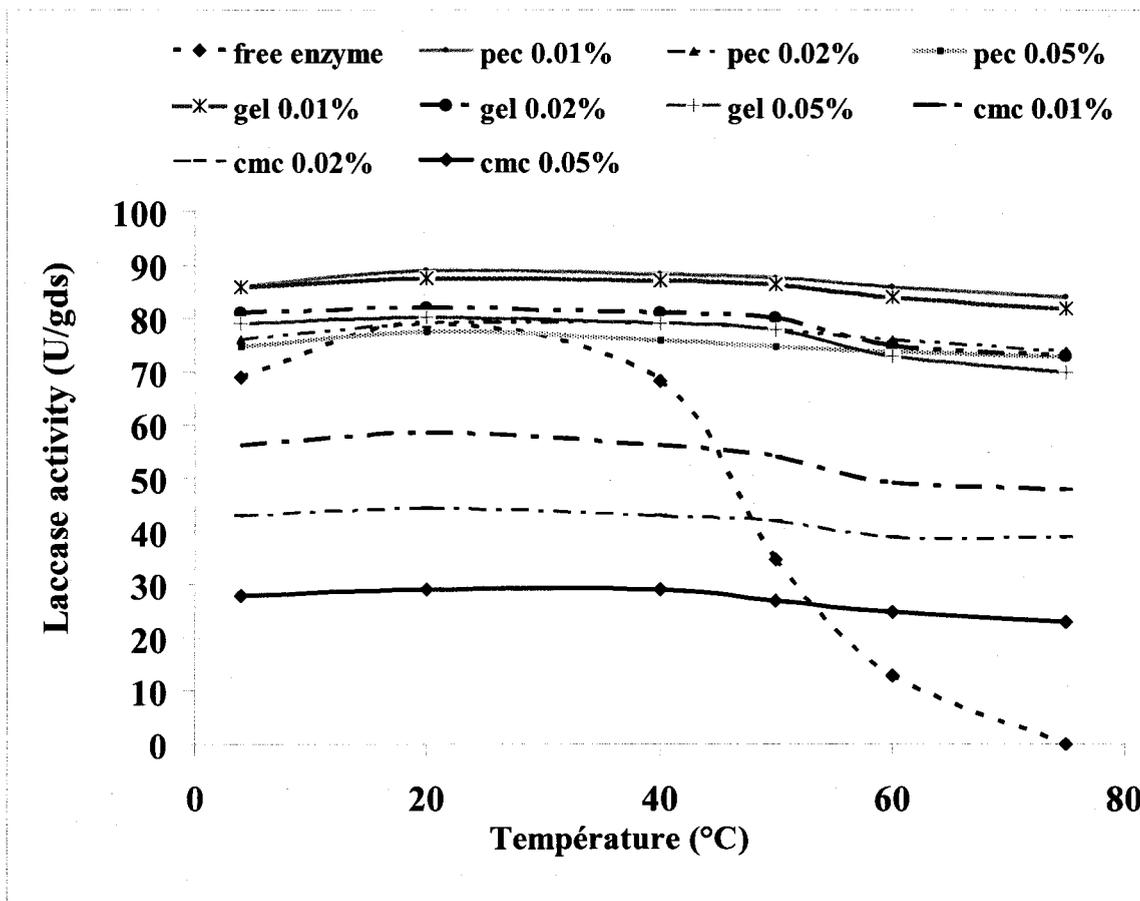


Figure 8. 3 Thermal stability of laccase inside different hydrogel formulations

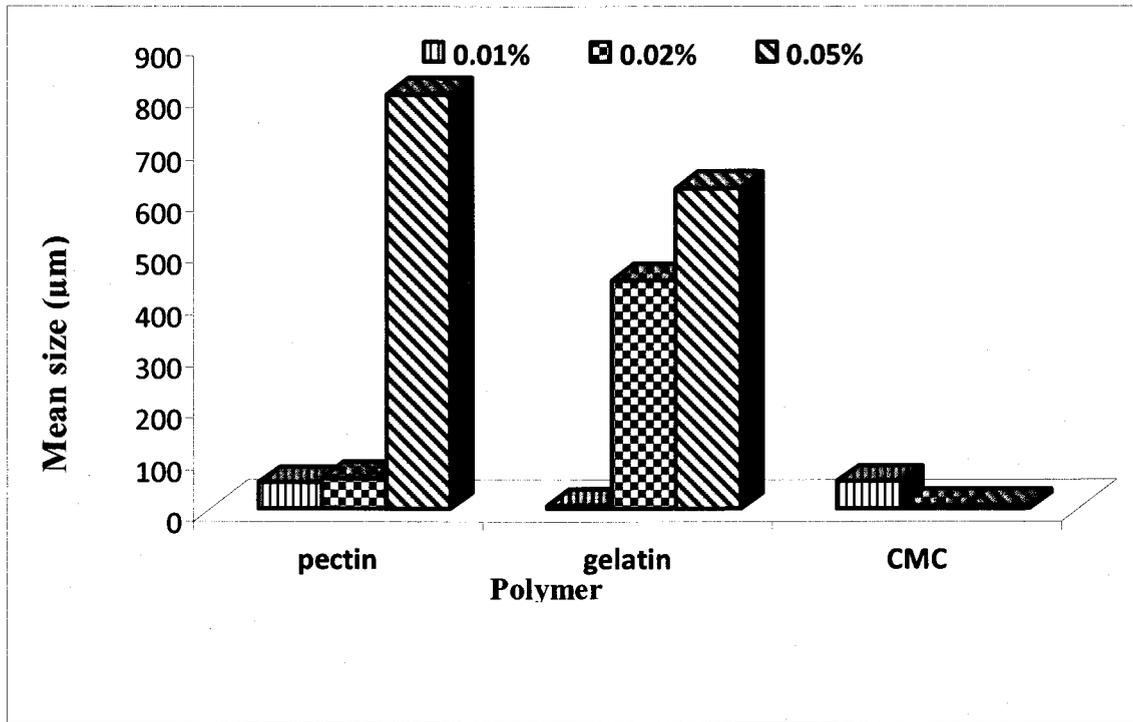


Figure 8. 4 Particle size analyses of the different hydrogel formulations

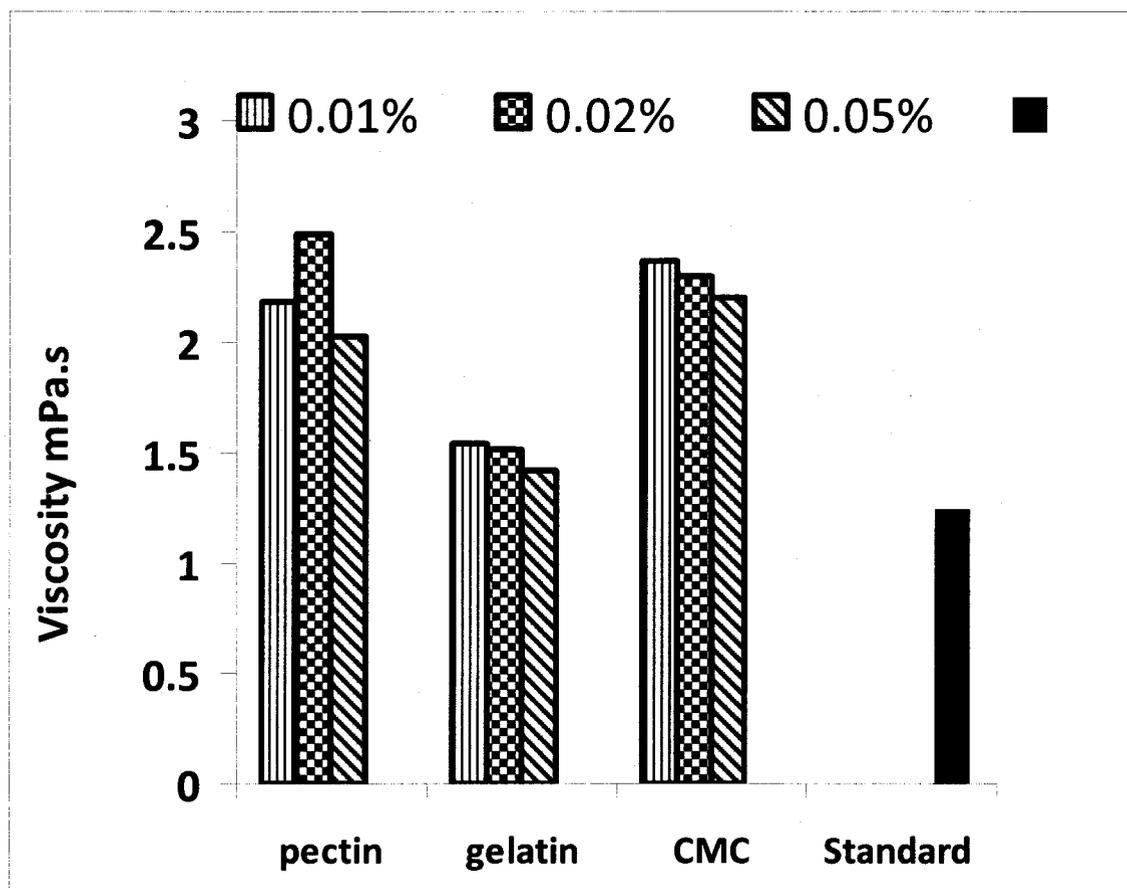


Figure 8. 5 Viscosity analyses of the different hydrogel formulations

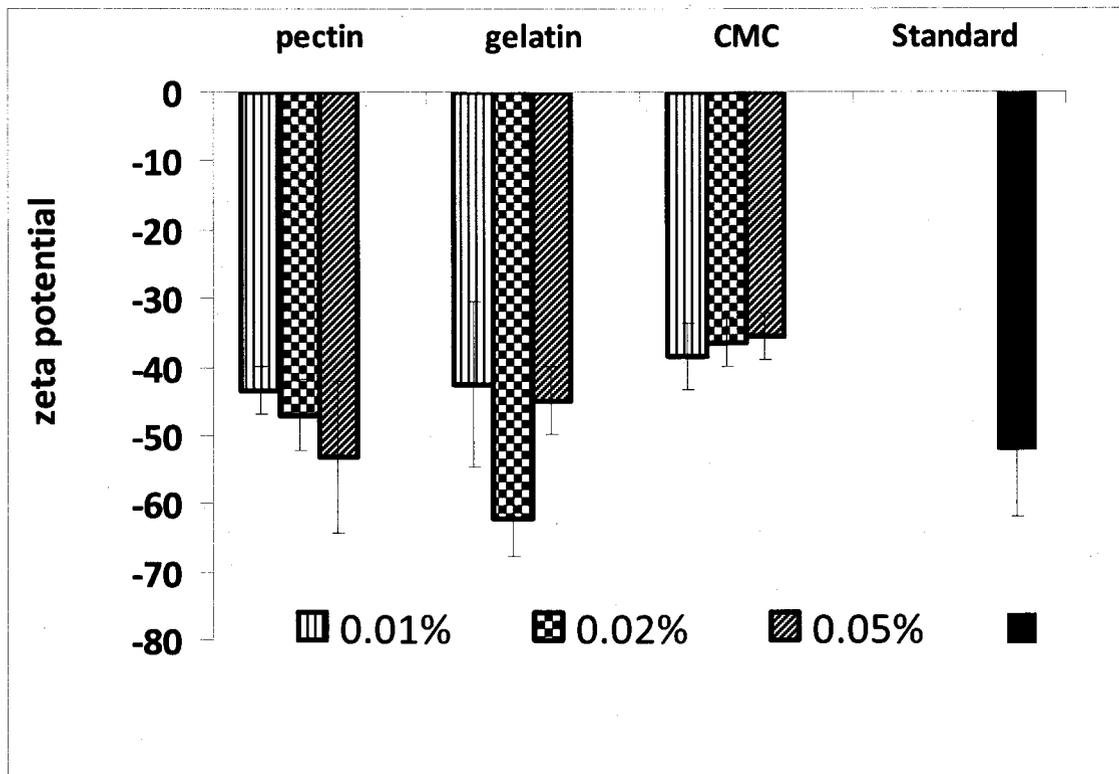


Figure 8. 6 Zeta potential analyses of different hydrogel formulations

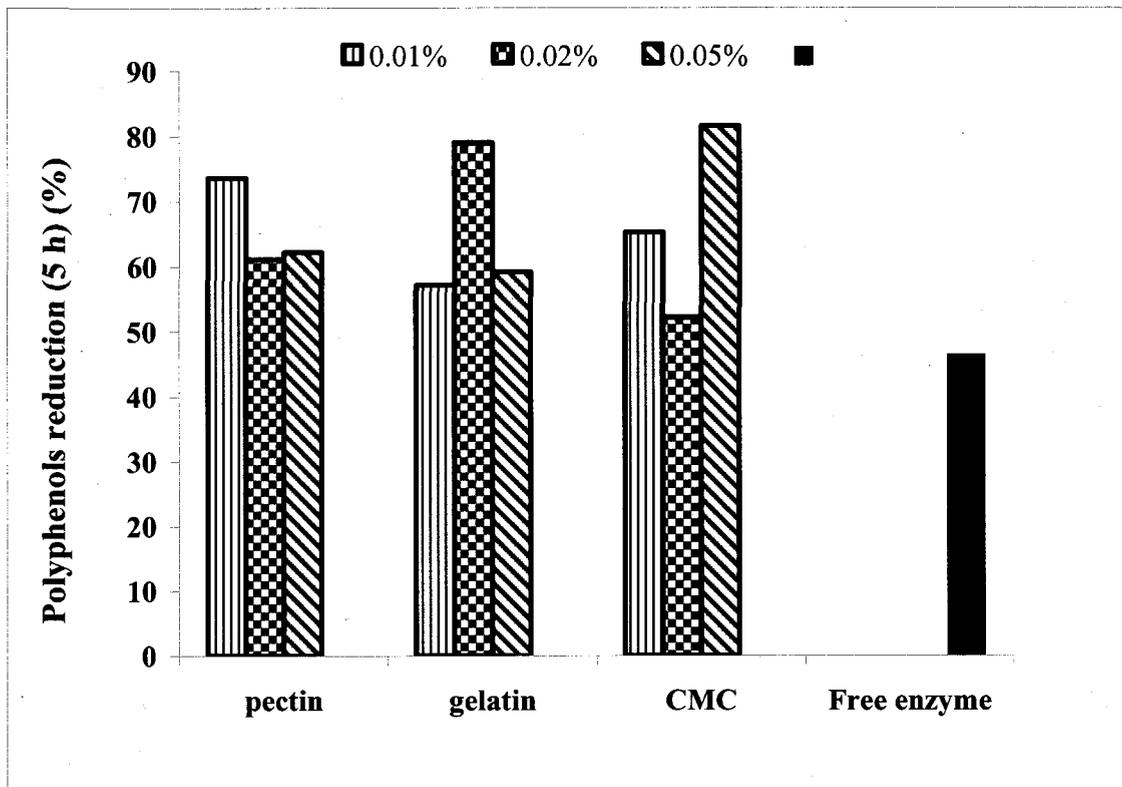


Figure 8. 7 Polyphenol reduction during juice treatment by different ligninolytic enzymes formulations



CHAPITRE V
PARTIE 2
BISPHENOL A DEGRADATION IN WATER BY
LIGNINOLYTIC ENZYMES

Fatma Gassara-Chatti, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, M. Verma

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

Bioresource Technology. Soumis

RÉSUMÉ

Plusieurs perturbateurs endocriniens, tels que bisphénol A (2,2-bis (4-hydroxyphényl) propane; BPA) sont utilisés aujourd'hui et libérés dans l'environnement à fortes doses. Les procédés actuels utilisés dans les stations de traitement des eaux usées sont incapables de dégrader BPA complètement. Une des alternatives possibles pour dégrader efficacement les perturbateurs endocriniens est basée sur l'utilisation de l'action oxydante des enzymes fongiques extracellulaires. Le but de ce travail est d'étudier la capacité des enzymes libres et formulées (MNP, LiP et la laccase) à dégrader BPA dans l'eau. Les résultats de cette étude ont montré une forte dégradation de BPA (90% de la concentration initiale de 10 ppm) après 8 h de traitement par des enzymes ligninolytiques encapsulées dans un hydrogel de polyacrylamide et pectine. La dégradation du BPA par les enzymes libres (26%) était inférieure à celle obtenue par des enzymes encapsulées. La présence de pectine dans la formulation des enzymes a amélioré de manière significative ($p > 0,05$) l'activité des enzymes pour dégrader ligninolytiques bisphénol A. L'étude de la cinétique de dégradation de BPA a montré que la vitesse maximale de dégradation V_m a augmenté considérablement, lorsque les enzymes ont été encapsulées. Cependant, la constante de Michaelis Menten K_m n'a pas été changée, après l'encapsulation des enzymes. Ainsi, l'encapsulation des enzymes les a protégées de l'inhibition non compétitive. Les sous-produits probables de la dégradation de BPA par les enzymes ligninolytiques détectés, avaient un poids moléculaire de 200,17 g / mol.

ABSTRACT

Many endocrine disruptors, such as bisphenol A (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane; BPA) are used today and released into the environment at low doses but they are barely degraded in wastewater treatment plants. One of the potential alternatives to effectively degrade endocrine disruptors is based on the use of the oxidative action of extracellular fungal enzymes. The aim of this work is to study the ability of free and formulated enzymes (MnP, LiP and laccase) to degrade Bisphenol A. Higher degradation of BPA (90 % of initial concentration of 10 ppm) by ligninolytic enzymes encapsulated on polyacrylamide hydrogel and pectin after 8 h was obtained. The degradation of bisphenol A with free enzyme (26%) was lower than the value obtained with encapsulated enzymes. The presence of pectin in enzymes formulation significantly ($p > 0.05$) enhanced the activity of ligninolytic enzymes to degrade bisphenol A. Kinetics study of BPA degradation showed that V_m increased considerably and K_m remained constant when enzymes were encapsulated. Hence, encapsulation protected the enzymes from non-competitive inhibition. The by-product of BPA degradation by ligninolytic enzyme possessed a weight of 200.17 g/mol.

1. INTRODUCTION

Phenolic compounds are one of the major classes of organic pollutants generated through various sources such as pesticides and phenol-containing products such as slimicides, plastics, disinfectants, antiseptics and medicinal preparations (De Araujo et al. 2006). Bisphenol A (BPA) is one of toxic organic compounds discharged to water and wastewater and must be removed. Conventional processes for removal of phenols from industrial wastewaters include extraction, adsorption on activated carbon, bacterial and chemical oxidation, electrochemical techniques, irradiation, etc. (Liu et al. 2002; Bratkovskaja et al. 2004). All of these methods suffer from serious shortcomings such as high costs, incompleteness of purification, formation of hazardous by-products, low efficiency and applicability to a limited concentration range (Liu et al. 2002; Regalado et al. 2004).

