

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**ÉTUDE DES MICROORGANISMES AÉROBIES THERMOPHILES ISOLÉS
D'UN BIORÉACTEUR TRAITANT LE LISIER DE PORC.**

Par
Hélène Castonguay

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

Examineur interne	Dr. Rolf Morosoli
Examineur externe	Dr André Morin
Directeur de recherche	Dr Réjean Beaudet

Résumé

Un bioréacteur aérobique thermophile traitant le lisier de porc a été développé à l'INRS-Institut-Armand Frappier en réponse au besoin croissant des producteurs de porc de diminuer la charge polluante du lisier utilisé pour la fertilisation des terres agricoles. De ce réacteur auto-chauffant pouvant atteindre des températures de 74°C, différents microorganismes ont déjà été isolés et caractérisés pour constituer une banque de bactéries aérobies thermophiles. Parmi ceux-ci, on retrouve entre autres, des souches d'*Ureibacillus thermosphaericus*, *Bacillus thermocloacae* et *Geobacillus thermodenitrificans* et *Geobacillus toebii*.

Dans cette banque de bactéries, des souches d'une nouvelle espèce bactérienne n'ayant jamais été cultivée antérieurement ont été isolées en culture pure. Deux souches T3 et 60S1b, représentantes de cette espèce, ont été étudiées au cours de ce projet. Une analyse par microscopie électronique de la souche T3 a montré qu'il s'agit d'un bacille de 0.3-0.5 x 3-4 µm de type Gram positif pouvant former une spore en position terminale. L'analyse de leurs compositions en acides gras a montré une majorité des acides (16:0) et (14:0). La séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S suggère que les souches T3 et 60S1b seraient les représentants d'un nouveau genre bactérien de la famille des *Bacillaceae*. Les plus proches représentants sont *Bacillus thermoamylovorans* avec 93% de similarité et *Bacillus circulans* avec 91.5% de similarité respectivement. Initialement cultivé sur un milieu contenant du lisier de porc partiellement traité, des essais pour remplacer ce milieu ont donné des résultats mitigés où des milieux très riches contenant entre autres du protéose peptone, des vitamines et du NH₄Cl ont permis d'obtenir une faible croissance bactérienne.

Le potentiel des bactéries thermophiles de notre banque pour produire 19 différentes activités enzymatiques a été évalué en utilisant les galeries API-ZYM. Leurs capacités à sécréter des xylanases, des cellulases et des phytases ont aussi été évaluées. Plusieurs souches ont démontré des activités d'estérase (C4), d'estérase-lipase (C8), de glucosidases, de protéases et de phosphatases acide et alcaline. Aucune des souches

testées n'a montré des activités de phytase, ni celles isolées d'enrichissements effectués en présence de son de blé à partir de la flore bactérienne du bioréacteur. Utilisant une approche moléculaire, aucun gène codant pour une phytase n'a été détecté parmi les souches testées ou les flores microbiennes du réacteur ou après enrichissement.

Deux enzymes ont été l'objet d'une caractérisation préliminaire, soit la xylanase et la β -glucosidase de *Geobacillus thermodenitrificans* SB1. La xylanase est sécrétée alors que la β -glucosidase est intracellulaire et se retrouve dans la fraction cytoplasmique. Les deux enzymes ont montré une température optimale d'activité de 70°C et de 90°C respectivement avec des pH optimaux se situant dans la neutralité. Toutes deux ont montré une très bonne stabilité à ces températures où aucune perte d'activité n'a été observée après 14 et 8 heures respectivement d'incubation en présence de leurs substrats. Ces résultats démontrent toute la diversité microbienne retrouvée dans ce bioréacteur aérobique thermophile et la capacité de ses microorganismes à produire des enzymes thermostables ayant des applications potentielles intéressantes. L'industrie de l'alimentation, humaine ou animale, des pâtes et papier, et des textiles et détergents bénéficient toutes de l'utilisation des enzymes soit par une augmentation de l'efficacité des procédés ou par la diminution des rejets nocifs pour l'environnement.

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier le Dr Réjean Beaudet pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir aidé à surmonter les difficultés du projet. J'aimerais également remercier Rita Alary pour ses encouragements et sa bonne humeur.

Un gros merci à toute l'équipe de l'aile de l'environnement pour un merveilleux deux ans passé en votre compagnie. Je voudrais remercier en particulier le Dr Richard Villemur pour l'expertise qu'il m'a fournie en biologie moléculaire, et le Dr Pierre Juteau pour son travail énorme avec le bioréacteur à lisier et pour toute son aide. Je tiens également à remercier le Dr Claude Dupont pour m'avoir permis d'emprunter son laboratoire et pour les techniques qu'il m'a apprises.

Merci à toute l'équipe de l'AGEIAF pour tous les bons moments passés ensemble à organiser des soirées aussi superbes que dépeuplées. Ce fut un très grand plaisir que de travailler en votre compagnie. Merci à Anne-Pascale d'avoir si brillamment pris d'assaut la FEUQ et la relève en tant que présidente.

Un énorme merci à tous mes amis pour m'avoir écouté et soutenu pendant ces deux années et pour toutes ces soirées « en famille ».

Mais surtout, merci à ma famille, Maman, Papa, Marie, Anne, et à Jason pour ces heures innombrables de soutien et d'encouragements muets ou verbaux que vous m'avez fournis. L'union fait la force.

En dernier lieu, j'aimerais remercier l'INRS-Institut Armand Frappier et la Fondation Armand-Frappier pour le soutien financier qu'ils prodiguent aux étudiants de l'Institut.

Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux et des figures	viii
Table d'abréviations.....	x
Introduction	1
1. Revue bibliographique	5
1.1 Traitements biologiques du lisier de porc	5
1.1.1 Le lisier de porc.....	5
1.1.2 Traitements anaérobies.....	7
1.1.3 Traitements aérobies	8
1.1.4 Traitement aérobie thermophile	10
1.1.5 Biotraitement thermophile du lisier de porc à l'INRS-IAF	11
1.1.6 Flore microbienne des traitements aérobies thermophiles.....	12
1.1.7 Les bactéries thermophiles	15
1.1.7.1 Généralités.....	15
1.1.7.2 Besoins nutritifs des bactéries thermophiles.....	16
1.1.7.3 Les <i>Bacillaceae</i>	16
1.1.7.4 Les thermozyms.....	17
1.2 Les enzymes dans l'industrie	18
1.2.1 Généralités.....	18
1.2.2 Les phytases	19
1.2.2.1 Le phytate	19
1.2.2.2 Les phytases	21
1.2.2.3 Applications commerciales des phytases	22
1.2.3 Le complexe cellulolytique	23
1.2.3.1 La cellulose	23
1.2.3.2 Les cellulases.....	25
1.2.3.3 Rôle des cellulases dans l'industrie alimentaire	30
1.2.3.4 Les β -glucosidases.....	31
1.2.3.5 Applications industrielles des β -glucosidases	35
1.2.4 Les xylanases	36
1.2.4.1 L'hémicellulose	36
1.2.4.2 La xylanase.....	37
1.2.4.2.1 Fonctions de la xylanase	37
1.2.4.2.2 Classification des xylanases	38
1.2.4.2.3 Structure des xylanases	39
1.2.4.3 Régulation des xylanases.....	40
1.2.4.4 Rôles des xylanases dans l'industrie	41
2. Matériel et Méthodes.....	43
2.1 Origine des microorganismes utilisés dans cette étude et conditions de culture.	43
2.2 Caractérisation de <i>Bacillus sp</i> T3 et 60S1B	44
2.2.1 Milieux de culture.	44
2.2.1.1 Milieu lisier partiellement traité.	44
2.2.1.2 Milieu utilisé pour la sporulation.	45
2.2.1.3 Essais de culture avec lisier brut, partiellement traité ou traité (2005).....	45
2.2.1.3.1 Milieu lisier partiellement traité.	45
2.2.1.3.2 Milieu lisier brut.	45
2.2.1.3.3 Milieu lisier traité.	46
2.2.1.4 Milieu Basal Salts (BSM) pour les espèces <i>Thermus</i>	46
2.2.1.5 Milieu BSME additionné de protéose peptone et du mélange vitaminique Wolin.....	47

2.2.1.6 Milieu BSME additionné de différents constituants.	48
2.2.2 Essais de croissance en milieu liquide.	49
2.2.3 Microscopie électronique.	50
2.2.4. Analyse du profil des acides gras.	50
2.2.5 Analyse du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S de T3 et 60S1b.	51
2.2.5.1 Extraction d'ADN par broyage par billes de verre.	51
2.2.5.2 Conditions pour la réaction de la polymérase en chaîne (PCR).	51
2.2.5.3 Préparation des gels d'agarose.	52
2.2.5.4 Étude phylogénétique du gène codant pour l'ARNr 16S de T3 et 60S1b.	53
2.3 Évaluation du potentiel enzymatique de la banque de bactéries aérobies thermophiles isolées des bioréacteurs aérobies thermophiles traitant le lisier de porc.	54
2.3.1 Banque de bactéries aérobies thermophiles	54
2.3.2 Galeries API-Zym.	54
2.3.3 Recherche de souches produisant de la phytase.	55
2.3.3.1 Milieux utilisés.	55
2.3.3.2 Recherche de microorganismes produisant une phytase à partir d'échantillons du réacteur thermophile	56
2.3.3.3 Enrichissement au son de blé d'un extrait de lisier.	57
2.3.3.4 Dosage colorimétrique de la libération des phosphates.	59
2.3.3.5 Identification de la présence de phytases par amplification du gène.	60
2.3.4 Recherche de la xylanase et de la cellulase.	62
2.3.4.1 Milieux utilisés pour la détection des activités de xylanase et cellulase.	62
2.3.4.2 Test PAHBAH pour les xylanases.	62
2.3.4.3 Test PAHBAH pour les cellulases.	64
2.3.4.4 Dosage des protéines.	65
2.3.5 Caractérisation de la β -glucosidase de <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> SB1.	65
2.3.5.1 Production de la biomasse et de la préparation d'enzyme	65
2.3.5.2 Essais enzymatiques de la β -glucosidase avec le pNPG.	66
2.3.5.3 Zymogrammes au MUG et au pNPG.	67
3. Résultats	70
3.1 Caractérisation des souches T3 et 60S1b.	70
3.1.1 Croissance sur milieux solides.	70
3.1.2 Essais de croissance de la souche 60S1b en milieux liquide	72
3.1.3 Microscopie électronique de la souche T3.	72
3.1.4 Profil d'acides gras de T3 et 60S1b.	75
3.1.5 Analyse phylogénétique du gène codant pour l'ARNr 16S de T3 et 60S1b.	75
3.2 Évaluation du potentiel enzymatique des souches de la banque de bactéries thermophiles.	78
3.2.1 Galeries API-Zym.	78
3.2.2 Recherche de bactéries avec une activité phytase.	78
3.2.2.1 Recherche d'activité phytase sur milieux solides.	80
3.2.2.2 Essai enzymatique de la phytase et dosage colorimétrique des phosphates.	81
3.2.2.3 Recherche d'un gène codant une phytase par PCR dégénéré.	82
3.3 Recherche de xylanase.	83
3.3.1 Détection d'activité xylanase sur milieux solides.	83
3.3.2 Caractérisation de l'activité xylanasique de <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> Sb1.	84
3.4 Recherche de l'activité cellulasique.	87
3.5 Étude de l'activité de β -glucosidase de <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> Sb1.	88
3.5.1 Caractérisation de l'activité de β -glucosidase de SB1.	88
3.5.2 Zymogrammes de la β -glucosidase de SB1.	91
4. Discussion	93
4.1 Caractérisation de <i>Bacillus</i> T3 et 60S1b.	93
4.2 Évaluation du potentiel enzymatique de la banque de bactéries thermophiles.	97
4.2.1 Caractérisation de l'activité β -glucosidasique de <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> SB1.	98
4.2.2 Caractérisation de l'activité de xylanase de <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> SB1.	100
4.2.3 Recherche de l'activité phytasique.	101