The degradation of toxic substances (endocrine disrupter compounds, EDCs) by enzymes has several advantages: high specificity to substrates, use on a wide range of environmental conditions, simplicity and ease of process control using enzymes (Ahuja et al., 2004; Gianfreda and Rao, 2004). However, the remediation methods using the enzymes has some limitations, such as higher cost of production and purification of enzymes and lower stability of these catalysts (Aitken and Heck, 1998). The higher production cost of enzymes is attributed to the substrates used to produce them (40-60% of production cost). It is well known that solid-state fermentation (SSF) is the most economical process for the production of ligninolytic enzymes by fungi (Iwashita, 2002). White rot fungi in wood are higher producers of ligninolytic enzymes which are essential for degradation of toxic organic compounds (Gianfreda and Rao, 2004, Lee et al., 2005). *Phanerochaete chrysosporium* is one among the most studied white rot fungi, which mainly produces manganese peroxidase and lignin peroxidase (Pandey et al., 2003). The ligninolytic enzymes, lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), and laccase. Due to the complex structure of lignin, its biodegradation system is considered highly non-specific. Ligninolytic enzymes, therefore, have attracted attention as possible degraders of environmental pollutants that structurally differ (Dec and Bollag, 1994). The usefulness of these enzymes in the environmental clean-up of EDCs through oxidative degradation has been reported. BPA is known as one of endocrine disruptors and has

an acute toxicity to aquatic organisms in the range of 1–10 µg/ml for freshwater and marine species (Staples, et al., 1998). BPA is a high-volume production chemical, with over 2 million metric tons global production in 2003 (Burrige, 2003). From 2003 to 2006, the global BPA consumption increased at an average annual rate of about 10 % and the demand for BPA is expected to grow at annual rate of 7–8% during 2006–2011 (SRI, 2007). BPA is widely used as a material for the production of epoxy resins, phenol resins, polycarbonates, polyacrylates, polyesters and lacquer coatings on food cans (Burrige, 2003). BPA was discharged to environment through a number of routes, including discharge of wastewater and washwater generated from BPA production facilities, discharge of effluent from wastewater treatment plant, leaching from consumer products containing BPA at hazardous waste landfill sites and others. In October 2008, the Government of Canada prohibited the importation, sale, and advertising of polycarbonate baby bottles that contain BPA (CDEH, 2008). Therefore, BPA must be removed from water before it can be used for domestic applications. The principal aim of this study was the degradation of BPA in contaminated water by encapsulated ligninolytic enzymes. Ligninolytic enzymes will be produced by solid state fermentation apple pomace waste by *P chrysosporium*. Ligninolytic enzymes will be extracted from fermented solid wastes and encapsulated in order to increase the stability of these enzymes. These enzymes will be used to treat the contaminated water (fortified with 10 ppm of BPA).

2. MATERIALS AND METHODS

2. 1 Solid state fermentation

Ligninolytic enzymes were produced using solid state fermentation of apple pomace by *Phanerochaete chrysosporium*. The fermentation was carried out in 12-L solid-state fermenter of rotating drum type, Terrafor (Infors HT, Switzerland). The sterilized medium containing 4.5 kg was transferred into the sterilized bioreactor in an aseptic condition. For the fermentation, apple pomace was treated with inducers, such as copper sulfate (2 mmol/ kg), veratryl alcohol (2 mmol/ kg), and Tween-80 (0.1% v/w), and pH was adjusted to 4.5. The inoculation was carried out using the spore suspension. The fermentation was carried out in a controlled environment at 37±1°C, rotating speed of 2 rpm and aeration rate of 2 vvm. After fermentation, the enzymes were extracted by centrifugation after adding 50 mM sodium-phosphate buffer (10/1 v/w) at pH 6.5.

2. 2 Enzymes formulation

Different formulations were produced. The polyacrylamide (PA) gel was suspended in phosphate buffer solution (pH 7.2) at different concentrations (0.1%, 0.2% and 0.5% w/v) with stirring. The suspensions were sonicated for 15 min at room temperature using a probe type sonicator (Sonifier 250, Branson Co., Ltd., CT, USA). After sonication, the suspensions were filtered through 0.45 μm (vinylidene fluoride) (PVDF) filters (Millex-HV, Millipore Co., Ltd., MA, USA) to obtain clear suspensions. The next step involved complexation between PA hydrogel and ligninolytic enzymes. An appropriate amount of ligninolytic enzyme solution was co-incubated for 1 h at 25 °C with hydrogel in phosphate buffer containing gelatin, carboxy methyl cellulose and pectin (6 mg/mL) and polyacrylamide (PA) hydrogel (5–6 mg/mL). The presence of a crosslinked polymer (gelatin, carboxy methyl cellulose and pectin) in the mixture of enzymes may lead to physical entrapment of the protein and impractically slow diffusion rates. The mixture was incubated for 1 h at 25 \pm 1 °C and PA nanogel-enzyme complex was obtained.

2. 3 Extraction of bisphenol from the matrix

To degrade BPA, enzymes encapsulated in hydrogel were added to contaminated water. When the contaminated water was treated with the encapsulated enzyme (polyacrylamide gel and polymer as pectin, gelatin and carboxy-methy-cellulose, the separation of BPA was not complete and the other contaminant present in the samples also suppressed the signal of BPA in LDTD chromatogram. In order to overcome the challenges of signal suppression, solid phase extraction (SPE) method was used for clean-up and pre-concentration of extract. Glass cartridges (OASIS HLB 5cc 200 mg LP) were fitted in to the vacuum manifold (Welch, USA) which was connected to a vacuum pump (Welch Rietschle Thomas, USA) to dispense samples through the cartridges. Cartridges were pre-conditioned by passing 7 mL of methanol and 3 mL of water at a flow rate of 1 mL/min. Water extract (100 mL) was passed at a flow rate of 5 mL/min. After pre-concentration, the sorbents were dried by using a vacuum system set at (- 15) psi. The elution was performed by adding 2.4 mL of methanol/dichloromethane (3:1, v/v) mixture to the cartridge at a flow rate of 1mL min⁻¹ and giving it a wait time of 10 min in order to give enough duration of contact between the solvent and the adsorbed compounds. The extracts were later evaporated to dryness with a gentle stream of

nitrogen and reconstituted with methanol to a final volume of 1 mL prior to LDTD–APCI analysis.

2. 4 Bisphenol A degradation and quantification in water

The degradation of BPA was carried out at $25\pm 1^\circ\text{C}$ with agitation (100 rpm). In all treatments, BPA was degraded by 60 U/L of MnP, 50 U/L of laccase and 5 U/L of LiP. After extraction of enzymes from solid substrates, ligninolytic enzyme activities in the extract were measured (Tien and Kirk 1984; Collins and Dobson, 1997; Xu et al, 2001), The enzyme extract was diluted to obtain the enzyme activities used in this study.

Laser diode thermal desorption (LDTD) is a new approach to analyze emerging contaminants, such as BPA, where the entire sample is introduced in the mass spectrometer by a rapid laser thermal desorption process and is ionized by atmospheric pressure chemical reactions (LDTD–APCI). LDTD combines the ultra-fast thermal desorption of a dry sample with the ionization of the produced neutral molecules in the gas phase without solvent, mobile phase or external matrix. A low sample size thermal desorption and APCI in “dry” environment provides LDTD its tremendous analytical speed and analytical performance. LDTD ion source works with less than 10 μL of sample (typically 2 μL) and it has the option of simultaneous analysis of 96 samples. The analytical method is in agreement with the environmental concentrations as low as ng kg^{-1} . Quantification of BPA was performed by the internal standard method based on peak areas and relative retention time using BPA d16 as internal standard. Working standard BPA solutions of 0.05–20 $\mu\text{g/ml}$ were prepared by diluting aliquots of the stock solution (10 $\mu\text{g/ml}$) in methanol. About 2 μl volume of the standard BPA solution was injected into the LDTD–APCI system. Calibration curves for concentrations (0.05–20 $\mu\text{g/ml}$) were obtained from a linear regression program. The correlation coefficients of peak height to concentration was >0.998 .

2. 5 Statistical Analysis

All the experiments were assayed in 3 replicates, and an average of replicates was calculated along with the standard deviation. Database was subjected to an analysis of variance (ANOVA). One-way ANOVA followed by student's t-test was used to determine significant differences among treatment groups. For all analysis, differences were considered to be significant at $P < 0.05$ (Gassara et al., 2010).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3. 1 Bisphenol A degradation by ligninolytic enzymes

Enzymes were produced by solid-state fermentation of apple pomace and the encapsulation in different hydrogels containing polyacrylamide and gelatine, pectin or carboxymethyl cellulose was carried out. The degradation of BPA by free and encapsulated ligninolytic enzymes was studied and is presented in Figure 9. 1. The ligninolytic enzymes were able to remove BPA from water. When the incubation duration increased, the degradation of BPA increased in all enzyme tests. The maximal degradation of BPA with free enzyme, hydrogel containing pectin, gelatin and CMC were 26 %, 90, 87, 86%, respectively. Higher degradation of BPA was obtained after 8 h of incubation with encapsulated enzymes in hydrogel of polyacrylamide and pectin. Lower degradation of BPA was obtained using free enzyme. The encapsulation of enzyme increased the enzymatic activity and protected them from inactivation by substrate and by-products of degradation. The presence of pectin in enzyme formulation significantly ($p > 0.05$) enhanced the activity of ligninolytic enzymes to degrade BPA. Pectin is the best polymer that protects ligninolytic enzymes from inactivation by covering the catalytic sites of enzymes when it was added to polyacrylamide gel. The results were in agreement with literature studies that showed that the stabilization of ligninolytic enzymes by the addition of stabilizer products, such as polyethylene glycol (PEG) and Ficoll (Modaressi et al. 2005; Kim et Nicell. 2006c) increased the activity of degradation of BPA. The immobilization of enzyme also increased the activity of ligninolytic enzymes to degrade BPA (Diano et al 2007). In fact, immobilization of enzymes on fixed support is an effective solution to the problem of inhibition enzymes and their low stability (Diano et al 2007, Cabana et al., 2007 b). However, this process presents some problems, such as difficulty of enzyme diffusion through gels, steric problems, misdirected enzyme and loss of activity (adsorption), change in structure of the enzyme and loss of activity and unable to predict the performance of grafting. In addition, enzymes immobilization requires the addition of a support, which increases the cost of production of the enzyme and makes it difficult to reuse. At this juncture, encapsulation could be a good solution to stabilize the enzyme and increase their activity. This type of entrapment offers a high surface area per unit volume, thus increasing the efficiency of the enzymes to degrade BPA. In addition, when enzymes are encapsulated, there will be less effect of substrates on stability due to the slow discharge of enzymes that minimize their exposure to

detrimental environmental conditions. Moreover, the micro-encapsulation provided minimizes of cost of formulation additives and maximize the enzyme activity.

3. 2 K_m and V_m determination

In order to express the disappearance rate of BPA by ligninolytic enzymes, Michaelis Menten equation (1) was used:

$$V = \frac{V_m * S}{K_m + S} \quad (1)$$

Where, V , V_m , K_m and S represent reaction rate, maximum reaction rate, Michaelis constant and substrate concentration, respectively. Linweaver-Burk plots between rates, V and BPA concentrations, S using different treatments with free and encapsulated enzymes were carried out and are presented in Figure 9. 2.

Straight correlations between $1/V$ and $1/S$ were confirmed in all the treatment of BPA by free enzyme and the different formulation and V_m and K_m were determined directly from Fig 9.2. The values of $1/K_m$ were 0.096, 0.075, 0.064 and 0.91 (ppm^{-1}) in the treatment by free enzymes, pectin encapsulation, CMC encapsulation and gelatin encapsulation, respectively. The values of $1/V_m$ were 22.7, 0.89, 0.86, 0.96 in treatment by free enzymes, pectin encapsulation, CMC encapsulation and gelatin encapsulation, respectively. When enzymes were encapsulated, $1/V_m$ decreased and V_m increased. This was due to the inactivation of free enzyme that will decrease the rate of degradation of BPA. There was no difference between K_m of the reactions carried out by free enzymes, pectin encapsulation and CMC encapsulation. According to the study of Michaelis Menten, when V_m decreased and K_m was constant, the mechanism of inhibition is non-competitive. Hence, the encapsulation of ligninolytic enzymes protected them from inactivation by non-competitive inhibitor. The half-life of BPA using free enzyme, hydrogel containing pectin, hydrogel containing gelatin and hydrogel containing CMC were 19.8 h, 1.4 h, 2.3 h and 1.8 h, respectively. These results were in agreement with the results of final degradation that showed that the encapsulation of enzyme increased the enzymatic activity and the presence of pectin in enzyme formulation significantly ($p > 0.05$) enhanced the activity of ligninolytic enzymes to degrade BPA.

3. 3 By-products of bisphenol A by ligninolytic enzymes

When the degradation of BPA was investigated by ligninolytic enzymes, there was formation of one predominant product as seen in Figure 9. 3. The by-product weight was 200.18 g/mol. Earlier studies have investigated the degradation of BPA by ligninolytic enzymes, such as laccase (Huang and Weber, 2005) and MnP (Sakurai et al. 2001) and the possible pathway of degradation of BPA by these enzymes. This study demonstrated that the final by-product was 4,5 bisphenol-o-quinone (PM = 242 g/mole). In this pathway of degradation, there was no by-product with molecular weight of 200.1758 g/mol. Huang and Weber (2005) showed that the final by-products of degradation of BPA by laccase were 4-isopropenyl phenol and 4-isopropyl phenol, however this by-product was not present in the degradation pathway of BPA. Some probable compound names were derived from Spectral Database for Organic Compounds (SDBS), such as 2,2-methylenediphenol ($C_{13}H_{12}O_2$), Bis(4-hydroxyphenyl)methane ($C_{13}H_{12}O_2$, biphenol F) and p-(benzyloxy)phenol ($C_{13}H_{12}O_2$). A possible pathway of BPA degradation by encapsulated ligninolytic enzymes is given in figure 9. 4. According to the partial products, the possible pathway of degradation BPA will lead to complete mineralization to water and carbon dioxide. Further study is required to identify the chemical structure of by-products and prove the complete mineralization of BPA using enzymes.

4. CONCLUSION

In view of the results obtained for BPA degradation by free and encapsulated ligninolytic enzymes produced by solid-state fermentation of apple pomace by *P. chrysosporium*, following conclusions can be drawn:

- (1) The maximal degradation of BPA with free enzyme, hydrogel containing pectin, gelatin and CMC were 26%, 90, 87, 86%, respectively.
- (2) The presence of pectin in enzymes formulation significantly ($p > 0.05$) enhanced the activity of ligninolytic enzymes to degrade BPA.
- (3) The encapsulation stabilized the enzymes and protected them from inactivation by non-competitive inhibitor.
- (4) The by-product of BPA degradation obtained after analysis by LDTD-APCI possessed a molecular weight of 200.1758 g/mol with probable names of 2,2-

methylenediphenol ($C_{13}H_{12}O_2$) Bis(4- hydroxyphenyl)methane ($C_{13}H_{12}O_2$), 4-
benzylresorcinol and/or p-(benzyloxy)phenol($C_{13}H_{12}O_2$).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Grant 355254, Canada Research Chair), FQRNT (ENC 125216), MAPAQ (No. 809051) and Initiative Inde 2010 (MELS) for financial support. The views or opinions expressed in this article are those of the authors.

REFERENCES

- Ahuja, S.K., Ferreira, G.M., Moreira, A.R., 2004. Utilization of enzymes for environmental applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 24, 125-154.
- Aitken, M.D., Heck, P.E., 1998. Turnover capacity of *Coprinus cinereus* peroxidase for phenol and monosubstituted phenols. *Biotechnol. Progr.* 14, 487-492.
- Bratkovskaja, I., Vidziunaite, R., Kulys, J., 2004. Oxidation of phenolic compounds by peroxidase in the presence of soluble polymers. *Biochemistry (Moscow)*. 69,985-992.
- Burridge, E., 2003. Bisphenol A: product profile. *Eur. Chem. News*.78 14-20.
- Cabana, H., Jones, J.P., Agathos, S.A., 2007b. Elimination of endocrine disrupting chemicals using lignin modifying enzymes from white rot fungi: a review. *Eng. Life Sci.* 7, 429-456.
- Canadian Department of the Environment and Health, 2008. Publication of Final Decision on the Screening Assessment of a Substance—Phenol, 4,4'-(1-methylethylidene)bis-(bisphenol A), *Canada Gazette*, 142.
- Collins, P.J., Dobson, A.D.W., 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3444-3450.
- de Araujo, B.S., Dec, J., Bollag, J.M., Pletsch, M., 2006. Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Chemosphere* 63,642-651.
- Dec, J. Bollag, J.M., 1994. Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnol. Bioeng.* 44,1132-1139.
- Diano, N., Grano, V., Fraconte, L., Caputo, P., Ricupito, A., Attanasio, A., 2007. Nonisothermal bioreactors in enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors: BPA as a model of pollutant. *Appl. Catal. B-Environ.* 69, 252-261.
- Gassara, F., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Verma, M., Surampalli, R.Y., 2010. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerocheate chrysosporium*. *Biochem. Eng. J.* 49, 388-394.
- Gianfreda, L., Rao, M.A., 2004. Potential of extracellular enzymes in remediation: a review. *Enzyme. Microb. Technol.* 35, 339-354.
- Huang, Q., Weber, J.W., 2005. Transformation and removal of bisphenol A from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling reactions: efficacy, products, and pathways. *Environ.Sci. Technol.* 39(16), 6029-6036.
- Iwashita, K., 2002. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi, *J. Biosci. Bioeng.* 94, 530-535.
- Kim, Y.J., Nicell, J.A. 2006. Laccase-catalyzed oxidation of bisphenol A with the aid of additives. *Process. Biochem.* 41(5), 1029-1037

- Lee, H.B., Peart, T.E., Svoboda, M.L., 2005. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1094, 22-129.
- Liu, J.Z., Song, H.Y., Weng, L.P., Ji, L.N., 2002. Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 18:225–232
- Modaressi, K., Taylor, K.E., Bewtra, J.K., Biswas, N., 2005. Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: Protective effect of PEG on enzyme activity. *Water Res.* 39(18), 4309–4316.
- Pandey, A., 2003. Solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 81-84.
- Sakurai, A., Toyoda, S., Sakakibara, M., 2001. Removal of bisphenol A by polymerization and precipitation method using *Coprinus cinereus* peroxidase. *Biotechnol. Lett.* 23(12), 995– 998.
- Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T., Hariis, L.R., 1998. , "A Review of the Environmental Fate, Effects and Exposures of Bisphenol A, *Chemosphere.* 36, 2149-2173.
- SRI, 2007. Chemical Economics Handbook—Bisphenol A.
- Regalado, C., Garcia-Almendarez, B.E., Duarte-Vazquez, M.A., 2004. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem. Rev.* 3, 243–256.
- Tien, M., Kirk, T.K., 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 81, 2280-2284.
- Xu, F.J., Chen, Z.H., Li, Z.H., 2001. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam exploded straw as substrate. *Biores. Technol.* 80, 149-151.