Conclusion	104
Appendice A	106
Appendice B.....	108
Références.....	112

Liste des tableaux et des figures

Tableau 1. Énumération des souches de la banque de bactéries aérobies thermophiles isolées des bioréacteurs traitant le lisier de porc	44
Tableau 2. Concentrations des différents composants ajoutés au milieu BSME (pour 100mL de milieu).	48
Tableau 3. Concentration des différents composés ajoutés au milieu liquide BSME (pour 100mL de milieu).	49
Tableau 4. Liste des séquences des amorces pA et pH.	52
Tableau 5 Longueur (kb) des fragments de l'ADN du phage lambda Sty I.	53
Tableau 6. Liste des substrats associés aux 20 puits de la galerie API-Zym et des enzymes correspondantes testées.	55
Tableau 7. Liste des séquences des amorces dégénérées phytG et phytD.	62
Tableau 8. Intensité de la croissance des souches T3 et 60S1b sur les milieux solides BSME contenant différents additifs. (voir la section 2.2.1.5).	71
Tableau 9. Intensité de la croissance de T3 sur les milieux solides à base de lisier partiellement traité (juin 2005).	71
Tableau 10. Comparaison des profils d'acide gras (%) de T3 et 60S1b avec d'autres espèces de la famille des <i>Bacillaceae</i>	76
Tableau 11. Résultat des galeries API-Zym des souches de <i>Ureibacillus thermosphaericus</i> , de <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (Sb1) , <i>Geobacillus toebii</i> (Sb2) et de la souche Sb3.	79
Tableau 12. Résultats des galeries API-Zym des souches de <i>Bacillus sp.</i> et <i>Bacillus thermocloacae</i>	80
Figure 1. Structure du phytate et produits de l'hydrolyse par la phytase. (Adapté de Lei et Stahl, 2001)	20
Figure 2. Structure de la paroi cellulaire des cellules de bois ainsi que l'arrangement moléculaire des différents constituants cellulotiques de la paroi. (Adapté de Béguin et Aubert, 1994).	24
Figure 3 Mécanismes d'action des endo et exoglucanases. (Adapté de Rabinovich et al. 2002). Tandis que les endoglucanases vont dégrader l'intérieur de la molécule, les exoglucanases s'attaquent aux extrémités réductrices. L'action des endoglucanases augmente le nombre de sites où les exoglucanases peuvent agir et vice-versa, créant une action dite de synergie dans la dégradation de la cellulose en cellobiose.	26
Figure 4. Mécanismes d'action par inversion ou rétention des glycosidases (tiré de Withers, 2001). Les deux mécanismes utilisent un oxocarbonium comme intermédiaire ionique. Ce dernier sera lié de façon covalente avec l'enzyme dans le mécanisme par rétention.	28
Figure 5. Structure de différentes hémicelluloses ainsi que les enzymes associées à leur dégradation(Adapté de Shallom et Shoham, 2003).	37
Figure 6. Culture de la souche 60S1b dans différents milieux liquides.	73
Figure 7. Microscopie électronique de <i>Bacillus</i> T3. a) Grossissement de 17 000X ; b) coupe ultra-mince, grossissement de 44 000X ; c) coupe ultra-mince, grossissement de 88 000X.	74

Figure 8. Arbre phylogénétique de la famille des <i>Bacillaceae</i> et des souches T3 et 60S1b .	77
Figure 9. Concentration en phosphate mesurée lors de l'essai enzymatique des surnageants de culture après 24 et 48h d'incubation des souches Sb1, Sb3 et <i>Bacillus subtilis</i> DS11	82
Figure 10. a et b) Résultat de l'amplification du gène codant pour la phytase sur les différents échantillons testés. c) Amplification des gènes de la phytase de <i>Bacillus</i> DS11 et de <i>Bacillus licheniformis</i> .	83
Figure 11. Test d'activité xylanase d'un surnageant de culture de la souche Sb1.	84
Figure 12. Effet du pH sur l'activité de la xylanase de <i>G. thermodenitrificans</i> Sb1	85
Figure 13. Effet de la température sur l'activité de la xylanase de <i>G. thermodenitrificans</i> Sb1.	85
Figure 14. Stabilité de l'activité de xylanase à 70°C en présence de xylane.	86
Figure 15. Stabilité de l'activité xylanasique à 70°C en absence de xylane.	87
Figure 16. Effet du pH sur l'activité de la β -glucosidase effectué avec un extrait brut de <i>G. thermodenitrificans</i> Sb1. L'activité de la préparation était de 0.32UI/mg de protéines.	89
Figure 17. Effet de la température sur l'activité de la β -glucosidase retrouvée dans la fraction cytoplasmique de <i>G. thermodenitrificans</i> Sb1. L'activité de la préparation était de 0.49UI/mg de protéines.	89
Figure 18. Stabilité de l'activité de β -glucosidase retrouvée dans la fraction cytoplasmique de <i>G. thermodenitrificans</i> SB1 incubée à 90°C en présence de substrat. L'activité de la préparation était de 0.32UI/mg de protéines.	90
Figure 19. Stabilité de l'activité de β -glucosidase retrouvée dans la fraction cytoplasmique de <i>G. thermodenitrificans</i> SB1 incubée à 90°C en absence de substrat. L'activité de la préparation était de 0.32UI/mg de protéines.	90
Figure 20. Coloration au bleu de Coomassie des protéines des zymogrammes de la fraction cytoplasmique de SB1. a) Gel IEF, b) gel SDS de la fraction cytoplasmique de SB1, c) gel SDS après incubation overnight (o/n) à 80°C dans une solution de MUG ou de pNPG.	92

Table d'abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomal
ATAD	Autothermal Thermophilic Aerobic Digestion
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Bovine Serum Albumine
BSM	Basal Salt Medium
BSME	Basal Salt Medium Enrichi
CBD	Cellulose Binding Domain
CMC	CarboxyMéthyl Cellulose
D.O.	Densité Optique
HAP	Histidine Acide Phosphatase
DBO	Demande Biologique en Oxygène
DCO	Demande Chimique en Oxygène
DGGE	Density Gradient Gel Electrophoresis
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramme
h	Heure
IEF	Isoelectric Focusing Electrophoresis
L	Litre
M	Molaire
N	Normale
nm	Nanomètre
O/N	Overnight
PAHBAH	p-HydroxyBenzoic Acid Hydrazide
PCR	Polymerase Chain Reaction
pNPG	p-nitrophényl-β-D-glucoside
PP	Protéose Peptone
RBB-xylane	Brilliant Blue xylane
RBS	Réacteur Séquentiel en Batch
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
TIA	Terpénoïdes indoles alkaloïdes
TSA	Tryptic Soy agar
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
V/v	Volume/volume

Introduction

Au Québec, l'industrie du porc est source de plusieurs milliers d'emplois et une grande source de revenus et de bénéfices. Cependant, le succès de l'industrie porcine amène toutefois à quelques désavantages, en particulier, la production d'énormes volumes de lisier de porc. Ce lisier est très malodorant et est fortement chargé en matière organique, en azote ammoniacal, en phosphore et en microorganismes pathogènes. L'épandage du lisier pour la fertilisation des terres agricoles est la méthode utilisée par l'éleveur pour se départir du lisier. Malheureusement, plusieurs facteurs en limitent fortement l'épandage, tels un nombre insuffisant de terres agricoles, la présence en surplus de phosphore dans la terre, la non-acceptation par l'entourage de cette approche à cause des mauvaises odeurs et des dangers de pollution des eaux. Des réglementations gouvernementales présentes et à venir obligeront les éleveurs à devoir traiter leurs lisiers. Dans ce contexte, un procédé microbiologique de traitement du lisier est en développement à l'échelle laboratoire à l'INRS-IAF (Laboratoire de P. Juteau). Ce procédé implique un biotraitement aérobie thermophile effectué dans un réacteur de 50 litres (Juteau et al, 2004). Ce bioréacteur auto-chauffant peut atteindre des températures de 72-74°C. Une flore microbienne thermophile s'y est développée et a été partiellement caractérisée (Tremblay, 2003; Juteau et al, 2003). Ces travaux ont permis l'isolement de plusieurs microorganismes aérobies thermophiles dont certains n'avaient jamais été cultivés antérieurement. Les microorganismes isolés de ce bioréacteur se sont ajoutées à d'autres microorganismes aérobies thermophiles isolés à la fin des années '80 dans le laboratoire de R. Beaudet (Beaudet et al, 1990) pour constituer une banque de bactéries thermophiles. Les bactéries constituant cette banque font partie d'espèces bactériennes dont leur potentiel à produire des enzymes thermostables pour des applications industrielles a été très peu étudié.

Certaines souches isolées du bioréacteur constitueraient une nouvelle espèce bactérienne jamais cultivée. Par une approche moléculaire, des bactéries similaires dénommées alors *Bacillus* Ppd14 avaient été détectées dans un compost hyper-thermophile mais sans pouvoir être cultivées (Dees et al, 2001). Les souches T3 et 60S1b représentantes de cette espèce sont à l'étude dans notre laboratoire. Des résultats préliminaires ont montré que la

souche T3 est un bacille donnant une réponse négative à la coloration de Gram, son contenu en G+C est de 43.6 mol %. Elle peut croître entre des valeurs de pH de 8.0 à 8.5, à des températures entre 50 et 72°C où la température optimale est 65-70°C. Les deux souches sont gélatinase positive (galerie API 20E) et certaines de leurs propriétés phénotypiques ont été évaluées sur des galeries API 50CH. Elle peut croître uniquement sur milieu solide ou liquide contenant du lisier partiellement traité prélevé du bioréacteur après 24 heures de traitement (Beaudet, non publié). Des travaux sont donc nécessaires afin de caractériser davantage ces bactéries, notamment pour déterminer si elles ont une paroi de type Gram positive ou négative, rechercher un milieu de culture favorable à leur croissance autre que celui utilisant le lisier de porc, connaître la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S et déterminer son arbre phylogénétique.

De nombreux microorganismes thermophiles et hyperthermophiles, aérobies et anaérobies ont été isolés dans différents environnements terrestres souvent extrêmes. Ces microorganismes offrent de grandes possibilités de recherches fondamentales pour connaître leurs mécanismes de survie dans des conditions extrêmes et ouvrent la porte à leur utilisation dans de nombreuses applications industrielles notamment par les enzymes thermostables que certains produisent. Ainsi, les thermozymes présentent habituellement une meilleure résistance aux facteurs environnementaux tels les pH élevés ou faibles, de hauts taux de salinité, des pressions atmosphériques élevées et des températures thermophiles. Tous ces facteurs rendent les thermozymes intéressantes pour l'industrie où il est fréquent que les conditions environnementales rencontrées ne sont pas optimales pour l'utilisation d'enzymes mésophiles. Le marché pour les enzymes en industrie connaît une croissance ininterrompue depuis plusieurs années. Parmi les classes d'enzymes recherchées se trouvent les estérases, les lipases, les protéases et les glycosidases, réparties dans divers secteurs de l'industrie.

L'industrie des pâtes et papier utilise depuis longtemps la xylanase pour améliorer le blanchiment de la pâte de papier Kraft. Les températures et pH élevés retrouvés lors de ce procédé appellent une enzyme thermostable et alcaline. Les xylanases sont depuis peu utilisées également dans diverses autres applications commerciales, tels dans la

préparation de la pâte de pain, en alimentation animale, et bien d'autres encore. Les cellulases, quant à elles, sont utilisées pour modifier la texture du bois lors du battage de la pâte de papier. Elles sont également retrouvées dans l'industrie des détergents, des textiles et en alimentation où elles font partie d'un ensemble de protéines appelées enzymes de macération. La β -glucosidase est également retrouvée dans ce groupe d'enzymes utilisées en industrie. Cependant, l'utilité principale des β -glucosidases thermostables et thermoactives se retrouve dans la synthèse de glycosides qui peuvent avoir des utilités au niveau pharmaceutique ou dans la production de molécules utilisées dans l'industrie des pesticides.