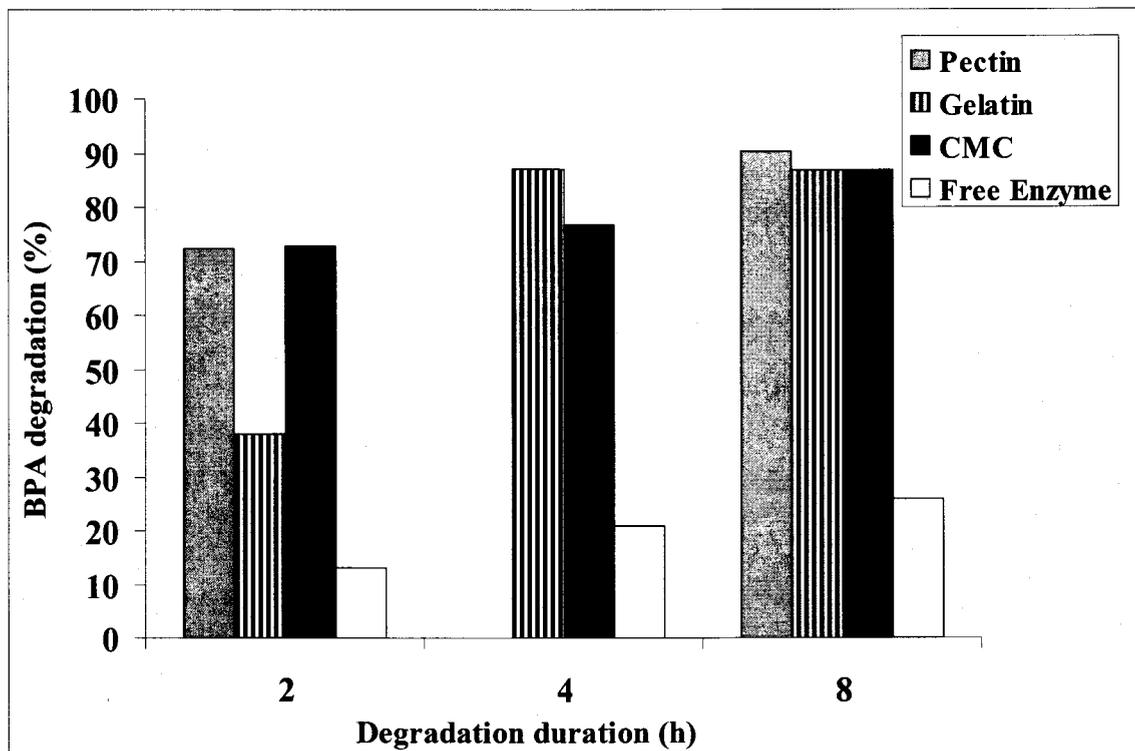


Figure 9. 1 BPA degradation in water by free and encapsulated ligninolytic enzymes

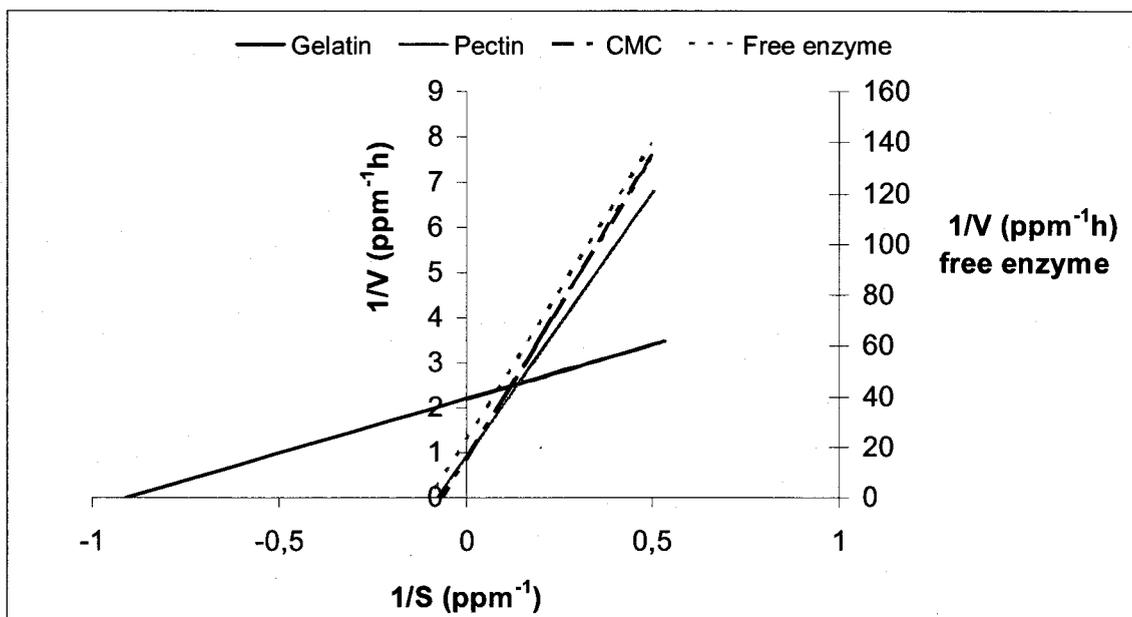


Figure 9. 2 Linweaver-Burk plots between rates, V and Bisphenol A concentrations, S using different treatments with free and encapsulated enzymes

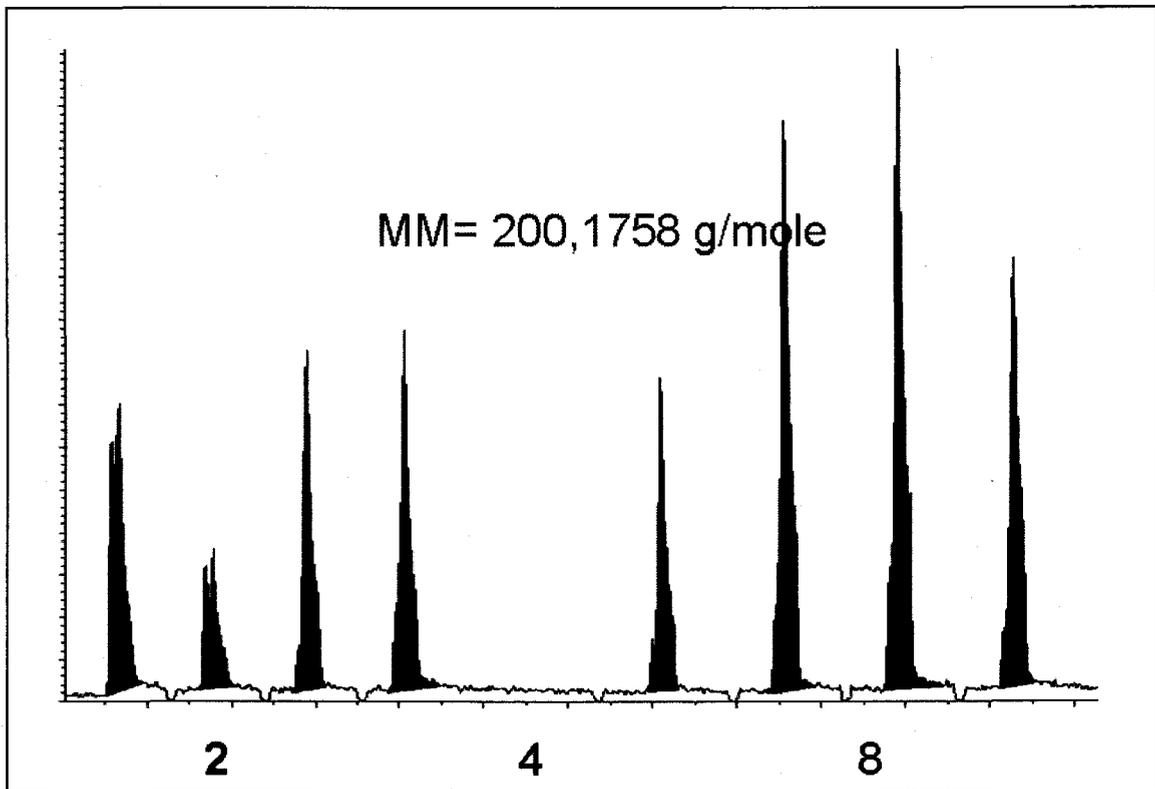


Figure 9. 3 By-products of BPA degradation by ligninolytic enzymes

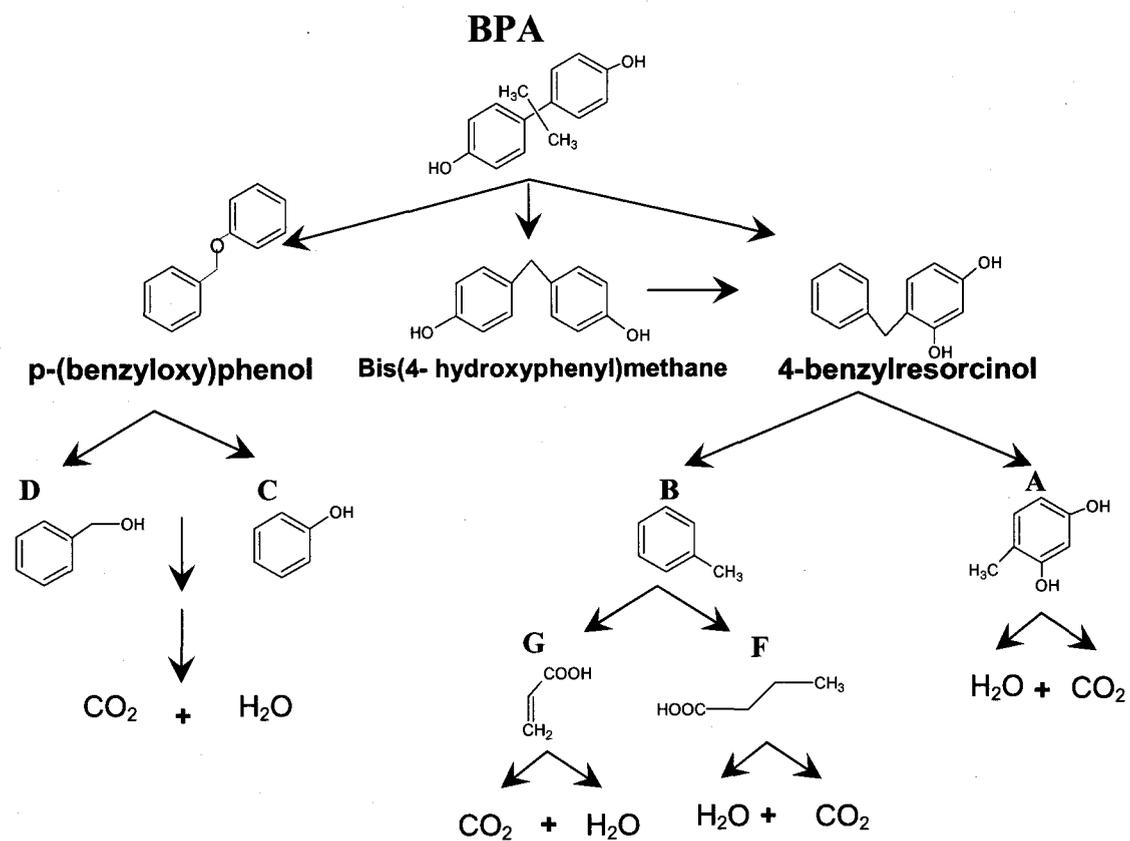


Figure 9. 4 Possible pathways of degradation of Bisphenol A

With A=4 methylbenzene 1,3 diol, B= toluene, C= phenol, D=(hydroxymethyl)benzene, F= butanoic acid, G= 2-propenoic acid



CHAPITRE VI
PARTIE 1
POMACE WASTE MANAGEMENT SCENARIOS IN
QUÉBEC – IMPACT ON GREENHOUSE GAS EMISSIONS

Fatma Gassara, S. K. Brar, F. Pelletier, M. Verma, S. Godbout, R.D. Tyagi

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

Journal of Hazardous Materials 192, (2011) 935-1908.

Publié



RÉSUMÉ

Les industries de transformation des fruits génèrent des quantités énormes de déchets solides qui représentent 35 à 40% du poids sec du total des fruits. Les déchets solides générés de la transformation des pommes en jus, nommés (Apple pomace) possèdent une humidité élevée (70-75%) et charge organique biodégradable élevée (valeurs de DBO et DCO élevées). Pour cette raison, ces déchets doivent être gérés convenablement. Au cours de la gestion de ces déchets par les différentes stratégies comprenant, l'incinération, l'enfouissement, le compostage et la fermentation solide pour produire des enzymes et l'alimentation animale, il ya une émission de gaz à effet de serre (GES) qui doit être prise en compte. Dans cette perspective, cette étude est la première, qui traite de l'analyse des émissions de GES au cours de la gestion des déchets agro-industriels (en particulier des déchets solides de jus de pomme) par différentes stratégies de gestion des déchets. De plus, les répercussions de la valorisation de ces déchets en enzymes sur l'environnement ont été étudiées en utilisant la méthode de l'analyse du cycle de vie (ACV). Les résultats de l'analyse indiquent que, parmi toutes les stratégies de gestion des déchets solides de jus de pomme, la fermentation à l'état solide pour produire des enzymes a été la méthode la plus efficace pour réduire les émissions de GES (906,81 tonnes de CO₂ éq. Par an). Par contre, l'enfouissement de ces déchets a entraîné une hausse des émissions de GES (1841 tonnes de CO₂ équivalent par an). Les résultats de cette étude encouragent l'utilisation de la fermentation, pour gérer les déchets solides de jus de pomme et d'autres déchets agricoles, particulièrement au Québec et également dans d'autres pays. Les valeurs des différents paramètres utilisés dans cette étude ont été tirées de diverses approches analytiques et sources de données. Comme certaines données sont absentes dans la littérature, certaines hypothèses ont été posées afin de calculer les émissions de GES. Ainsi, des études complémentaires expérimentales seront très utiles pour calculer les coefficients d'émissions de GES durant la gestion des déchets agro-industriels.

Mots-clés : gaz à effet de serre, apple pomace, enzymes, incinération, compostage

ABSTRACT

Fruit processing industries generate tremendous amount of solid wastes which is almost 35-40% dry weight of the total produce used for the manufacturing of juices. These solid wastes, referred to as, "pomace" contain high moisture content (70-75%) and biodegradable organic load (high BOD and COD values) so that their management is an important issue. During the management of these pomace wastes by different strategies comprising incineration, landfill, composting, solid-state fermentation to produce high-value enzymes and animal feed, there is production of greenhouse gases (GHG) which must be taken into account. In this perspective, this study is unique that discusses the GHG emission analysis of agro-industrial waste management strategies, especially apple pomace waste management and repercussions of value-addition of these wastes in terms of their sustainability using life cycle assessment (LCA) model. The results of the analysis indicated that, among all the apple pomace management sub-models for a functional unit, solid-state fermentation to produce enzymes was the most effective method for reducing GHG emissions (906.81 tons CO₂ eq. per year), while apple pomace landfill resulted in higher GHG emissions (1841.00 tons CO₂ eq. per year). The assessment and inventory of GHG emissions during solid-state fermentation gave positive indications of environmental sustainability for the use of this strategy to manage apple pomace and other agricultural wastes, particularly in Quebec and also extended to other countries. The analysis and use of parameters in this study were drawn from various analytical approaches and data sources. There was absence of some data in literature which led to consideration of some assumptions in order to calculate GHG emissions. Hence, supplementary experimental studies will be very important to calculate the GHG emissions coefficients during agro-industrial waste management.

Keywords: greenhouse gases, apple pomace, enzyme, incineration, composting

I. INTRODUCTION

Agro-food industries generate large quantities of liquid and solid wastes which must be suitably managed before being directly discharged to the environment. In Canada, the majority of fruit processing industries are concentrated in Quebec (about 35 % contribution), Southern Ontario, and British Columbia [1]. One third of the total apple production in Canada (449,190 ton/year, 20% contributed by Quebec) is processed to produce juices, flavors and concentrates [2]. The end result of an apple processing industry is a solid residue containing high moisture content (70%-75%) and biodegradable organic load (high BOD and COD values) [3]. These wastes have low nutritional value and their high biodegradability causes environmental problems. A typical apple processing industry generates 30-40% apple pomace and 5-11% sludge (liquid waste obtained after clarification). There are large quantities of solid wastes (apple pomace) produced round the world, including 16200 tons in 2007 in Québec [1]. Apple pomace waste produced in Quebec was selected as the case study. These solid wastes being highly biodegradable, their disposal represents a serious environmental problem and presents many challenges [4, 5]. In Quebec, this waste is mainly used as a source of crude animal feed by the farmers. Often only 20% is retrieved as animal feed and the rest 80% goes to landfill or composting sites which results in release of enormous quantity of greenhouse gases. Composting Council of Canada reported about 38% of Canada's methane emissions coming from organics decomposition in landfills [6]. Other modes of management of apple pomace comprise landfilling, composting, incineration and the innovative option of utilization of the apple pomace as a sole raw material for production of high value-added products, such as enzymes, organic acids, ethanol, among other products. In fact, the option of high value-added products formation by solid-state fermentation has been tested as a resourceful option in our laboratory as it is able to generate new bio-products and at the same time result in value-addition and management of the wastes [7]. Apple pomace studied in this work has been procured from a reputed juice transformation industry in Quebec. The distance between this industry and management sites was considered to be 25, 200, 100 and 200 km in the case of landfill, incineration, composting, and enzyme production, respectively. Meanwhile, in the case of animal feed, 20% of farmers were situated at 80 km distance from the apple juice industry and 80% of farmers were situated at 50 km from the juice industry.

The management of wastes is a significant source of GHGs [8]. The contribution of the waste management and disposal sector amounts to 4% of the various anthropogenic GHG emissions [9]. Various stages of the management of solid wastes including, collection, transportation, and disposal is generally followed by the release of GHG gases, such as carbon dioxide, methane, and N₂O. These gaseous components by virtue of their physical properties contribute to the GHG effect. Meanwhile, the increase in the concentration of these gases contributes to the global warming phenomenon.

In fact, there are various means to manage domestic or industrial wastes, where by the GHG emissions vary according to the consumption of energy, transportation, and technologies used for the process management [10]. To quantify The GHG emissions during waste management by different strategies, the best way is to conduct a comparative analysis through streamlined application of life-cycle assessment (LCA) model [11]. LCA is an analytical framework for understanding the material inputs, energy inputs, and environmental releases associated with manufacturing, usage, and disposal of a given material [11].

Many studies on environmental performance, especially with regard to GHG emissions, of various waste management strategies have been implemented for most developed countries and some developing countries [12, 13, 14]. To the best of our knowledge, there is no study reported till date which discusses the GHG emission analysis of agro-industrial waste management strategies, especially apple pomace waste management. The assessment and inventory of GHG emissions during solid-state fermentation was carried out for the first time in this study to evaluate the repercussions of value-addition of these wastes in terms of environmental sustainability. In the present study, LCA of apple pomace management by different strategies was conducted with an impact assessment limited to GHG emissions. Five apple pomace waste management strategies were used in the present study, namely, apple pomace incineration, landfill, composting, solid-state fermentation to produce high-value enzymes and animal feed.

The main objectives of this study were to develop the inventory of apple pomace management scenarios (incineration, landfilling, composting, animal feed and enzyme production) with details in methods section to assess and compare the environmental impacts of related management scenarios and determine environmentally most respectful scenarios of the environment.