Les phytases sont parmi les enzymes les plus demandées dans l'industrie de l'alimentation animale. En effet, ces dernières participent à la libération de phosphore emprisonné sous forme d'acide phytique dans la paroi végétale. Comme une grande quantité du phosphore est ainsi stocké dans les plantes utilisées dans l'alimentation animale, le système digestif de l'animal doit être en mesure de dégrader l'acide phytique pour pouvoir absorber ce nutriment nécessaire à sa croissance. Cependant, des animaux mono-gastriques tels le porc et le poulet ne possèdent pas le gène nécessaire pour produire la phytase et absorber le phosphore et autres minéraux nécessaires à leur croissance. Une importante quantité de phosphore est ainsi rejetée dans les excréments de l'animal et se retrouve dans le lisier. L'addition de phytase à la nourriture favorise la croissance du porc et diminue la quantité de phosphore retrouvé dans le lisier. Plusieurs phytases ont déjà été commercialisées, mais il y a un manque évident de phytases thermostables capables de résister aux hautes températures retrouvées normalement dans le processus de granulation de la nourriture et d'agir dans les conditions retrouvées dans les intestins de l'animal.

Les principaux objectifs de ce projet sont 1) de compléter la caractérisation des souches T3 et 60S1b appartenant à une nouvelle espèce; 2) d'évaluer le potentiel des bactéries constituant notre banque de bactéries thermophiles à sécréter des enzymes thermostables ayant des possibilités d'application industrielle et 3) d'effectuer une caractérisation préliminaire des enzymes les plus intéressantes de manière à évaluer leurs propriétés au

niveau de leur thermo-stabilité et de leurs conditions optimales d'activités, par exemple, en fonction du pH. Comme ces bactéries ont été isolées d'un réacteur aérobique thermophile traitant le lisier de porc, une attention particulière sera portée à la production de phytase. L'isolement d'une enzyme thermostable qui serait efficace dans les conditions retrouvées dans le système digestif du porc serait un atout important dans la problématique environnementale liée à son élevage.

1. Revue bibliographique

1.1 Traitements biologiques du lisier de porc

1.1.1 Le lisier de porc

L'industrie du porc est importante pour le Canada. Au Québec seulement, depuis 1997, le nombre de têtes produites est passé de 5 700 000 à 7 500 000 en 2003. Une telle production représente un apport important à l'économie du Québec avec des retombées économiques de 3.1 milliards de dollars en 2003 (Fédération des producteurs de porcs du Québec). L'industrie porcine est la source de plus de 28 200 emplois, directs ou indirects.

En conséquence de l'importance de la production porcine, la quantité de lisier produit est très grande et représente jusqu'à 11 millions de mètres cubes de déjections par année. Le lisier est une substance riche en nutriments, comme par exemple, l'azote et le phosphore, servant à la croissance de différents végétaux comestibles. Le lisier est par conséquent fréquemment utilisé comme fertilisant pour les terres agricoles. Ceci permet de valoriser une substance qui sans quoi serait considérée comme un déchet. Depuis l'année 2000, de nouvelles réglementations ont été instaurées au Québec pour contrôler la quantité de nutriments, dont le phosphore, ajoutés aux sols par épandage de lisier. La quantité de lisier à épandre en vue de fertiliser le sol est donc calculée selon la concentration de phosphore retrouvée dans le lisier et celle déjà présente dans les sols. Les normes sur les concentrations de phosphore et d'azote permises varient selon la culture et le nombre d'hectar à fertiliser (FPPQ, 2002).

La raison d'une telle réglementation est la possibilité d'engendrer une pollution des cours d'eau environnants et des nappes phréatiques par percolation et ruissellement d'une grande quantité de nutriments tels le phosphore, l'azote et de la matière organique à partir des sols agricoles surchargés (Tremblay, 2003). Le phosphore et l'azote s'adsorbent facilement aux particules de terre. Cependant, en trop fortes concentrations, ils peuvent être lessivés lors des pluies ou lors de la fonte des neiges puis atteindre les cours d'eau. La présence de ces nutriments dans les plans d'eau permet une croissance accrue des plantes aquatiques et des cyanobactéries (Miner, 1999). De plus, des composés comme

l'ammoniac et les nitrites peuvent devenir toxiques pour la faune aquatique et pour les humains. Bien qu'il n'y ait aucun effet du stockage du lisier dans les fosses prévues à cet effet sur la qualité des eaux souterraines adjacentes, il a été démontré que l'utilisation du lisier comme fertilisant lorsque les normes et les réglementations d'épandage ne sont pas respectées, peut avoir un impact négatif sur les concentrations d'azote, la présence de microorganismes dans les eaux souterraines et dans les puits résidentiels d'eau potable et sur la quantité de chlore utilisée pour le traitement de l'eau potable.

La présence de microorganismes pathogènes dans le lisier est également un facteur de risque pour la santé humaine et animale. La présence d'espèces telles *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* et *Cryptosporidium* et de différents virus et parasites dans le lisier de porc a été rapportée par plusieurs auteurs (Hutchison et al, 2004a et b; Pell, 1997; Tremblay, 2003). La quantité d'agents pathogènes décroît habituellement avec le temps, ce qui signifie qu'un lisier ayant été stocké plus longtemps devrait être moins contaminé par des espèces potentiellement pathogènes que du lisier frais. Cependant, Hutchison et al. (2004) ont observé que les populations d'agents pathogènes demeuraient stables dans le temps puisque du lisier frais était ajouté à intervalles réguliers dans les fosses à lisier. Plusieurs facteurs affectent la concentration en microorganismes pathogènes du lisier frais, comme par exemple, l'alimentation, la densité d'animaux et l'âge du lisier (Hutchison et al. 2004a, b). En utilisant du lisier non traité comme fertilisant, on perçoit aisément que plusieurs problèmes de contamination de végétaux peuvent survenir, tel dans les produits destinés à la consommation (ex. laitues), ainsi que dans les plans d'eaux récréatifs et dans les réservoirs d'eau potable municipaux. Ce fut le cas, en particulier, en Ontario en 2000 lorsque la réserve d'eau municipale de Walkerton fut contaminée par différents microorganismes pathogènes d'origine fécale (Juteau et al, 2004). Dans une étude menée par Garcia et Beirith (1996), il y aurait eu augmentation du nombre de puits résidentiels contaminés par les coliformes fécaux (34% des puits) et par les nitrates (14% des puits) aux alentours des fermes d'élevage en Ontario entre 1984 et 1994.

Comme plusieurs régions du Québec ont des terres agricoles qui sont en surplus d'éléments fertilisants limitant l'épandage, le manque de terres disponibles, les pressions du public en général concernant les mauvaises odeurs du lisier et les risques environnementaux obligeront plusieurs producteurs à traiter leurs lisiers. Il existe différentes approches pour traiter le lisier de porc, dont la séparation des solides et liquides, soit par méthode mécanique ou physico-chimique où la partie solide est stabilisée par compostage, ou par les traitements biologiques aérobies ou anaérobies en conditions psychrophile, mésophile ou thermophile. Les traitements envisagés par les producteurs de porc sont évalués en fonction des problématiques rencontrées sur la ferme: volume de lisier à traiter, disponibilité des terres pour l'épandage, sols en excédents d'éléments fertilisants, pression du voisinage pour les mauvaises odeurs, etc. Les solutions disponibles sont peu nombreuses, coûteuses et leurs efficacités sur le terrain n'ont pas toujours été démontrées.

1.1.2 Traitements anaérobies

Les bioréacteurs aérobie et anaérobie possèdent chacun des avantages et des désavantages qui justifient leur emploi dans différentes applications. Ce mémoire visant surtout les traitements aérobies, les procédés anaérobies seront donc très brièvement abordés. Le stockage du lisier dans des fosses dans l'attente de pouvoir l'utiliser comme engrais ou de le faire traiter représente la première étape de traitement biologique de ce dernier. Les conditions des fosses à lisier sont anaérobies, conditions idéales pour la croissance d'espèces microbiennes anaérobies et facultatives. Ces dernières sont cependant responsables en grande partie de la production de molécules odoriférantes tels les acides gras volatiles, l'ammoniac, les indoles et phénols et les composés sulfureux volatils (Zhu, 2000). De plus, le méthane produit pendant le stockage du lisier n'est pas récupéré et contribue à l'effet de serre (Moller et al, 2004). Le lisier peut demeurer dans ces fosses pour une durée allant jusqu'à 1 an (Mohaibes et Heinonen-Tanski, 2004). Selon le même principe, des lagunes à lisier anaérobies sont aussi utilisées pour réduire la quantité de nutriments du lisier et diminuer les concentrations en microorganismes pathogènes, mais tout comme les fosses à lisier, elles génèrent une grande quantité d'odeurs. On note aussi l'utilisation de réacteurs biologiques séquentiels (RBS) et les systèmes UASB (Upflow

Anaerobic Sludge Blanket) pour le traitement du lisier de porc (Massé et al, 1996; Ng, 1989; Ferreira et al, 2003).

Dans tous ces cas, la flore bactérienne des traitements anaérobies possède comme caractéristique de transformer les nutriments en CO_2 et en CH_4 , ce dernier pouvant être récupéré pour fins énergétiques. Dans les bioréacteurs, elle forme préférentiellement des flocs ou granules bactériens, ce qui augmente la densité de bactéries par unité cube et lui assure une meilleure rétention dans le réacteur dû à sa sédimentabilité accrue. Un des avantages principaux des réacteurs anaérobies est leur capacité à produire peu de boues pour un maximum d'activité, donc moins de problèmes dus à l'élimination de ces dernières. Cependant, ils requièrent un temps de rétention hydraulique plus long que les traitements aérobies et ne peuvent traiter des effluents industriels très chargés (Schwarzenbeck et al, 2005). La flore du système est cependant plus sensible aux arrêts imprévus du système de traitement que celle des réacteurs aérobie.

1.1.3 Traitements aérobies

Outre les traitements anaérobies, plusieurs études ont été effectuées sur l'efficacité des traitements aérobies du lisier et autres substances riches en matières organiques. Différents procédés sont rapportés dans la littérature : systèmes de lagunes compartimentées et aérées (de la Noüe et al, 1994), systèmes de boues activées dans de grands bassins ou de petites enceintes ayant une forte agitation (Atlas et Bartha, 1997), systèmes de biofiltres aérés (Doyle et al, 1986, Westerman et al, 2000). Des réacteurs biologiques séquentiels où deux bioréacteurs aérobies et/ou anaérobies sont couplés, ont également été utilisés pour divers effluents tel le lixiviat de terrains de remplissage, le lixiviat d'écorce, le lisier de porc etc. (Kalyuzhnyi et al, 2003 ; Frigon et al, 2003 ; Ferreira et al, 2003). Une caractéristique avantageuse des traitements aérobies du lisier de porc, par rapport aux réacteurs anaérobies, est la stabilisation et l'élimination par la flore indigène des substances du lisier qui sont responsables des odeurs nauséabondes (Ndegwa et al, 2003).

Un problème majeur des traitements aérobies est la production importante de boues de traitement, 6 fois plus élevée que chez les traitements anaérobies, causées par la multiplication des microorganismes du réacteur ou des lagunes. En effet, tout système aérobie devrait être conçu de façon à ce que le taux de conversion des matières organiques soit maintenu sous le niveau maximal de croissance des bactéries, de façon à limiter leur croissance (Mulder et al, 2001). Les boues engendrées par les traitements anaérobies peuvent également être problématiques puisque le type de traitement ne permet pas l'oxydation complète des substances organiques. La quantité de matière organique résiduelle devra être réduite avant que les boues puissent être disposées de façon sécuritaire pour l'environnement.

Un exemple de bioréacteur aérobie est le réacteur séquentiel en batch (SRB) développé dans les années 1970. Comme son nom l'indique, ce réacteur est alimenté par batch, où chaque batch est traitée par la flore indigène, suivi par un cycle de repos où la flore sédimente au fond du réacteur. Pour certains SBR à basse capacité de tampon hydraulique, un cycle festin-famine est appliqué pour assurer une meilleure stabilité de la population microbienne tout en permettant aux bactéries, lors de la période de famine, d'utiliser les nutriments qu'elles auront emmagasinés pendant la période de festin (Wilderer et McSwain, 2004). La biomasse du SRB est préférentiellement sous forme de biofilm (granulée ou sur un support artificiel) qui comme mentionné plus haut, possède un temps de rétention plus élevé et une meilleure sédimentabilité que la biomasse en suspension. Cependant, la diffusion des nutriments dans le biofilm est un facteur limitant l'efficacité du réacteur (Wilderer et al, 2004). En contrepartie, différentes couches du biofilm peuvent contenir divers types de populations se complétant dans leur activité. De plus, dans les couches internes, il est possible de retrouver un micro-climat anaérobie permettant la croissance de bactéries anaérobies pouvant être bénéfiques pour l'efficacité du réacteur. Une activité de nitrification et de dénitrification a d'ailleurs été observée dans plusieurs SRB sans qu'il y ait de cycles aérobie/anaérobie (Wilderer et McSwain, 2004).