2. METHODOLOGY

2.1 Life cycle assessment

Environmental assessment of a product (apple pomace waste) over its entire lifecycle can indicate the extent of the manufacturer's environmental responsibilities beyond the boundaries of its own facilities, and it can help to identify appropriate management options. Life cycle assessment (LCA) is a technique for assessing the environmental aspects and potential impacts associated with a system (product system or service system) by:

- (i) compiling an inventory of relevant inputs and outputs of the system;
- (ii) evaluating the potential environmental impacts associated with those inputs and outputs; and
- (iii) interpreting the results of the inventory analysis and impact assessment phases in relation to the objectives of the study [15].

This methodology has been already used in many studies to evaluate the environmental impact during the management of different wastes such as municipal waste, agricultural waste paper, glass, metal, and plastic materials [12, 16, 17].

2. 2 The goal and scope

The goal of this study is to evaluate GHG emissions of the existing apple pomace management systems based on life cycle perspective. Specifically, GHG emissions are considered in this study as climate change is a priority area in Quebec particularly for policy making.

2. 3 Systems boundaries and function unit

The system boundaries include collection and transportation of apple pomace from its source (Apple juice industry) to be treated by various management methods in each scenario. It should be noted that equal amount of the apple pomace waste (16209 tons/year) of the same composition are treated in all scenarios. Besides, direct processes relating to waste management systems, other relevant processes interacting with the waste management systems are also included. Production of energy, i.e., electricity and diesel are also included as such energy is directly used in waste management systems and background systems. In animal feed scenario, the management of manure was not

taken in account. The system was considered until enteric fermentation related to animal feed. The energy recycling was taken into account only in the case of incineration as this practice is more popular in Quebec for this scenario. Enzyme production system was considered only until fermentation. Similarly, the composting system was considered until composting process and the compost landfilling was not taken into consideration.

The functional unit (FU) providing a reference to which the inputs and outputs are related is defined as “the total production of apple pomace in Québec at 2007 of 16209 tons”

2. 4 Emission categories

The GHGs from apple waste management using different scenarios are of distinct origin which has been considered for the present study as follows:

- (a) Transportation and collection of waste
- (b) Landfilling of waste
- (c) Composting of waste
- (d) Incineration
- (e) Animal feed
- (f) Solid-state fermentation to produce enzymes

For the above waste treatment practices, the principal basis was for each 16209 tons of apple waste produced (equivalent to total apple pomace production in Quebec in 2007). For the selection of GHG types, the gases CO₂, CH₄ and N₂O which directly influenced the greenhouse effect were selected for assessment. As each GHG differed in the strength of their heat-trapping potential, the heat-trapping potential of CO₂ was used as the basis to show the level of relative contribution to global warming of each gas. The heat trapping potential of CH₄ and N₂O are about 21 and 310 times more powerful than carbon dioxide on a per molecule basis, respectively. The different scenarios of management of apple pomace waste are presented in details in Figure 10. 1.

2. 4. 1 GHG emissions from the waste collection and transportation

GHG emissions from the waste collection and transportation mainly came from CO₂ generated by the transport vehicles during usage of fuel. The actual emissions varied with the vehicles' engine model, fuel type (petrol and diesel), size and load [18]. The total emissions could also be derived from the total mileage or fuel usage. In the case of

animal feed, 20% of farmers were situated at 80 km distance from the apple juice industry and 80% of farmers were situated at 50 km from apple juice industry. To transport apple pomace from the industry to farmer, the vehicles used were 3 axle semi-trailer. This type of vehicle was used to transport apple pomace waste in all management scenarios. These semi-trailers generally transport 14.1 tons of merchandise in Canada [19]. The different emission coefficients of GHGs relative to various vehicles in Canada are presented in Table 10. 1. Further, the distance between management sites and apple juice industry was considered to be 25, 200, 100 and 200 km in the case of landfill, incineration, composting, and enzyme production, respectively. For GHG calculation, the number of vehicles transporting 16209 tons of apple pomace was calculated. The vehicles used for transportation of apple pomace consumed 35 L of diesel/100 km [20].

All calculations were carried out in Excel spreadsheet programme. The collection and transportation component of GHG emissions during solid waste management was therefore calculated using Equation 1:

$$Et = \frac{N \times D \times C}{100} \times \frac{(C_{CO_2} + C_{N_2O} \times 310 + C_{CH_4} \times 21)}{1000} \quad (1)$$

Et =GHG carbon equivalence from collection and transportation of waste (kg CO₂ equivalent/year);

N = number of vehicles

D = distance between the industry and management site

C = fuel consumption/100 km = 35 L/100 km

C_{CO_2} = CO₂ emission coefficient (g of CO₂/L of fuel);

C_{CH_4} = CH₄ emission coefficient (g of CH₄/L of fuel);

C_{N_2O} = N₂O emission coefficient (g of N₂O/L of fuel);

310 = heat trapping potential of N₂O / heat trapping potential of CO₂

21 = heat trapping potential of N₂O / heat trapping potential of CO₂

2. 4. 2 Production of enzymes

When assessing GHG emissions during the use of apple pomace waste as substrate to produce value-added products (enzymes) by *Phanerocheate chrysosporium* using solid state fermentation method [24], three emission sources must be considered: (1) GHGs emissions are primarily produced during the transportation of apple pomace from the industry to the fermentation installation, these emissions were calculated as indicated in the section 2.4.1, the distance between juice industry and the fermentation installation was 200 km; (2) CO₂ produced during fermentation, O₂ was converted to CO₂ in the case of aerobic fermentation; (3) GHG emissions related to consumption of electricity to maintain the conditions of fermentation such as, temperature, agitation...

In order to calculate the GHG production during fermentation, which is primarily carbon dioxide, the experimental set-up comprised of solid state fermentation under aerobic conditions as illustrated in Fig. 10. 2. During the fermentation, there was continuous production of CO₂. To quantify CO₂ production, CO₂ was captured in 220 ml NaOH (5M). CO₂ reacted with NaOH throughout fermentation to form Na₂CO₃. Consequently, at the end of fermentation, unreacted residual NaOH solution was titrated against HCl (1M) solution to quantify CO₂ formed during fermentation. Quantified CO₂ corresponded to 40g of pomace. Thus, we were able to determine the emissions of CO₂ corresponding to 16209 tons pomace disposed per annum. This GHG emission corresponded to 684.83 tons of CO₂/year.

The electrical energy consumed in in-vessel composting varies between 9 and 65 kWh ton⁻¹ waste [29, 30, 31, 32]. The electrical energy consumed during fermentation of apple pomace was about 37 kWh/ton of waste. The quantity of pomace produced per year is 16209 tons. Hence, the electrical energy consumed during fermentation of pomace translates to 599733 kWh. The indirect emission factor due to consumption of electricity is 0.0014 kg CO₂ equivalent/kWh [33]. Thus, indirect GHG emissions related to the consumption of electrical energy during fermentation of apple pomace was calculated. All these calculations were performed in Excel spreadsheet programme.

2. 4. 3 Animal feed

The use of apple pomace for animal feed is one of the waste recycling categories. Apple pomace, rich in sugar when fed as cattle feed becomes significant source of CH₄ and N₂O. When assessing GHG emissions by using apple pomace waste as cattle feed, two

emission sources must be considered: (1) enteric fermentation in cattle; (2) transportation from the industry to farmers, these emissions were calculated as indicated in the section 2.4.1, the distance between juice industry and 80% of farmers was 50 km, while 20 % of these farmers were situated 80 km from Lassonde, inc (Juice industry) [28]. In this study, manure management was not taken into consideration. GHG emissions produced during transportation were calculated as explained in part 2.2.1. Each cattle could digest approximately 1 kg apple pomace waste each day. If 16209 tons of apple pomace were produced each year, the apple pomace waste could feed around 44408 cattle a year. Apple pomace was considered to be supplemented with other kind of diet each day to the cattle (Table 10.2).

Thus, apple pomace also resulted in the production of methane during enteric fermentation of cattle. The contribution of pomace was calculated by taking into account percentage of carbon present in pomace and percentage of carbon contained in the feed ration of fattening cattle. For this calculation, the quantity of corn and soya was calculated which was necessary to replace them by one kg of pomace in a standard ration given to the fattening cattle comprising maize, soybean oil cake, mineral and urea. The replacement was based on percentage of carbon and nitrogen in the feed. Table 10.2 represents the contributions of carbon and nitrogen in various feeds present in the standard diet of fattening cattle. The standard ration corresponded to ration A and the ration containing pomace referred to as ration B. Different emission coefficients of GHGs during enteric fermentation of fattening cattle are presented in Table 10.3. These coefficients were multiplied by the number of cattle fed per annum and the incorporation of pomace, to determine GHG emissions during enteric fermentation. The number of cattle was calculated by taking the ratio of quantity of pomace disposed per annum (16209 tons) over 365 days.

2. 4. 4 Incineration

In Quebec, the majority of solid wastes are incinerated. As per the general incineration process trends in Quebec, the collection trucks dump apple pomace waste in the waste pit which is further crane lifted to be placed in the mouth of the four furnaces (boilers).

Calculation of GHG emissions during the incineration of apple pomace was carried out using the method of Tchobanoglous et al. (1993) [21] prescribed in the Canadian inventory of green house gases (1990-2002) [22]. GHGs produced during incineration

were mainly CO₂ and N₂O [23]. The calculations for the incineration GHG factors included: (1) emissions of GHGs during transportation from the industry to incinerators, these emissions were calculated as indicated in the section 2.4.1, the distance between juice industry (Lassonde, inc) and the nearest incinerator was 200 km; (2) emissions of N₂O; (3) CO₂ produced while generating power instead of utilities; and (4) reduction in emissions caused by energy consumption due to the recovery of non-combustible metals for use in manufacturing. The efficiency of energy recovery during incineration was considered to be 90 %.

CO₂ emissions during incineration were calculated by using Equations 2-5 as given below:

$$C_{\text{available}}(y) = (\text{Waste Type}) \times (1 - \% \text{ Humidity}) \times \% C_{\text{Waste Type}} \quad (2)$$

where :

$C_{\text{available}}(y)$ = available carbon by type of waste for a province y, in time t (year)

Waste type = quantity of the type of incinerated waste, in time t (year)

% humidity = percentage of moisture content by type of waste

% $C_{\text{waste type}}$ = percentage of carbon contained in fossil fuels for each type of incinerated waste

% C in pomace: 14.3 % [24]

Quantity of pomace: 16209 tons

$$C_{\text{available}} = \frac{16209 \times 14.3}{100} = 2317.888 \text{ t} \quad (3)$$

$$CE_{\text{CO}_2-2007(y)} = \frac{C_{\text{available}}(y)}{M_{\text{Inc}}(y)} \times \frac{PM_{\text{CO}_2}}{PM_C} = \frac{2317.888}{16209} \times \frac{44}{12} \quad (4)$$

= 0.52433 t of CO₂ / t of incinerated pomace

where:

$CE_{\text{CO}_2-2007(y)}$ = coefficient of CO₂ emission in 2007 for the incineration of waste for a province y, in time for CO₂/ton of incinerated waste

$C_{\text{available}}(y)$ = available carbon by type of waste for a province y, in time t (year)

$M_{\text{Inc}(y)}$ = total mass of incinerated waste in 2007 for a province y , in time t (year)

PM_{CO_2} = molecular weight of CO_2 , 44 t/t-mol tons/ tons of moles

PM_{C} = molecular weight of carbon, 12 t/t-moles

$$\text{CO}_{2(x)} = \text{CE}_{\text{CO}_2-2007} \times \left(M_{\text{Inc}(x)/\text{province}} \right) = 0.52433 \times 16209 = 8498.91 \text{ tons of CO}_2 \text{ (5)}$$

Emissions of N_2O

Nitrous oxide emissions were calculated using Equation 6 used in the method of Tchobanoglous et al. (1993) [21].

$$\text{N}_2\text{O emissions} = \text{IW}_i \times \text{EF}_i \quad (6)$$

where:

$\text{N}_2\text{O Emissions}$ = emissions of N_2O in the year of inventory, tons/year

IW_i = volume of waste type i incinerated/burnt in free oxygen, tons/year

EF_i = emission factor of N_2O (kg N_2O /Gg of waste) for waste of the type i

The emission factor for the solid waste of pomace was equated to paper waste and it was taken as 10 g of N_2O per ton of waste [25]. This factor was taken into account as nitrogen content of the paper waste was similar to that of apple pomace.

2. 4. 5 Composting

GHG emissions during composting are of two types, CH_4 and N_2O . CO_2 is produced during windrow composting while turning the rows and also during transportation of the waste to the composting site. GHG emissions during transportation were calculated as indicated in the section 2.4.1, the distance between juice industry and the fermentation installation was 100 km. Moreover, we did not take into consideration the production of CH_4 during composting, as waste is generally maintained in aerobic medium, with a small amount of oxygen leading to aerobic decomposition of materials. For this reason, the release of methane gas was neglected. Production of N_2O was also taken into account. The emissions of N_2O originating from composting were calculated using the method suggested by GIEC [34]. Apple pomace was transported to a composting site with a capacity of 38534 m^3 /year. The emissions produced by the retournor of windrow composting were calculated using the consumption of diesel. The composting unit uses

an automated turner for piles requiring a power of 75 kW consuming 12 L of diesel per hour. The composting site is in operation for 261 days/year for a working period of 8h/day, considering an operation efficiency of 90%. The consumption of diesel is thus equivalent to 0.6 L of diesel per cubic meter of composted solids. The quantity of pomace to be composted is 16209 tons per year. This solid waste has a density of 444 kg/m³. Thus, the volume of apple pomace to be composted per year is equal to 36506.75 m³. The quantity of diesel consumed to turn over the apple pomace during composting is thus equal to 21904L per year. Coefficients of emissions of GHG related to the combustion of diesel by tractors [2] are 2730 g/L of CO₂, 0.12 g/L of CH₄ and 0.1 g/L of N₂O. Eventually, the total emissions are calculated.

2. 4. 6 Landfill

Landfilling is a mode of waste management where the wastes are stored under soil which is almost deprived of oxygen. The anaerobic storage of waste is accompanied by the decomposition of organic residues thus producing methane gas, which is 21 times superior to CO₂ in terms of greenhouse gas effects. The transportation of wastes from the industry to the landfill site requires the use of fuel which inevitably produces GHGs, in particular, CO₂. The calculations for the landfilling GHG factors included: (1) emissions of GHGs during transportation from the industry to landfill site, these emissions were calculated as indicated in the section 2.2.1, the distance between juice industry and landfilling site was 25 km; (2) emissions during the process of landfilling resulting from decomposition of organic residues.

To calculate the GHGs produced during landfilling of pomace, a first-order-decay (FOD) model was used [26]. The first-order-decay (FOD) model is generally recognized as being the most widely used approach, as it is recommended by the Intergovernmental Panel on Climate Change [18]. Landfill gas (LFG) formation from a certain amount of waste is assumed to decay exponentially in time. The FOD model has been applied to other developed models, such as Palos Verdes Model, Sheldon- Arleta Model, Scholl Canyo Model and First-Order Model TNO (The Netherlands Organization of Applied Scientific Research) used in this study. The first order model Netherlands (TNO), can be described mathematically by the Equation 7. The TNO model is derived assuming the amounts of degradable organic carbon. For the best results, preferably the same waste composition should be used when using this model to predict LFG production on other

sites. It makes the model less dependent on errors during estimates of waste composition. To calculate methane production, the LFG production obtained with the TNO model is multiplied with the methane concentration of 50% and volumetric mass of 714 g CH₄.m⁻³. This model enables calculation of GHG emissions in m³/year. The landfill gases make up to 50% of CH₄ and 50 % of CO₂ [27]. In order to calculate the quantity of each gas in kg, it is necessary to multiply half of the gas volume by CO₂ density and second half by methane density. The total emissions are thus calculated in kg equivalent of CO₂.

$$\text{GHG}(t) = f \times 1.87 \times A \times C_0 \times k_1 \times e^{-k_1 \times t} \quad (7)$$

Where;

GHG = production of landfill gas, at a given time, t (m³ GHG/year)

f = factor of dissimilation (0.58)

1.87 = conversion factor (m³ of landfill gas/kg C degraded)

A = quantity of wastes loaded into the incinerator (1000 kg)

C₀ = quantity of organic carbon in the waste (kg C/1000 kg of wastes)= 498 kg/1000 kg of pomace

k₁ = constant of degradation, 0.094 (per annum)

t = time elapsed since the waste deposit (year)

Composition of landfill gases was taken as 50% of CH₄ and 50 % of CO₂ [27] with the density of each of the gases being:

Density of CH₄ = 714 g.m⁻³.

Density of CO₂ = 1870 g.m⁻³.

2.5 Major limitations

The analysis and use of parameters in this study was drawn from various analytical approaches and data sources. These approaches have their research limitations. Additionally, the analyses and assessment in this model framework is based on some major assumptions. The major limitations in the study and various assumptions are listed below:

- The net GHG pollutants produced by the incineration of waste can be reduced through improvement in the efficiency of the incineration system.

- The pollutant emissions from composting depended on the type/quantity of supporting material as well as the temperature, water content and supply of oxygen during the composting process. This led to a wide range of emission volumes. Hence, for the analysis of emissions, it was considered that there was no production of CH₄ during composting as the compost was properly returned and aerated.
- The landfill analysis was based on GHG inventory of Quebec (1990-2002) [35], the coefficients used were that of municipal waste considering the fact that characterization data were same. There was no data available for apple pomace waste or fruit waste or even any other agro-industrial or agricultural wastes. Lack of relevant data on CH₄ emissions from the landfill surface and carbon storage meant there were a large number of uncertainties involved.
- During the use of apple pomace as animal feed for cattle, the emissions of N₂O during manure management were not taken into consideration as there was no data on N₂O emission by cattle in Quebec, unlike swine.
- The analysis of CO₂ emissions during fermentation were carried out in lab scale fermentation system. The results could be changed during scale-up of the process by carrying out fermentation using large scale fermentor where carbon dioxide analysis can be performed automatically by using gas analyzer. In fact, it is assumed that at large scale, the fermenters will produce less CO₂ due to optimal environmental conditions.

3. RESULTS AND DISCUSSION

GHGs produced during different modes of waste management of apple pomace can be quantified by taking the sum of the results obtained during transportation and during the actual management process. The net GHG emissions from various apple pomace waste management options are presented in details in Figure 3 and GHG emissions during different steps of each management scenario are presented in details in Table 4. The total GHG emissions (Figure 10.3) were 1122; 1841; 906; 1273; and 963tons of CO₂ eq per annum during incineration, landfilling, fermentation, composting and animal feed, respectively.

As seen in Table 4, all scenarios considered during the course of evaluation of different waste management options generate GHG emissions. The production of enzymes and

animal feed were the least polluting scenarios of the environment in terms of release of GHGs, followed by incineration, composting and landfilling.

3. 1 Production of enzymes

As per the results of life cycle analysis, the fermentation method to produce ligninolytic enzymes is the most environmentally sustainable process (906.81 tons of CO₂ eq) (Figure 10.3). This is due to the aerobic mode of fermentation. During aerobic fermentation, the microorganisms use oxygen and transform the solid biomass into CO₂ contrary to the anaerobic digestion where there is production of CH₄. The global warming potential of CO₂ is 21 times less than CH₄. This very well proves the lower emissions of GHG during fermentation. In addition to the environmental sustainability, fermentation seems to be the most economic process for waste management as there is a possibility of production of high-value products which encompass huge commercial value. On the other hand, all other methods of waste management encumber high process costs. For example, landfill needs the presence of landfill sites that are very costly in contrary to solid state fermentation that can be performed in a simple tray without sophisticated equipment.

3. 2 Animal feed

Lower GHG emissions were observed during apple pomace waste transformation usage as animal feed (963.38 tons of CO₂ eq) (Figure 10.3). This fact may be related to the point that management methods for manure produced by the cattle during the use of pomace in animal feeds (N₂O and CH₄ gases produced) were not taken into account. The management of manure was not taken into account as there was no literature data for the coefficients of emissions of N₂O and CH₄ related to the management of manure produced by cattle as compared to the management of manure by swine (Quebec Inventory on GHGs, 2004) [35]. The consideration of GHG emissions during management of manure will increase the total assessment of GHG emissions as global warming potential of N₂O is 310 higher than CO₂. In other words, if the management manure during this strategy was taken into account, the animal feed scenario will become the most polluting with higher release of GHGs.

3. 3 Incineration

The total GHG emissions during incineration were 1122 tons of CO₂ eq per year (Figure 10.3). In spite of the recycling of CO₂ produced during the process, incineration was the

third most polluting management strategy. If the recycling of CO₂ was not taken into account, it will become the most polluting with higher release of GHGs. This can be explained by the fact that incineration mode of management completely destroys the waste which is transformed into ash and gases. On the other hand, other modes of waste management transform the waste into other products which is a simple transformation and not complete destruction. Meanwhile, in the literature [36, 37], it has been demonstrated that incineration is the most environmentally sustainable mode of waste management. This can be explained by the fact that there will be value-addition of burned wastes, in particular within the framework of the urban heating, similar to the assumption fixed in this study. Chen and Lin [30] estimated that the total GHG emissions produced were much higher in the case of animal feed as compared to incineration which is contrary to the results produced in our study. This is explained by the fact that the GHGs produced during management of manure produced by the cattle was not taken into account as its management would lead to production of GHGs, such as CH₄ and N₂O.

3. 4 Composting

GHG emissions during composting of apple pomace waste were 1273.00 tons of CO₂ eq per annum (Figure 10.3). These emissions were much lower than those produced during landfilling. This may be due to the fact that only small quantity of N₂O was produced during composting, which was related to lower nitrogen content present in pomace waste. In addition, CH₄ emissions during composting have been neglected as the process has been considered under strict aerobic conditions.

3. 5 Landfill

According the results of life cycle analysis shown in Figure 10.3, landfilling as a mode of apple pomace waste management resulted in higher GHG releases. Other studies, which were carried out to take into account the greenhouse gas balance for the management of municipal solid wastes [36, 37] also demonstrated that landfilling was the most polluting strategy leading to release of GHGs at elevated rate and hence global warming. Higher GHG emissions during landfilling were necessarily due to landfill gases produced during anaerobic digestion of apple pomace. During the landfill process, wastes are disposed in a site by burial. In the landfill site, organic wastes are decomposed by microorganisms in the absence of oxygen, this decomposition causes

the production of a gas which is composed primarily of methane, a greenhouse gas contributing to climate change. The global warming potential of CH₄ is 21 times higher than that of CO₂. This gives explanation for elevated GHG emissions as equivalent of CO₂ during landfilling of apple pomace waste. There is another aspect of GHG production during landfilling that GHGs produced during landfilling could be reduced if CH₄ is trapped and further used for heating and production of electricity. According to Spokas (2006) [38] and Bahor et al. (2009) [39], the efficiency of trapping of landfill GHG gases can be between 35% and 85%. For this reason, if the value-addition of landfill gases is taken into account, the total GHG assessment during landfilling will drop considerably. The value-addition of the process was not considered during this study as this mode will considerably increase the cost of management. At some landfills, it is cost-effective to install gas recovery wells throughout the landfill and recover the gas for its energy value. In addition to the wells that may be constructed along the landfill perimeter for migration control, wells are placed in a grid pattern to recover gas that might otherwise escape through the landfill cover. Thus, the cost of the process will increase if the landfill gas will be trapped. A comprehensive techno-economic analysis will be necessary to identify the most economic method of management of apple pomace waste in this case.

The LCA of apple pomace management by different strategies: incineration, landfill, composting, solid-state fermentation to produce high-value enzymes and animal feed clearly showed that solid state fermentation is the most efficient strategy in terms of greenhouse gas emission reduction. The results of the assessment during animal feed showed lower values of GHG emissions unlike the results found in literature as management methods for manure produced by the cattle during the use of pomace in animal feeds (N₂O and CH₄ gases produced) were not taken into account. Thus, value-addition of apple pomace by fermentation gave higher environmental performance in terms of lower GHG emissions than animal feed.

The contribution to GHG emissions made by apple pomace waste management policy can be clearly quantified through life-cycle assessment. The assessment and inventory model used in this case can not only provide a reference for the central and local government of Quebec in their waste management policy but also can be used by apple juice industry to select the policy producing less greenhouse gases. Waste management

strategy in Quebec has mostly favored incineration due to local considerations (difficulty of land acquisition) and a policy of promoting energy recovery through maximizing extraction of calorific value from waste. The results from the assessment indicated that the fermentation of apple pomace waste to produce high value-products constituted a new and efficient management method to reduce GHG emissions.

4. CONCLUSIONS

The greenhouse gases emissions produced during apple pomace waste management were evaluated by taking into account five different scenarios. The different scenarios evaluated were: a) incineration; b) landfill; c) animal feed; d) enzyme production by fermentation and; e) composting. To determine the balance of GHG emissions, life cycle analysis method (LCA) was adopted. The results obtained in this study showed that enzyme production (906 tons of CO₂ equivalent per year) and animal feed (963.38 tons of CO₂ equivalent per year) were the least polluting options of the environment in terms of GHG emissions followed by incineration (1122 tons of CO₂ equivalent per year), composting (1273 tons of CO₂ equivalent per year) and landfill (1841 tons of CO₂ equivalent per year).

The assessment and inventory model used in this study can provide not only a reference for apple pomace waste in their management policy but also can be used to select the best management policy to manage other kind of organic wastes, in particular agro-industrial wastes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Grant 355254, Canada Research Chair), FQRNT (ENC 125216), MAPAQ (No. 809051) and Inde Initiative 2010 (Ministère de l'Éducation, du Loisir et du Sport) for financial support. The views or opinions expressed in this article are those of the authors.

REFERENCES

- [1] Institut de la statistique de Québec, ISQ, 2007
- [2] Agriculture and Agri-Food Canada, AAC, Farm Energy Use Calculator. Version 1.0. 21 Novembre 2003.
- [3] S. Bhushan, K. Kalia, M. Sharma, B. Singh, P. S. Ahuja, Processing of Apple Pomace for Bioactive Molecules. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 28(2008) 285–296.
- [4] R. R. Siva Kiran, R. Konduri, G. H. Rao, G. M. Madh, Statistical optimization of endo-polygalacturonase production by overproducing mutants of *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *J Biochem Tech.* 2 (2010) 154-157.
- [5] F. Vendruscolo, P. M. Albuquerque, F. Streit, Apple Pomace: A Versatile Substrate for Biotechnological Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28(2008)1–12.
- [6] Composting Council of Canada Composting Matters! February 20th & 21st 2008 two-day, workshop focused on organics recycling and composting developments, Kelowna, BC, 2008
- [7] F. Gassara, S. K. Brar, R. D. Tyagi, R. P. John, M. Verma, J. R. Valero, Parameter optimization for production of ligninolytic enzymes using agro-industrial wastes by response surface method. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 16(2011) 343-351.
- [8] E. Matthews, N.J. Themelis, Potential for reducing global methane emissions from landfills. *Proceedings Sardinia 2007, 11th International Waste Management and Landfill Symposium, Cagliari, Italy, 1–5 October 2007*, pp. 2000-2030, 2007.
- [9] J. Bogner, M.A. Ahmed, C. Diaz, A. Faaij, Q. Gao, S. Hashimoto, K. Mareckova, R. Pipatti, Zhang, T. Waste Management, in *Climate Change 2007: Mitigation, Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2007.
- [10] R. Eisted, A. W. Larsen, T. H. Christensen, Collection, transfer and transport of waste: accounting of greenhouse gases and global warming contribution. *Waste Manag. Res.* 27 (2009) 738–745.
- [11] E. C Gentil, A. Damgaard, M. Hauschild, G. Finnveden, O. Eriksson, S. Thoneloe, P. O. Kaplan, M. Barlaz, O. Muller, Y. Matsui, R. II. Ryota, T. H. Christensen, Models for waste life cycle assessment: Review of technical assumptions *Waste. Manag.* 30 (2010) 2636-2648.
- [12] K.A. Weitz, S.A Thornelow, S.R. Nishtala, S. Yarkosky M. Zennes, The impact of municipal solid waste management on greenhouse gas emissions in the United States, *J Air. Waste. Manag. Assoc.* 52 (2002) 1000–1011.
- [13] M. R. Mendes, T. Aramaki, K. Hanaki, Comparison of the environmental impact of incineration and landfilling in Sao Paulo City as determined by LCA. *Resour. Conservat. Recycl.* 40 (2004) 47–63.

- [14] C. Liamsanguan, S.H. Gheewala, LCA: A decision support tool for environmental assessment of MSW management systems. *J. Environ. Manag.* 87 (2008) 132–138.
- [15] International Organization for Standardization, ISO, Environmental management - Life cycle assessment - Principles and framework, 01-Jun-1997, 12 P, 1997.
- [16] A.K. Mohareb, M.A. Warith, R. Diaz, Modelling greenhouse gas emissions for municipal solid waste management strategies in Ottawa, Ontario, Canada. *Resour. Conservat. Recycl.* 25 (2008) 1241–1251.
- [17] S. Thorneloe, K. Weitz, J. Jambeck, Moving from solid waste disposal to materials management in the United States. In: *Proc. International Solid and Hazardous Waste Symposium*. CISA, University of Cagliari, Sardinia. 2005.
- [18] IPCC, in: H.S. Eggleston, L. Buendia, K. Miwa, T. Ngara, K. Tanabe (Eds.), 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme, IGES, Japan, 2006.
- [19] Gouvernement Canada :
- http://www.tc.gc.ca/politique/rapport/aca/anre2006/chpt-7f_f.htm
- [20] Camionnage au Canada – Profil de l'industrie; Transport Canada: <http://www.tc.gc.ca/pol/fr/rapport/CamionnageAuCanada/C3fr.htm>
- [21] G. Tchobanoglous, H. Theisen, S.A. Vigil, Integrated solid waste management: Engineering principles and management issues. McGraw Hill International editions, Civil Engineering series, McGraw Hill Inc., Singapore, 1993.
- [22] Canadian inventory of green house gases. GIEC, 1990-2002. <http://dsp-psd.tpsgc.gc.ca/Collection/En49-5-5-10-2-2002F.pdf> cité le 18 février 2010.
- [23] Environmental Protection Agency (EPA), Solid Waste Management and Greenhouse Gases. A Life-cycle Assessment of Emissions and Sinks, second ed., US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2002 (EPA530-R-02-006).
- [24] F. Gassara, S.K. Brar, R.D. Tyagi, M. Verma, R.Y. Surampalli Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerocheate chrysosporium*. *Biochem. Eng. J.* 49 (2010) 388–394.
- [25] GIO. National Greenhouse Gas Inventory Report of Japan. Ministry of the Environment/ Japan Greenhouse Gas Inventory Office of Japan (GIO) / Center for Global Environmental Research (CGER) / National Institute for Environmental Studies (NIES), 2005.
- [26] H. Oonk, A. Weenk, O. Coops, L. Luning, Validation of landfill gas formation models; 429 EWAB 9427; NOVEM, Utrecht, The Netherlands, 1994.
- [27] Scharff, H. and Jacobs, J., 2006. Applying guidance for methane emission estimation for landfills. *Waste. Manag.* 26(4): 417-429

- [28] IPCC, Climate Change 1995. The Science of Climate Change. Summary for Policymakers and Technical Summary Working Group Report. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1996.
- [29] A. Smith, K. Brown, S. Ogilvie, K. Rushton, J. Bates, Waste Management Options and Climate Change. Final report to the European Commission, DG Environment. AEA Technology. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2001.
- [30] A. Baky, O. Eriksson, Systems Analysis of Organic Waste Management in Denmark. Miljøstyrelsen, Copenhagen, Denmark, 2003.
- [31] A.F. Brinkmann, E. van Zundert, R.J. Saft, Herziening levenscyclusanalyse voor GFT-afval: herberekening LCA bij het MER LAP (Revised life cycle analysis for VGF-waste: new LCA calculation of the EIA National Waste Management Policy Plan). Grontmij/ IVAM, De Bilt/Amsterdam, The Netherlands, 2004.
- [32] M.T.I. Cabaraban, M.V. Khire, E.C. Alocilja, Aerobic in-vessel composting versus bioreactor landfilling using life cycle inventory models. Clean Technol. Environ. Policy. 10 (2008) 39– 52.
- [33] Canada's Climate Change Voluntary Challenge and Registry Inc. (VCR), Registration Guide, 1999.
<http://www3.gov.ab.ca/env/climate/docs/regguide.pdf>
- [34] GIEC (2000), "Rapport Spécial du GIEC : Question Méthodologique et Technologiques dans le Transfert de Technologie", Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC), 200 p., .
- [35] Quebec Inventory on GHGs, 2004.
- [36] L. Chen, Z. Lin .The effect of habitat destruction on metapopulations with the Allee-like effect: a study case of Yancheng in Jiangsu Province, China. Ecol. Modell. 213(3-4) (2008) 356-364.
- [37] T. Zhao, H. Xu, Y. He, C. Tai, H. Meng, F. Zeng, Agricultural non-point nitrogen pollution control function of different vegetation types in riparian wetlands: a case study in the Yellow River wetland in China, J. Environ. Sci. 21 (2009) 933–939.
- [38] K. Spokas, J. Bogner, J. Chanton, M. Morcet, C. Aran, C. Graff, Y. Moreau-le-Golvan, N. Bureau, I. Hebe, Methane mass balance at three landfill sites: what is the efficiency of capture by gas collection systems? Waste. Manag. 26 (2006) 516-525.
- [39] B. Bahor, M. Van Brunt, J. Stovall, K. Blue, Integrated waste management as a climate change stabilization wedge. Waste Manage. Res. 27 (2009) 839-849.

Table 10.1 GHG emission coefficients related to the combustion of fuels by semi-trailers

Coefficients of emissions by heavy commercial vehicles: Government of Canada			
Use	Coefficients of emission		
	CO ₂	CH ₄	N ₂ O
	g/L gasoline	g/L gasoline	g/L gasoline
Gasoline Vehicles			
- 3-way catalytic converter	2 360	0.17	1
- Non-catalytic system	2 360	0.29	0.046
- No cleansing system	2 360	0.49	0.08
Diesel Vehicles			
- Sophisticated cleansing system	2 730	0.12	0.08
- Cleansing system of average efficiency	2 730	0.13	0.08
- No cleansing system	2 730	0.15	0.08

Table 10. 2 Feed rations of cattle and carbon and nitrogen contributions of different nutrients

Nutrition	carbon %	nitrogen%	Ration A	Ration B
Corn ensilage	43.8	1.0	14 kg	14 kg
Hay	40	2.5	1 kg	1 kg
Maize	44	1.4	5 kg	4.862 kg
Soya	42	6	0.3 kg	0.107 kg
Minerals			0.100 kg	0.100 kg
Urea	20	46	0.050 g	0.050 kg
Pomace	14.3	1.1	0 kg	1kg

Table 10. 3 Coefficients of emissions of CH₄ for enteric fermentation – for bovine cattle from 1990 to 2006 (adopted from Boadi et al., 2004)

Coefficients of emission, or CE _{(CE)T} , in kg CH ₄ per animal, per year								
Year	Milking cows	Dairy cattle	Bulls	Cows	heifers	Heifers for slaughter	Cattle	Calves
2006	135.2	73	92.9	84.8	75.3	67.0	60.4	48.3

Table 10. 4 GHG emissions during different scenarios of apple pomace management

Scenario (tons of CO₂ eq per year)	Animal feed	Landfill	Incineration	Enzyme production	Composting
GHG emissions during transportation	62.15	27.75	221.98	221.98	110.99
CO ₂ emissions	not considered	201.13	8498.91	684.83	57.79
CH ₄ emissions	901.23	1612.69	not considered	not considered	not considered
N ₂ O emissions	not considered	not considered	50.24	not considered	1105
Energy recovery	not considered	not considered	7649.01	not considered	not considered