1.1.4 Traitement aérobie thermophile

Le métabolisme catabolique des bactéries produit naturellement de l'énergie. Dans un réacteur contenant un substrat possédant une DCO minimale de 20 000 à 25 000 mg/L tout en étant bien aéré, l'activité de la flore bactérienne peut mener à l'augmentation de la température du réacteur (Banat et al, 2000). Si ce dernier est bien isolé et les pertes de chaleur minimisées, cette température peut se maintenir et dépasser les 45°C. Selon LaPara et Alleman (1999), un bioréacteur fonctionnant à des températures supérieures à 45°C serait considéré comme un processus thermophile bien que la définition d'une bactérie thermophile dit que cette dernière doit pouvoir croître à des températures supérieures à 55°C. Étant donné que l'efficacité du métabolisme bactérien dépend de la concentration en oxygène du réacteur et que la demande en oxygène pour un bioréacteur thermophile est de 14% plus élevée qu'un réacteur mésophile, un aérateur à haute efficacité de transfert d'oxygène devra être utilisé pour minimiser les pertes de chaleur. Un aérateur fonctionnant par aspiration d'air (de type Venturi) limite bien les pertes de chaleur (Juteau et al, 2004). Le métabolisme rapide des bactéries du bioréacteur thermophile les rend moins susceptibles aux variations du substrat, de température et de pH que les flores anaérobies. Les réacteurs thermophiles sont caractérisés par un taux de dégradation plus élevé, ainsi que par une production plus faible de boues, bien que ces dernières soient plus difficiles à séparer de l'effluent (LaPara et Alleman, 1999). Il en résulte une durée de traitement généralement plus courte que leur contrepartie mésophile. De plus, il a été noté que la qualité de l'effluent traité des réacteurs aérobie thermophiles était supérieure à celui des traitements conventionnels anaérobies (Sonnleitner et Bomio, 1990). LaPara et al. (2000a) constatent cependant que la capacité à digérer différents substrats par la flore d'un réacteur thermophile était moindre que celle des bioréacteurs mésophiles dû à une diversité plus faible, ce qui, en fin de compte, diminuait la qualité finale de l'effluent traité.

Selon une étude de Branconnier et al. (1998), une température de traitement élevée, permettrait d'éliminer les bactéries pathogènes du lisier beaucoup plus rapidement qu'en températures mésophiles. La majorité des bactéries pathogènes sont mésophiles et meurent à des températures avoisinant 45-50°C. Certaines bactéries sporulantes sont plus

résistantes à la chaleur, tel *Clostridium sp.* À 40°C, une période de 40 jours de stabilisation doit être respectée pour la destruction des pathogènes. À 50°C, 55°C, 60°C, et 70°C, une période de 3 jours, 15 heures, 2 heures, et 7 minutes respectivement serait suffisante pour éliminer les pathogènes du réacteur en absence de solides (Mohaibes et Heinonen-Tanski, 2004). En pratique, des temps plus longs de rétention ont été observés pour la destruction totale des microorganismes pathogènes, i.e 36h à 55°-60°C à pH 8.0 (Tremblay, 2003; Carrington et al, 1998). Juteau et al. (2004) ont pu démontrer l'élimination de *Clostridium* d'un bioréacteur thermophile traitant le lisier de porc après 3 jours de traitement à 60°C.

Un réacteur aérobique thermophile particulièrement performant a été développé par l'USEPA (1990) pour traiter des effluents liquides. Ce dernier se base sur la capacité auto-chauffante du métabolisme bactérien mentionné plus haut. L'efficacité de réduction de la demande chimique en oxygène (DCO) de l'ATAD (Autothermal Thermophilic Aerobic Digestion) était évaluée à 40-45%. Dans certains réacteurs, une réduction de la DCO, variant entre 70-90%, et une réduction allant jusqu'à 98% de la demande biologique en oxygène (DBO) a pu être observée en 3 jours (Barr et al, 1996; Beaudet et al, 1990; Juteau et al, 2004). Bien que ce réacteur ne soit pas approprié à la base pour des effluents très chargés, plusieurs études ont démontré la possibilité de modifier l'ingénierie de l'ATAD pour l'adapter aux déchets plus chargés en matières organiques tels le lisier de porc (Juteau et al, 2004), et les déchets de l'industrie alimentaire (Black et al, 1982).

1.1.5 Biotraitement thermophile du lisier de porc à l'INRS-IAF

Dans les années 80, une équipe de l'INRS-IAF a étudié plusieurs facettes du traitement aérobique du lisier de porc (Bisaillon et al, 1984; Bourque et al, 1987; Blouin et al, 1990; St-Arnaud et al, 1991) et ont conclu qu'un traitement aérobique thermophile permettait d'obtenir, en une seule étape, une stabilisation rapide du lisier, l'élimination des substances malodorantes et la destruction des pathogènes (Beaudet et al, 1990). De plus, l'augmentation du pH autour de 9 au cours du traitement, la température élevée et l'aération permettaient la volatilisation de l'ammoniac et sa récupération sous forme de sel d'ammonium concentré dans un milieu aqueux acide. Bien que ces essais aient été