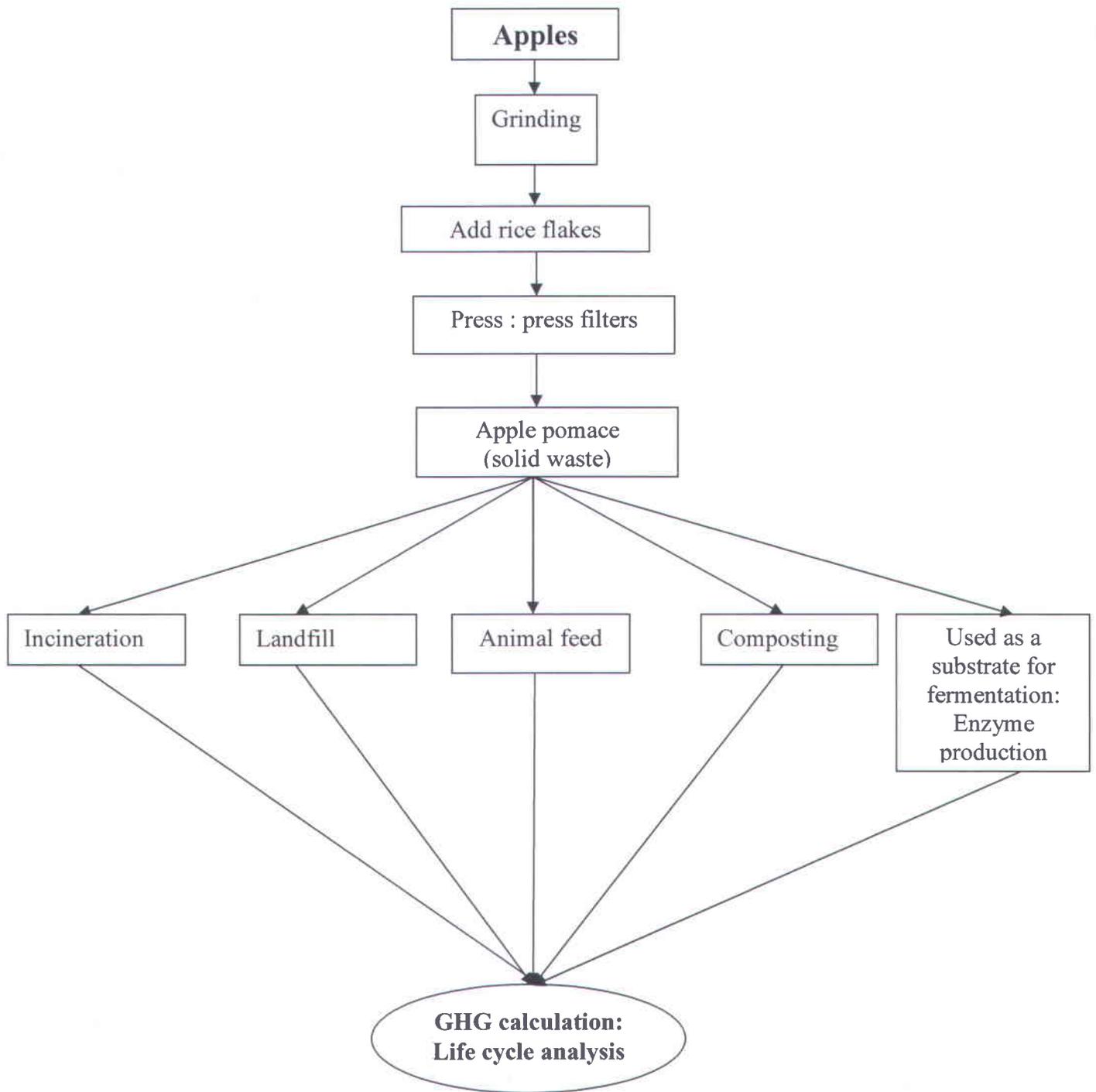


Figure 10. 1 Scenarios of apple pomace management

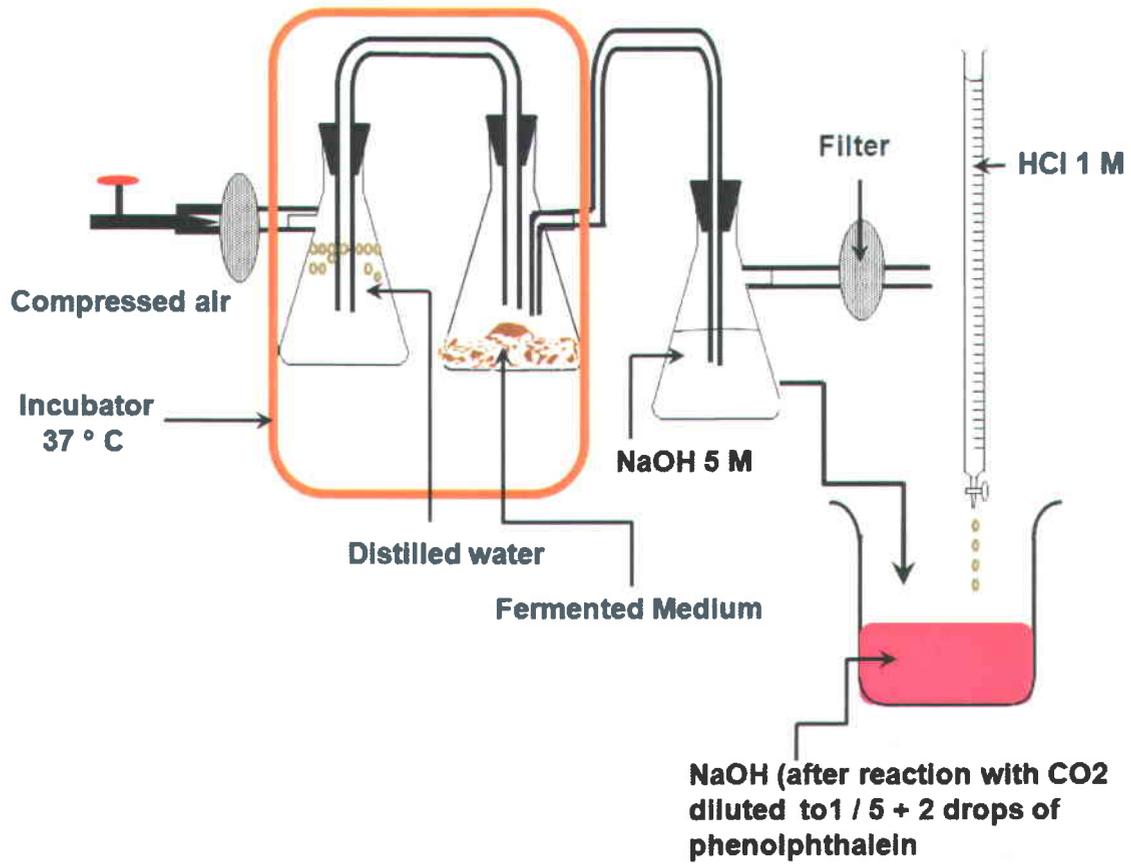


Figure 10. 2 Schematic for aerobic fermentation of apple pomace to produce enzymes: collection of CO₂ as a GHG

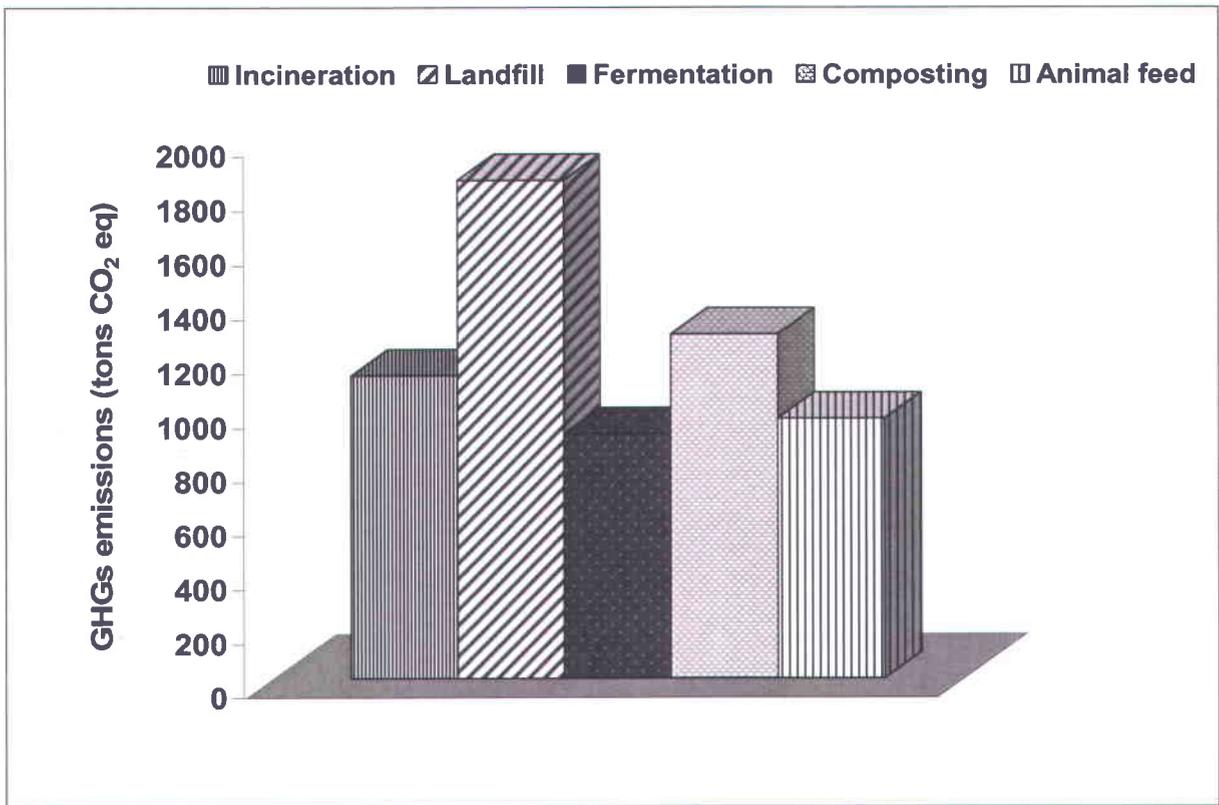
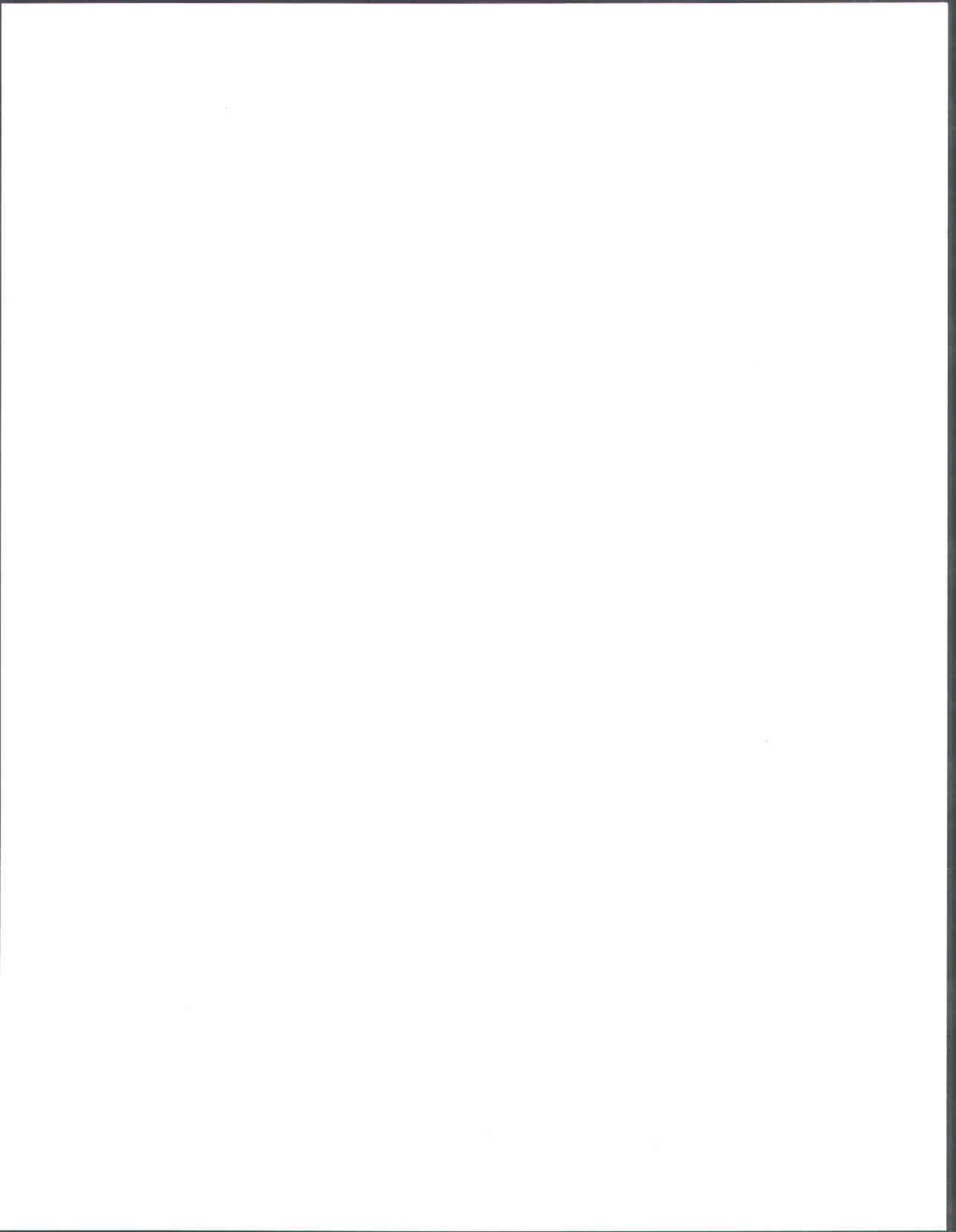


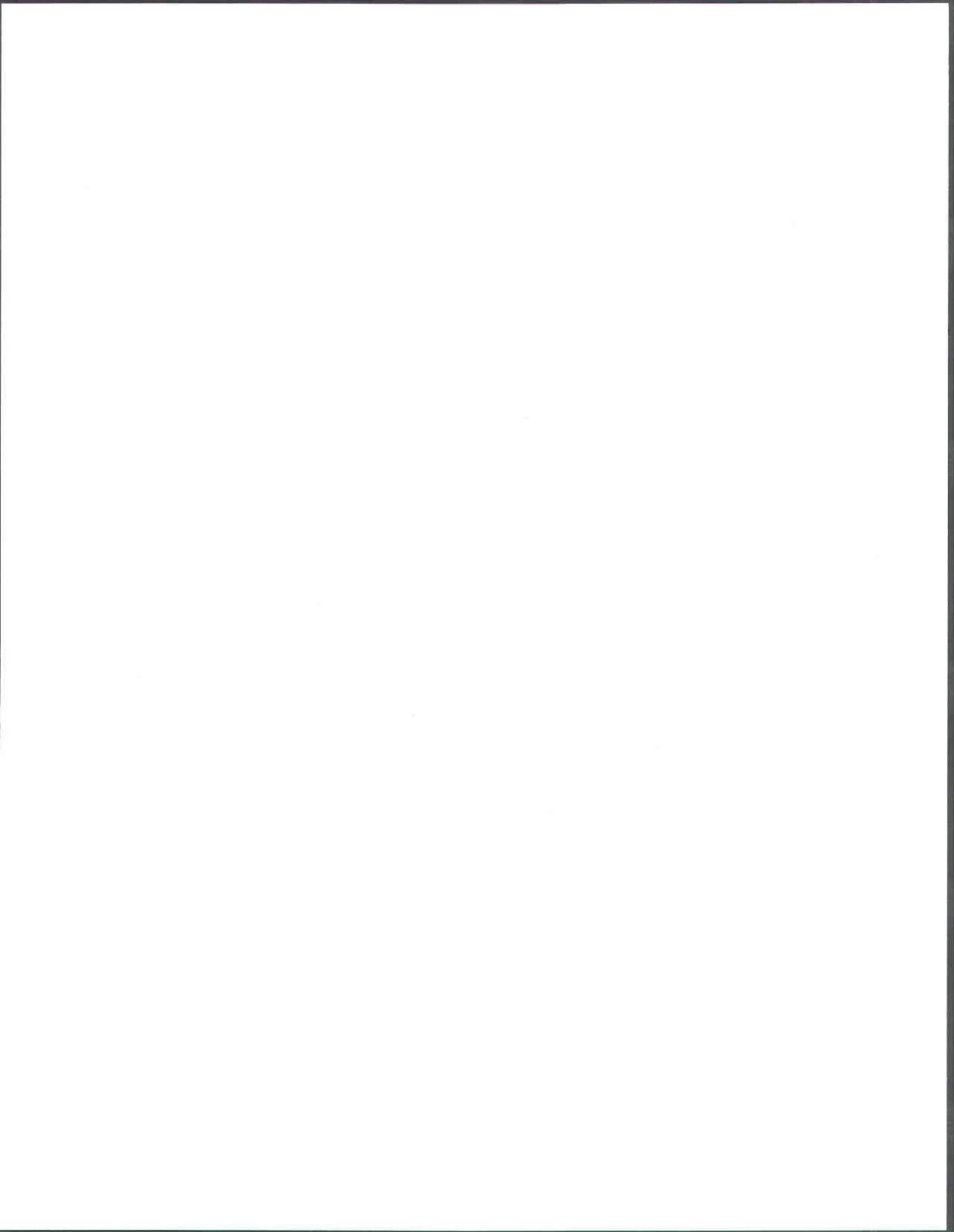
Figure 10. 3 Net GHG emissions from various apple pomace waste management methods



CHAPITRE VI

PARTIE 2

ANALYSE TECHNICO-ÉCONOMIQUE DU PROCÉDÉ DE PRODUCTION DES ENZYMES LIGNINOLYTIQUES PAR FERMENTATION DE DÉCHETS SOLIDES DE JUS DE POMME (APPLE POMACE)



1. DESCRIPTION DES SCÉNARIOS DE SIMULATION EMPLOYÉS POUR L'ANALYSE TECHNICOÉCONOMIQUE DE LA PRODUCTION DES ENZYMES LIGNINOLYTIQUES

Dans le cadre de cette étude, l'évaluation de l'intérêt technico-économique de la production des enzymes ligninolytiques a été réalisée à partir d'une série de 4 scénarios. Les quatre scénarios sont présentés en détails dans la figure 11.1. Les trois premiers scénarios tiennent compte de la fermentation de 10000 tonnes de déchets solides de jus de pomme. Ce substrat détient une humidité qui est de 72% p/p. Cependant, le quatrième scénario tient compte de la fermentation de 10000 tonnes de son de blé (humidité 72% p/p). Ce scénario est considéré comme un scénario de référence car le son de blé est un milieu semi-synthétique très utilisé dans la production des enzymes ligninolytiques par *Phanerocheate chrysosporium*. Après la fermentation du substrat, l'extraction des enzymes a été réalisée par centrifugation après ajout de tampon de sulfate de sodium (10/1 v/p) (scénario 4 et 1) ou de l'eau (10/1 v/p) (Scénario 3). Par contre, l'extraction des enzymes a été réalisée par filtration après l'ajout du tampon phosphate (10/1 v/p) dans le scénario 2. Les paramètres d'opération et les hypothèses de base utilisés dans les 4 scénarios ont été présentés en détails dans le tableau 11.1 et 11.2.

Tableau 11. 1 Paramètres d'opération de base

	Scénario 1	Scénario 2	Scénario 3	Scénario 4
Substrat de fermentation	Apple pomace	Apple pomace	Apple pomace	Son de blé
Méthode d'extraction	Centrifugation	Filtration	Centrifugation	Centrifugation
Tampon d'extraction	Tampon phosphate pH 6,5	Eau	Tampon phosphate pH 6,5	Tampon phosphate pH 6,5
Humidité du milieu	72 % (m/m)	72 % (m/m)	72 % (m/m)	72 % (m/m)
pH du milieu	4,5	4,5	4,5	4,5

Tableau 11. 2 Les simplifications utilisées dans les différents Scénarios (Gassara et al., 2010 ; Gassara et al., 2011)

Scénarios	Activité enzymatique U/g A	Capacité de production MU/an CAP	Période d'opération par jour P	Facteur d'efficacité d'opération (%) F	Taux de récupération des enzymes T	Durée de fermentation D (jours)	Temps entre les périodes de fermentation I
1 : Extraction par centrifugation (Procédé de référence)	2900 U/gss (3) 812 U/g	812000 MU/an	350	90	90	10	0,25
2 : Extraction par filtration	722 U/gss (1) 202 IU/g	202000 IU/an	350	90	25	10	0,25
3 : Extraction par l'eau	2410 U/gss 674,8 U/g	730800 MU/an	350	90	90	10	0,25
4 : Fermentation du son de blé	2610 U/gss (3) 812 U/g	674800 MU/an	350	90	90	10	0,25

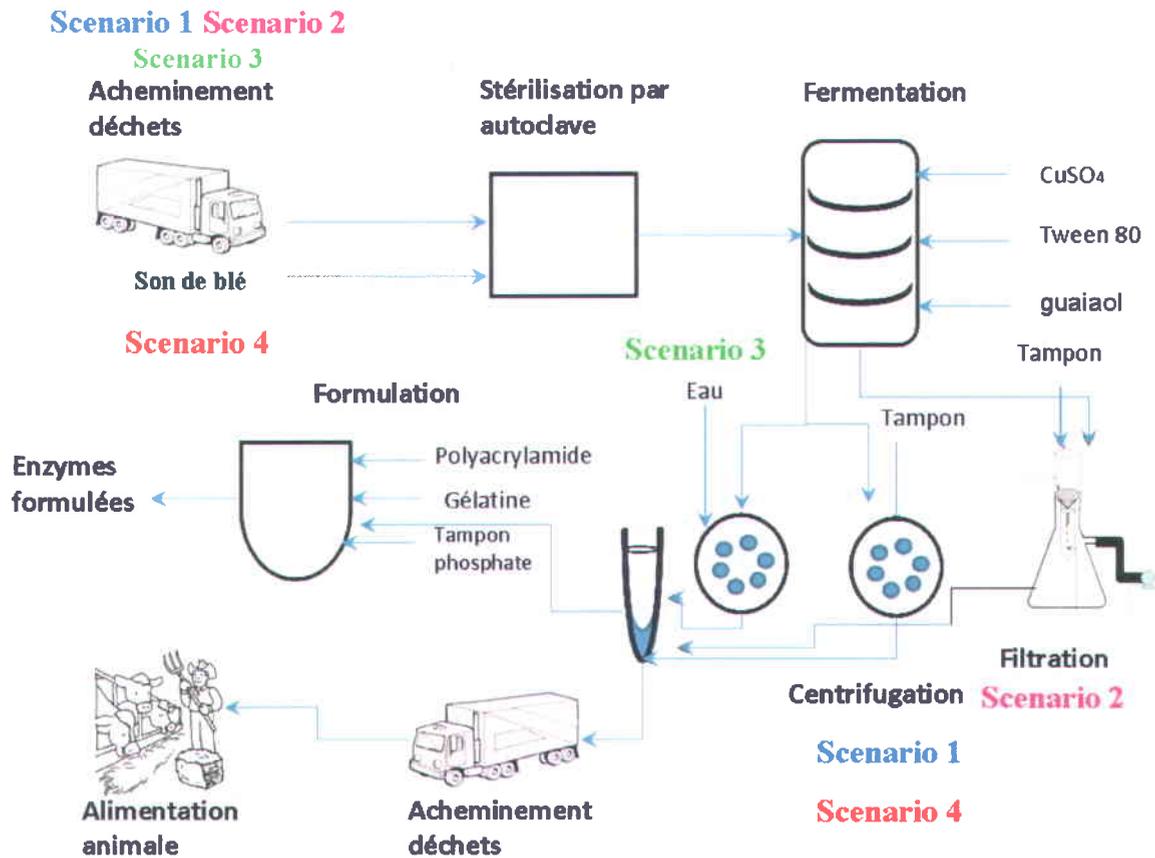


Figure 11. 1Scénarios utilisés dans l'analyse technico-économique

2. DIMENSIONNEMENT DES ÉQUIPEMENTS

Des calculs ont été effectués pour le dimensionnement et la détermination de la capacité des principaux équipements impliqués dans la chaîne de production des enzymes ligninolytiques, la quelle comprend la fermentation, l'extraction, la récupération des enzymes et la formulation.

Le dimensionnement du fermenteur a été réalisé en se basant sur les équations 1 et 2, et les résultats ont été présentés dans le tableau 11. 3 :

$$\text{Dimension du fermenteur(m}^3\text{)} = \frac{Q \times (I+D) \times 1,2}{d} \quad (\text{Eq 1})$$

$$Q = (CAP) / (P \times A \times F \times T) \quad (\text{Eq 2})$$

Avec

d : densité de apple pomace =0,44 Kg/L, densité du son de blé sec =0,24 Kg /L, la densité du son de blé (72% d'humidité)=0,53

I : Temps entre les périodes de fermentation en jours

D : Durée de fermentation (jours)

CAP : Capacité de production MU/an

A : Activité enzymatique U/g

F : Facteur d'efficacité d'opération (%)

T : Taux de récupération des enzymes (%)

P : Période d'opération par jour

Le dimensionnement de l'unité d'extraction des enzymes par centrifugation a été fait en se basant sur l'eq 3 et les résultats obtenus ont été présentés dans le tableau 3.

$$\text{Taille de la centrif (L / h)} = \frac{Q \times 10 \times (I + D) \times 1000}{8} \quad (\text{Eq3})$$

Tableau 11. 3 Dimensionnement du fermenteur et de la centrifugeuse, utilisés dans les quatre scénarios

	Scénario 1	Scénario 2	Scénario 3	Scénario 4
Volume du fermenteur m ³	98,4	98,4	98,4	81,69
Taille de la centrifugeuse L/h	45100		45100	45100

3. COÛTS EN CAPITALS

L'investissement total appelé aussi coûts fixes en capitaux comprend le montant d'investissement de base (coûts directs), les frais d'ingénierie et de supervision ainsi que les dépenses de construction (coûts indirects), de même que les frais de gestion et de construction et les frais contingents.

3. 1 Les coûts directs

Les coûts directs en capitaux comprennent les dépenses dues à l'acquisition et l'installation des équipements (achat et transport, installation et isolation, instrumentation et contrôle, conduites et tuyauterie, système électrique), des bâtiments de procédés et services, l'acquisition et l'aménagement du terrain, ainsi que les facilités et services.

Dans le cadre d'une évaluation préliminaire, l'estimation des coûts en capitaux est basée sur le concept des facteurs de Lang (Castilho *et al.*, 2000). Le point de départ de tous les estimés de cette technique est la préparation de la liste de tous les équipements majeurs requis, incluant le coût d'achat et de transport. Les coûts d'acquisition (achat et transport) des différents équipements ont été déterminés en se basant sur différentes sources (Alibaba. Com Castilho *et al.*, 2000, Zhuang *et al.*, 2007) et ont été modélisés de manière à pouvoir être estimés, par apport à différentes conditions d'exploitation de l'usine de production des enzymes ligninolytiques. Les facteurs de Lang utilisés dans cette étude sont présentés dans le tableau 11.4.

Tableau 11. 4 Estimation du capital total par année d'une entreprise produisant des enzyme par fermentation à l'état solide : Facteurs de Lang (Castilho et al., 2000)

Item	Pourcentage du coût des équipements
Couts directs	
Équipement acheté livré	100
Installation des équipements	39
Instrumentation et contrôle	13
Tuyauterie	31
bâtiments (incluant les services)	29
Électricité (incluant installation)	10
Améliorations	10
Services et facilités	55
Terre si acheté	6
Total des couts directs	293
Couts indirects	
Ingénierie et supervision	32
dépenses de construction	34
Total des couts indirects	66
Frais de l'entrepreneur	18
Contingence	36
Total des investissements en capital fixe	413
Le fonds de roulement	74
Total des investissements de capitaux	487

Le coût des équipements a été déterminé en fonction de leurs capacités. Le coût d'achat a été augmenté de 5% pour tenir compte des frais de transport. Les coûts aussi ont été transformés en dollars canadiens (Taux de change : 1,02 \$US/\$Can)). L'équation 4 a été utilisée pour déterminer le coût d'acquisition des équipements (Remer et Chai., 1990).

$$\text{Coût} = X * (\text{CAP})^Y \times \text{MSECI}_a / \text{MSECI}_0 \quad \text{Eq 4}$$

X : Constante de coût pour l'équipement considéré

Y : Facteur de mise à l'échelle

MSECI_a : Valeur actualisée de l'indice Marshall and Swift Equipment Cost Index

MSECI₀ : Valeur à l'origine de l'indice Marshall and Swift Equipment Cost Index

Les coûts d'acquisition des différents équipements sont présentés dans le tableau 11. 5.

Tableau 11. 5 Coûts d'acquisition des différents équipements

	Appareillage	Capacité	Unité de la taille	de la	Nombre	Coût (\$ canadien)
Scenario 1 Apple pomace : Extraction des enzymes par centrifugation	Solid state fermentor	98,4	m ³		1	331885
	Sterilizing drum	98,4	m ³		1	12208
	Sterile conveyor	5	M		1	45716
	centrifugeuse	45100	L/h		1	568089
	Mixing tank	100	m ³		1	316598
	storage medium tank	100			1	40223
	Coût total des équipements					1,3 M
Scenario 2 : Apple pomace : Extraction des enzymes par filtration	Solid state fermentor	98,4	m ³		1	331885
	Sterilizing drum	98,4	m ³		1	12208
	Sterile conveyor	5	M		1	45716
	rotary drum filter	5,32	m ²		1	311728
	Mixing tank	100	m ³		1	316598
	storage medium tank	100			1	40223
	Coût total des équipements					1,05 M
Scenario : 3 Apple pomace Extraction des enzymes par l'eau	Solid state fermentor	98,4	m ³		1	331885
	Sterilizing drum	98,4	m ³		1	12208
	Sterile conveyor	5	M		1	45716
	centrifugeuse	45100	L/h		1	568089
	Mixing tank	100	m ³		1	316598
	storage medium tank	100			1	40223
	Coût total des équipements					1,3 M
Scenario 4 : Fermentation du son de blé	Solid state fermentor	81.69	m ³		1	289795
	Sterilizing drum	81.69	m ³		1	6153
	Sterile conveyor	5	M		1	45716
	centrifugeuse	45100	L/h		1	568089
	Mixing tank	100	m ³		1	316598
	storage medium tank	100			1	40223
	Coût total des équipements					1,27 M

3. 2 Les coûts indirects

Les coûts indirects des coûts en capitaux comprennent les frais associés à l'ingénierie et la supervision des travaux, ainsi que les dépenses de construction. Ces deux éléments sont estimés à l'aide d'un facteur multiplicatif appliqué sur le coût total d'acquisition des équipements. Les coûts d'ingénierie et de supervision comprennent les frais administratifs d'ingénierie, les coûts d'ingénierie de procédés, les frais d'architecture de

communications de reproduction, les frais de consultations externes, le frais de voyage et de représentation ainsi que les coûts de supervision et d'inspection.

D'autre part, les dépenses de construction tiennent compte des coûts de construction, d'opération et d'entretien des facilités temporaire des bureaux, des routes, des aires de stationnement, du système électrique d'appoint, de communication et d'installation temporaire de clôtures. De plus, cet item comptable prend en considération le coût des outils et équipements de construction, les frais de supervision de la construction, les frais d'achat et d'expédition, les frais de sécurité médical des personnels

Pour les besoins de cette étude, un facteur de 32% a été utilisé pour les frais d'ingénierie et de supervision et un facteur de 34 % pour les dépenses de construction. Ils correspondent aux facteurs de Lang employés couramment pour estimer ces deux éléments économiques dans le cas d'usine de production d'enzymes par fermentation à l'état solide (Castilho *et al.*, 2000).

3. 3 Frais de gestion de construction et frais contingents

Les autres items comptables à considérer pour l'établissement des coûts en capitaux comprennent les honoraires de gestion de construction (frais de l'entrepreneur), ainsi que les frais contingents. Il faut noter que les fonds de roulement ont été pris en considération lors de la préparation du flux monétaire d'exploitation de l'entreprise. Les facteurs d'estimation de Lang (Castilho *et al.*, 2000) pour déterminer les frais de l'entrepreneur, les frais contingents et les fonds de roulement. Les coûts en capitaux ont été calculés et présentés en détails dans le tableau 11.6.

Tableau 11. 6 Coûts en Capitaux

Item	Scénario 1	Scénario 2	Scénario 3	Scénario 4
Coûts directs				
Équipement acheté livré	1314722	1058362	1314722	1266576
Installation des équipements	512741	412761	512741	493964
Instrumentation et contrôle	170913	137587	170913	164654
Tuyauterie	407564	328092	407564	392638
Bâtiments (incluant les services)	381269	306925	381269	367307
Électricité (incluant installation)	131472	105836	131472	126657
Améliorations	131472	105836	131472	126657
Services et facilités	723097	582099	723097	696617
Terre si acheté	78883	63501	78883	75994
Total des coûts directs	3852138.06	3101001	3852138	3711070
Coûts indirects				
Ingénierie et supervision	420711	338675	420711	405304
Dépenses de construction	447005	359843	447005	430636
Total des coûts indirects	867717	698519	867717	835940
Frais de l'entrepreneur	236650	190505	236650	227983
Contingence	473300	381010	473300	455967
Total des investissements en capital fixe	5429805	4371036	5429805	5230962
Le fonds de roulement	972894	783188	972894	937266
Total des investissements de capitaux	6402700	5154224	6402700	6168229

4. COÛTS DE PRODUCTION

L'évaluation des coûts de production comprend les coûts directs d'exploitation, les coûts indirects, les coûts généraux, les frais de financement (intérêt sur le capital investi), l'amortissement sur le capital et les royalties.

Les coûts directs englobent les frais et dépenses liés à la production des enzymes ligninolytiques comme les produits chimiques, la main d'œuvre d'opération, la main d'œuvre de supervision et de bureau, les utilités (vapeur électricité, eau de procédé, disposition des déchets), l'entretien et la réparation des installation et des équipements, les matériaux courants et les frais du laboratoire.

Les coûts indirects de production englobent les frais généraux de l'entreprise, les taxes et les assurances. Par contre, les coûts généraux tiennent en considération les dépenses de l'administration, de la recherche et développement et la distribution des ventes. D'autres éléments ont été considérés dans nos calculs. Ces éléments sont les frais de financement, l'amortissement du capital fixe investi ainsi que les royalties payables.

4.1. La consommation de produits chimiques nécessaires

La consommation de produits chimiques nécessaires à l'opération du procédé de fermentation constitue une fraction notable du coût de production. Le tableau 11. 7 représente la consommation et les coûts des produits chimiques utilisés dans les différents scénarios.

Tableau 11. 7 Consommation des produits chimiques

Matière première	consommation g/kg ml/kg	\$/tonne	prix total (\$)
Fermentation			
Son de blé		260	2600000
Apple pomace			
CuSO ₄ 2 mmole/kg	0,319	1400	4466
Veratryl alcool 2 mmole/kg	0,049	1100	546.92
Tween 80 0,1 % v/w	1	1000	10000
Tampon phosphate de sodium 50mM pH 6,5	96,97	620	601214
NaOH 4 M (en poudre) 55 ml/4,5 kg	1,955	200	3910
Formulation			
Gelatine en poudre	100	1000	1000000
PPG	1000	1,5	15000
tampon phosphate de sodium pH 7,2 0,2%	20	620	1,2 M
Prix total des produits chimiques scénario 1			1,8 M
Prix total des produits chimiques scénario 2			1,8 M
Prix total des produits chimiques scénario 3			1,2 M
Prix total des produits chimiques scénario 4			4,3 M

4. 2 Estimation des coûts liés à la production

Tous les coûts liés à la production des enzymes ligninolytiques (coûts directs d'exploitation, les coûts indirects, les coûts généraux, les frais de financement (intérêt sur le capital investi), l'amortissement sur le capital et les royalties) ont été déterminés en se basant sur des facteurs fournis par une entreprise de production d'enzymes par fermentation à l'état solide (Castilho *et al.*, 2000). Ces facteurs ont été présentés dans le tableau 11. 8. Tous les coûts liés à la production d'enzymes ligninolytiques par les différents scénarios suggérés ont été présenté en détails dans le tableau 11. 8. La part

de différents éléments à savoir les équipements, les produits chimiques, la main d'œuvre et le total des investissements en capitaux a été présentée en détails dans la figure 11.2. D'après les résultats présentés dans la figure 11. 2, le coût de la matière première (son de blé) représentait 21 % du coût de production des enzymes dans le scénario 4 (scénario de référence). Cependant, l'utilisation des déchets solides de jus de pomme comme matière première dont le coût est nul, permet la réduction du coût de production. Ceci encourage l'utilisation des déchets agricoles comme matière première pour produire des produits à valeur ajoutée comme les enzymes, acides organiques, biopesticides, alcool...

Tableau 11. 8 Facteurs utilisés pour l'estimation des coûts de production

Item	%
Coûts de production directs	
Main-d'œuvre nécessaire à l'opération	15% du total des investissements de capitaux
Main-d'œuvre de supervision	17,5% de la main-d'œuvre nécessaire à l'opération
Utilités	15% du capital total
Entretien et réparation	6% du total des investissements en capital fixe
Matériaux courants	0,75% du total des investissements en capital fixe
Les frais de laboratoire	15% de la main-d'œuvre nécessaire à l'opération
royautés	3% du total des investissements de capitaux
Charges fixes	
Amortissement	10% du total des investissements en capital fixe
Taxes locales	2,5 du total des investissements en capital fixe
Assurance	0,7 du total des investissements en capital fixe
Frais généraux	10% du total des investissements de capitaux
Coût de production total	
Coûts généraux	
Administration	4 % du total des investissements de capitaux
Distribution et vente	11 % du total des investissements de capitaux
Recherche et développement	5 % du total des investissements de capitaux
Financement	5 % du total des investissements de capitaux
Coûts généraux	
Coûts total des produits	

Tableau 11. 9 Coûts de production totaux des enzymes ligninolytiques

Item	Scenario 1	Scénario 2	Scénario 3	Scénario 4
Coûts de production directs				
Produits chimiques	1759137	1759137	1157923	4359137
Main-d'œuvre nécessaire à l'opération	960405	773134	960405	925234
Main-d'œuvre de supervision	168071	135298	168071	161916
utilités	960405	773134	960405	925234
Entretien et réparation	325788	262262	325788	313858
Matériaux courants	40724	32783	40724	39232
Les frais de laboratoire	144061	115970	144061	138785
royautés	192081	154627	192081	185047
Charges fixes				
Amortissement	542981	437104	542981	523096
Taxes locales	135745	109276	135745	130774
Assurance	38009	30597	38009	36617
Frais généraux	640270	515422	640270	616823
Coût de production total	5907676	5098744	5306462	8355754
Couts généraux				
Administration	256108	206169	256108	246729
Distribution et vente	704297	566965	704297	678505
Recherche et développement	2910318	2342829	2910318	2803741
Financement	320135	257711	320135	308411
Coûts généraux totaux	4190858	3373674	4190858	4037387
Coûts total des produits (\$)	10098534	8472418	9497320	12393141

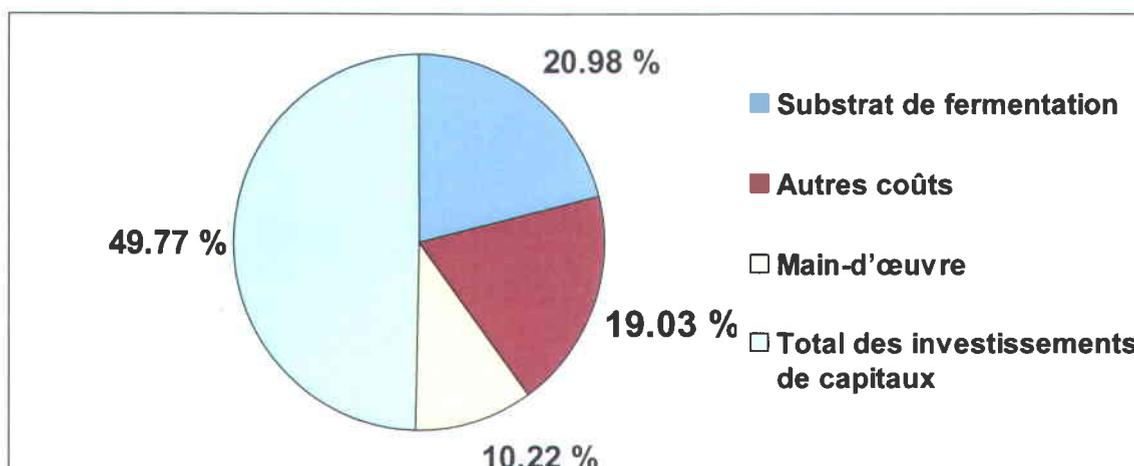


Figure 11. 2 Digramme de la participation des différents paramètres dans le cout de production des enzymes (Scénario 4 : Scénario de référence)

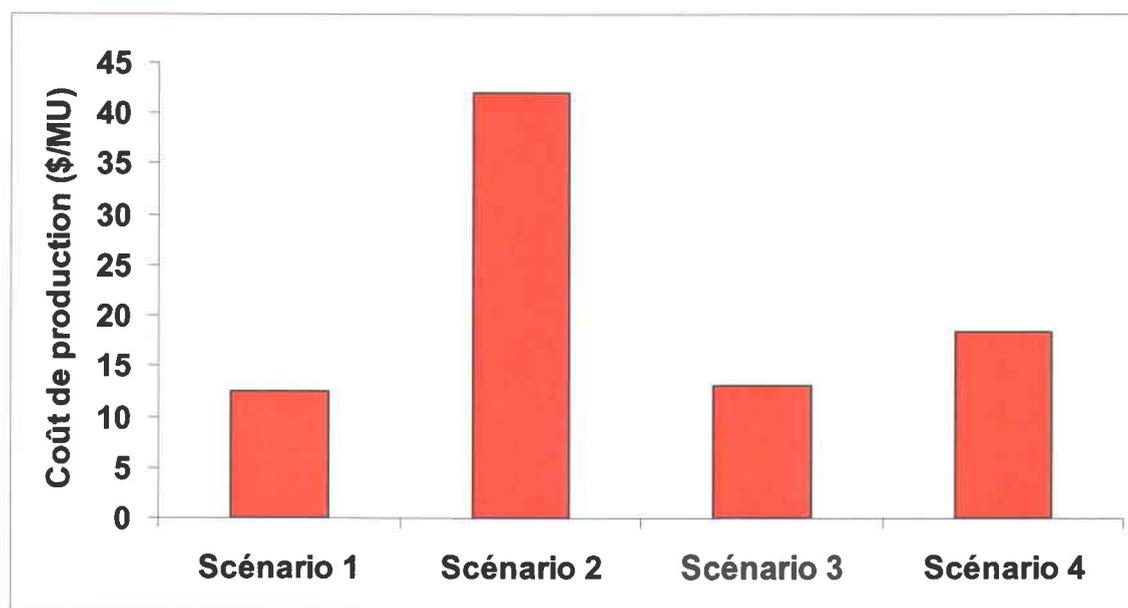


Figure 11. 3 Coût de production de 1 MU d'enzymes ligninolytiques (\$) en utilisant différents scénarios

D'après les résultats trouvés dans la figure 11. 3 et le tableau 11. 9, l'extraction des enzymes par centrifugation permet la réduction du coût de production des enzymes ligninolytiques de 70,36 % par rapport à la méthode d'extraction par filtration. Cet effet aurait dû être expliqué étant l'adsorption des enzymes sur le filtre, ce qui empêche leur extraction. Par la suite, le rendement d'extraction par filtration est faible, ce qui va diminuer la capacité de production des enzymes et augmenter leur coût de production des enzymes. De plus, L'utilisation des déchets solides de jus de pomme comme matière première réduit le coût de production des enzymes de 32,30% par rapport au

procédé de fermentation de référence utilisant le son de blé comme matière première. L'utilisation de l'eau comme tampon d'extraction des enzymes à la place du tampon phosphate a permis l'augmentation du coût de production des enzymes ligninolytiques de 4 %. Ceci est dû au rendement d'extraction par l'eau, qui est plus faible que celui obtenu par le tampon phosphate. L'utilisation de l'eau comme milieu d'extraction a diminué la productivité annuelle d'enzymes ligninolytiques engendrant ainsi une augmentation de leur coût de production. Au final, d'après l'analyse technico-économique réalisée, l'utilisation des déchets solides de jus de pomme comme milieu de fermentation et l'extraction des enzymes ligninolytiques par centrifugation après l'ajout de tampon phosphate réduit considérablement le coût de production des enzymes ligninolytiques.

RÉFÉRENCES

- Castilho L.R., Polato, C.M.S., Baruque, E.A., Sant'Anna, G.L., Freire D.M.G. (2000). Economic analysis of lipase production by *penicillium restrictum* in solid state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal* 4(3): 239-247.
- Gassara F., Brar S.K., Tyagi R.D., Verma M., Surampalli R.Y. (2010). Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*, 49 (3): 388-394
- Gassara F., Brar S.K., Tyagi R.D., John R.P., Verma M., Valero J.R. (2011). Parameter optimization for production of ligninolytic enzymes using agro-industrial wastes by response surface method. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.*, 16 (2) : 343-351.
- Remer D.S., Chai L.H. (1990). Design cost factors for scaling-up engineering equipment. *Chemical Engineering Progress* 86(8), 77-82.
- Ulrich G.D. (1984) A guide to chemical engineering process design and economics. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Zhuang J., Marchant M.A., Nokes S.E., Strobel H.J. (2007). Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. *Applied Engineering in Agriculture*, 23(5): 679-687.

ANNEXE 1

Table A. 1. 1 Viability of *P. chrysosporium* cultivated on wastes (Pomace, brewery waste, fishery waste, pulp and paper industry sludge: P A P), inducer (copper sulphate, 3 mM). Viability was determined using MPN method.

Time (days)	Viability (UFC/g)			
	Pomace	Brewery waste	P A P	Fishery waste
1	0.0E+00	0.0E+00	2.1E+04	0.0E+00
3	2.1E+04	1.0E+05	1.0E+07	0.0E+00
8	5.3E+09	5.3E+06	1.1E+08	0.0E+00
14	5.3E+05	4.1E+05	5.3E+07	5.3E+02
17	4.1E+04	4.1E+03	5.3E+05	0.0E+00

Table A. 1. 2 Viability of *P. chrysosporium* cultivated wastes (Pomace, brewery waste, fishery waste, pulp and paper industry sludge: P A P), inducer (veratryl alcohol, 2 mM). Viability was determined using MPN method.

Time (days)	Viability (UFC/g)			
	Pomace	Brewery waste	P A P	Fishery waste
0	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
1	5.2E+04	5.3E+04	2.4E+03	1.7E+07
2	1.1E+05	1.1E+05	1.2E+03	3.2E+07
3	1.1E+06	1.1E+06	3.2E+03	5.3E+07
4	2.4E+06	1.7E+06	3.2E+03	1.7E+08
11	1.1E+06	1.1E+06	0.0E+00	5.3E+07

Table A. 1. 3 Viability of *P. chrysosporium* cultivated on wastes (Pomace, brewery waste, fishery waste, pulp and paper industry sludge: P A P), without inducer. Viability was determined using MPN method.

Time (days)	Viability (UFC/g)			
	Pomace	Brewery waste	P A P	Fishery waste
0	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
5	5.2E+04	5.3E+04	2.4E+04	0.0E+00
6	1.1E+05	1.1E+05	1.2E+05	0.0E+00
10	5.3E+05	7.2E+05	6.0E+07	6.0E+03
12	5.3E+04	5.7E+05	5.3E+07	5.5E+03
13	5.3E+04	5.3E+05	1.0E+07	0.0E+00

ANNEXE 2

Table A. 2. 1 MnP production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration

MnP production (U/gds)														
c/d/c agitation			d/c/d			aeration 1.66 VVM			Continious c/d/c			aeration 0.83 VVM		
Time	Moyenne	Ecartype	Time	Moyenne	Ecartype	Time	Moyenne	Ecartype	Time	Moyenne	Ecartype	Time	Moyenne	Ecartype
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	12	0	0	12	0	0	12	0	0	12	0	0
24	0	0	24	0	0	24	0	0	24	0	0	24	0	0
36	0	0	36	0	0	36	0	0	36	0	0	36	0	0
48	0	0	48	0	0	48	0	0	48	0	0	48	0	0
60	0	0	60	0	0	60	0	0	60	0	0	60	0	0
72	1.25	0	72	16.25	0	72	14	0.8	120	83.3333333	4.7	72	0	0
84	9.5	0.5	80	20	0.5	80	26.88	1.5	156	83.3333333	5.6	80	0	0
96	15	1.2	98	22.5	1.2	98	44	2.9	192	304.166667	17.8	98	0	0
120	27.5	1.6	105	27.5	1.6	105	103.7	7.9	242	479.166667	31.2	105	2.2	0.1
132	48.75	2.5	123	88.75	2.5	123	444.6	26.8	266	468	29.1	123	4.7	0.3

144	63.75	4.3	133	166.25	4.3	133	675.3	37.2	300	470	29.7	133	32.4	2.3
156	91.25	7.3	147	800	7.3	147	1245.7	87.6	147	1245.7	87.6	147	65.5	5.2
168	150	11	171	845	8.9	171	1678.9	98.3	171	1678.9	98.3	171	167.7	11.2
180	287.5	18	195	844.33	11.2	195	1690.3	87.6	195	1690.3	87.6	195	246.2	16.2
192	412.5	32	219	845.7	12.3	219	1640.3	102.3	219	1640.3	102.3	219	324.6	21.2
204	600	37	243	843	14	243	1634.7	92.5	243	1634.7	92.5	243	322.6	19.2
216	650	39	250	843.5	12	250	1637.3	87.9	250	1637.3	87.9	250	323.9	18.3
228	762.5	50	7	800	7.3	147	1245.7	87.6	147	1245.7	87.6	288	325	16.5
240	1030													
252	1018.75													
264	1013.75													
276	1003.75													
288	1000													

Table A. 2. 2 LiP production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration

Continuous agitation			C/D/C agitation, 1.25 VVM			D/C/D agitation			Aeration 1.66 VVM			Aeration 0.83 VVM		
Time	Moyenne	Ecartype	Time	Moyenne	Ecartype	Time	Moyenne	Ecartype	Time	Moyenne	Ecartype	Time	Moyenne	Ecartype
0	0	0		0	0								0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0
24	15.59139	1.3	12	0	0	12	0	0	12	0	0	12	24	15.59139
	8													8
48	18.83960	1.2	24	0	0	24	0	0	24	0	0	24	48	18.83960
	6													6
60	16.24103	0.9	36	0	0	36	0	0	36	0	0	36	60	16.24103
	9													9
72	16.24103	1.2	48	0	0	48	0	0	48	0	0	48	72	16.24103
	9													9
120	12.99283	0.8	60	0	0	60	1.75	0	60	0	0	60	120	12.99283
	2													2
144	22.73745	1.2	72	1.375	0	72	6.125	0	72	0	0	72	144	22.73745
	5													5
156	17.54032	1.2	84	2.625	0.1	80	12.5	0	80	5.3	0.4	80	156	17.54032
	3													3
168	15.59139	0.9	96	3.75	0.2	98	18.75	0.1	98	87.4	3.9	98	168	15.59139
	8													8
180	18.18996	0.6	120	6.125	0.3	105	25	0.2	105	122.5	8.6	105	180	18.18996
	4													4
192	12.34319	0.8	132	12.5	0.5	123	27.5	0.3	123	154.9	10.2	123	192	12.34319
216	23.38709	1.4	144	32.5	1.4	133	31.25	0.5	133	167.9	11.4	133	216	23.38709
	7													7
228	16.24103	1.1	156	52.5	3.1	147	37.5	1.4	147	387.9	14.3	147	228	16.24103
	9													9
230	14.16218	0.9	168	91.25	7.6	171	43.75	3.1	171	385.45	18.2	171	230	14.16218
	6													6
242	18.83960	1.1	180	103.75	8.2	195	117.5	7.6	195	382.9	16.9	195	242	18.83960
	6													6
254	16.24103	0.8	192	150	11.3	219	116.25	8.2	219	382.3	17.6	219	254	16.24103
	9													9

266	33.13172	1.7	204	250	17.3	243	116.875	11.3	243	384	16.9	243	266	33.13172
300	32.48207	1.8	216	262.5	23.2	250	116.25	10.3	250	384.1	17.8	250	300	32.48207
	9		228	250	21							288		9
			240	243.75	19.5							300		
			252	237.5	19.9									
			264	237.5	18.9									
			276	231.25	21.1									

Table A. 2. 3 Laccase production during solid state fermentation of apple pomace using different modes of agitation and aeration

Laccase production (U/gds)													
Continuous agitation		C/D/C agitation, 1.25 VVM			D/C/D agitation			Aeration 1.66 VVM			Aeration 0.83 VVM		
Time	Moyenne	Ecartype	Time	Moyenne	Ecartype	Time	Moyenne	Ecartype	Time	Moyenne	Ecartype	Time	Moyenne
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	12	0	0	12	0	0	12	0	0	12	0	0
24	0	24	0	0	24	0	0	24	0	0	24	0	0
36	0	36	0	0	36	0	0	36	0	0	36	0	0
48	0	48	0	0	48	0	0	48	0	0	48	0	0
60	0	60	0	0	60	0.5	0	60	0	0	60	0	0
72	0	72	1.25	0	72	0.75	0	72	0	0	72	0	0
84	0	84	1.5	0.01	80	0.875	0.01	80	0	0	80	0	0
96	0	96	1.875	0.1	98	1	0.1	98	4.6	0.2	98	0	0
120	0	120	3	0.18	105	1.125	0.18	105	12.3	0.8	105	0.7	0
132	0	132	3.625	0.12	123	1.25	0.12	123	18.9	1.5	123	1.2	0.1
144	0	144	12.5	0.9	133	16.25	0.9	133	89.6	6.7	133	3.9	0.2
156	0	156	16.25	0.8	147	15	0.8	147	187.7	11.4	147	9.7	0.4
204	19.90	168	15	1	171	62.5	1	171	297.3	15.5	171	14.4	0.9
228	37.03	180	37.5	2.1	195	112.5	12.1	195	689.3	43.2	195	36.2	2.1

230	91.04	192	162.5	12.1	219	300	22.1	219	898.9	56.3	219	49.4	3.4
242	86.41	204	225	14.1	243	293.75	14.1	243	891.2	54.1	243	48.7	3.2
254	89.50	216	250	23.1	250	287.5	23.1	250	887.7	49.3	250	48.6	2.9
266	92.59	228	262.5	18.2							288	46.4	3.1
300	91.04	240	300	27.3							300	46.8	3.4
		252	312.5	30.4									
		264	297.5	25.4									
		276	292.5	21.1									
		288	290	16.7									

ANNEXE 3

Table A. 3. 1 Ligninolytic enzymes production during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium. Values are expressed as means of three replicates \pm standard deviations.

	laccase	Ecartye	MnP	Ecartye	LiP	Ecartye
0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0.95497312	0.02756196
24	0	0	0	0	1.03293011	0.02756196
30	5.55555556	0.3	46.25	10.6066017	0.98420699	0.01378098
38	10.6666667	0.76	73.75	17.6776695	1.04267473	0.09646685
55	8.88888889	0.7	111.25	10.6066017	1.00369624	0.04134294
60	9.72222222	0.56	66.25	8.83883476	0.98420699	0.15159077
67	22.2222222	2.54	80.625	2.65165043	1.06216398	0.12402881
78	31.9444444	4.3	100.625	0.88388348	2.04637097	0.13780979
84	43.0555556	4.2	110	3.53553391	2.24126344	0.13780979
88	38.8888889	2.6	121.25	1.76776695	4.96975806	0.13780979
96	33.3333333	3.32	201.25	8.83883476	6.04166667	0.27561958
108	36.1111111	1.2	166.25	5.30330086	3.9952957	0.13780979
114	31.9444444	1.4	156.875	9.72271824	3.70295699	0.27561958

Table A. 3. 2 Particle size analysis during liquid state fermentation of apple pomace sludge and synthetic medium.

	D50 median size	D10	D90	D43 mean size
0	54.064	12.11	125.006	86.2
18	57.79	12.22	165.132	74.71
24	36.31	4.91	96.39	44.92
30	30.66	2.93	84.76	39.97
38	20.32	2.83	79.65	35.67
55	76.129	12.26	524.197	178.31
60	547.04	42.61	681.805	467.64
67	532.2	37.1	598.5	420.14
78	453.24	34.4	579.3	387.14
84	312.13	25.71	512.13	321.54
88	279.12	21.1	413.87	235.56
96	178.56	18.14	376.12	212.7
108	168.89	14.83	361.34	198.13
114	143.56	12.34	324.56	176.98

ANNEXE 4

Table A. 4. 1 Thermal stability of MnP inside different hydrogelformulations

Temperature (°C)	4	20	40	50	60	75
free enzyme	404	512.5	500.1	412	239	32.1
pec 0.01%	514	525	524	523	512	501
pec 0.02%	532	537.5	537	536	518	504
pec 0.05%	477	487.5	487	476	471	465
gel 0.01%	496	500	498	495	491	482
gel 0.02%	523	525	523	521	517	513
gel 0.05%	513	512.5	509.3	508	505	501
cmc 0.01%	384	387.5	385	381	370	254
cmc 0.02%	232	250	249	247	236	212
cmc 0.05%	172	175	174	169	161	154

Table A. 4. 2 Thermal stability of LiP inside different hydrogelformulations

Temperature (°C)	4	20	40	50	60	75
free enzyme	36	50.67	47	32	7	0
pec 0.01%	48	49.50	49	48	47	46
pec 0.02%	53	53.40	53	52	49	48
pec 0.05%	37	38.19	38	36	34	32
gel 0.01%	49	50.28	49	48	45	43
gel 0.02%	43	45.60	45	43	41	40
gel 0.05%	37	42.48	42	38	35	34
cmc 0.01%	42	47.16	46	45	42	41
cmc 0.02%	35	37.80	36	34	32	32
cmc 0.05%	31	33.91	33	31	28	27

Table A. 4. 3 Thermal stability of laccase inside different hydrogelformulations

Temperature (°C)	4	20	40	50	60	75
free enzyme	69	79.16	68.4	34.8	13	0
pec 0.01%	86	88.88	88.2	87.5	86	84
pec 0.02%	76	79.16	79	78	76	74
pec 0.05%	75	77.77	76	75	74	73
gel 0.01%	86	87.5	87	86.5	84	82
gel 0.02%	81	81.944	81	80	75	73
gel 0.05%	79	80.27	79	78	73	70
cmc 0.01%	56	58.33	56	54	49	48
cmc 0.02%	43	44.44	43	42	39	39
cmc 0.05%	28	29.16	29	27	25	23

Table A. 4. 4 Polyphenol reduction during juice treatment by different ligninolytic enzymes formulations

	pectin	gelatin	CMC	Free enzyme	Juice
0.01%	73.580786	57.2052402	65.2838428		
0.02%	61.1353712	79.0393013	52.1834061		
0.05%	62.2270742	59.1703057	81.5502183		
				46.5065502	4.58

Table A. 4. 5 Particle size analysis during juice treatment by different ligninolytic enzymes formulations

	pectin	gelatin	CMC
0.01%	51.08	7.2	53.33
0.02%	59.92	443.64	6.03
0.05%	802.93	622.55	6.67