effectués à petit volume avec un système de chauffage externe, ces résultats montrent tout le potentiel de l'approche aérobique thermophile dans le traitement du lisier de porc. Au début des années 2000, Juteau et al. ont étudié le traitement aérobique thermophile du lisier de porc dans des réacteurs auto-chauffant de 50 litres (38 litres utiles) dans des conditions réalistes par rapport à un traitement à pleine échelle (Juteau et al, 2004). Le lisier utilisé provenait de la préfosse d'une porcherie effectuant l'engraissement des porcs. Les bioréacteurs ont été initialement inoculés avec des boues activées provenant d'une usine de traitement des eaux usées, d'un extrait de compost et d'un inoculum enrichi, lentement adapté au lisier de porc et aux températures thermophiles (boues activées + compost). En utilisant des aérateurs de type Venturi, des températures de 75° C ont été atteintes sans chauffage externe. Ces conditions étaient toutefois peu propices à l'activité des bactéries où les meilleures performances de réduction de la DCO étaient obtenues à 50° C. Afin de permettre l'élimination des microorganismes pathogènes, une température de 60° C a été utilisée. Dans ces conditions, ils ont obtenu une baisse de 98% de la DBO₅, la stabilisation du lisier et l'élimination des mauvaises odeurs. Les conditions du traitement favorisent aussi la volatilisation de l'ammoniac et sa récupération sous forme de sel d'ammonium concentré (Beaudet et al, 1990; Juteau et al, 2004). Quant aux fortes concentrations de phosphore soluble du lisier, le pH alcalin obtenu au cours du traitement permet sa précipitation sous forme de struvite ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) et d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$) (Tremblay, 2003; Juteau et al, 2004; Suzuki et al, 2002). Dans le procédé développé, la récupération des solides par centrifugation était effectuée après le traitement thermophile ce qui permettait l'obtention de solides de meilleure qualité en terme de densité, de phosphore, d'odeur et de stabilité comparativement aux solides obtenus du lisier non traité. À l'inverse des procédés qui comprennent des étapes de nitrification et de dénitrification, celui-ci a l'avantage de récupérer l'azote et le phosphore du lisier et permettre éventuellement leur utilisation comme fertilisant en agriculture.

1.1.6 Flore microbienne des traitements aérobies thermophiles

La flore microbienne est à la base de l'activité des biotraitements d'où l'importance de mieux connaître les espèces bactériennes qui la composent. La grande concentration de matières organiques indique la présence majoritaire de bactéries aérobies hétérotrophes. Il

est cependant notoire que moins de 1% des organismes présents dans un échantillon d'un gramme de sol sont cultivables par les méthodes classiques (Amann et al, 1995). Plusieurs bactéries ont pu être isolées et identifiées à partir des différents traitements aérobies thermophiles. En effet, plusieurs auteurs (Beaudet et al, 1990; Sürücü, 1999; Juteau et al, 2004b; Gagné et al, 2001; Lapara et Alleman, 1999; Tiago et al, 2004) ont pu démontrer la présence de différentes espèces mésophiles et thermophiles de *Bacillus* ainsi que la présence de *Thermus*, *Ureibacillus*, *Geobacillus* et différents actinomycètes par les méthodes traditionnelles. En particulier, *Geobacillus stearothermophilus* a été retrouvé dans une majorité de bioréacteurs thermophiles.

Selon Wagner et al. (1993), les méthodes traditionnelles d'isolement de bactéries seraient inadéquates pour étudier convenablement la diversité d'une population microbienne. Par conséquent, plusieurs méthodes ont été mises au point pour parer à la difficulté d'isoler de nouvelles espèces en culture pure. Le gel d'électrophorèse à gradient de densité (PCR-DGGE) représente l'une de ces méthodes. Ce dernier se base sur le principe d'électrophorèse sur gels d'agarose et sur l'amplification partielle par PCR du gène codant pour l'ARN ribosomal. La présence d'une espèce microbienne dans un échantillon est mise en évidence par l'apparition d'une bande particulière à cette espèce sur le gel. Cette méthode présente comme avantage majeur de ne pas requérir d'étape nécessitant l'utilisation de milieux de culture, ce qui élimine le biais causé par l'impossibilité de cultiver la majorité des bactéries provenant de l'environnement. De cette façon, il est possible d'obtenir une idée précise des populations présentes dans un échantillon et de leur abondance relative (LaPara et al, 2000a). La fiabilité de cette méthode n'est cependant pas totale, la présence d'une bande ne représentant pas toujours une espèce unique.

Plusieurs études ont été menées sur les flores provenant des bioréacteurs et des compostages thermophiles utilisant le PCR-DGGE. LaPara et al. (2000b) démontrent que la diversité de la population bactérienne des réacteurs thermophiles serait moins élevée que celle des bioréacteurs mésophiles. Le réacteur aérobie thermophile possède plusieurs phases de températures, mésophile et thermophile, favorisant différentes populations

actives. Selon une expérimentation menée par LaPara et al. (2000b) sur des réacteurs aérobies thermophiles en continu traitant des eaux usées synthétiques, seul un petit nombre d'espèces (25) serait présent dans le réacteur pour l'ensemble des échelles de température du réacteur. Ainsi, selon la température du réacteur, il était possible d'identifier différentes espèces spécifiques à une échelle de température particulière. LaPara et al. (2000b) ont identifié différents isolats provenant du groupe des β -protéobactéries ainsi que plusieurs espèces anaérobies. En tout, seulement 10 bandes représentant chacune une espèce bactérienne sont apparues sur PCR-DGGE à partir d'un échantillon provenant d'un réacteur à 65°C.

Dans cette étude ainsi que pour d'autres réacteurs traitant les eaux usées d'usines de pâtes et papier ou de fermentation, aucune espèce de *Bacillus* n'a pu être identifiée (LaPara et al, 2000a), et ce, malgré le fait que les méthodes de culture conventionnelles indiquaient la présence majoritaire de ce genre dans les traitements (Sonnleitner et Bomio, 1990 ; Beaudet et al, 1990; Juteau et al, 2005). Dans le bioréacteur développé par Juteau et al. (2004, 2005), l'utilisation du PCR-DGGE a démontré l'abondance des *Bacilli* (*Geobacillus sp.*, et *Bacillus sp.*) dans le traitement thermophile du lisier de porc. De même, cette classe est également présente en forte abondance dans les composts thermophiles (Dees et Ghiorse, 2001; Ishii et Takii, 2003). Plusieurs espèces inconnues ou non cultivées de type *Bacillus* ont aussi été retrouvées dans les bioréacteurs ou dans les composts avec l'aide du PCR-DGGE (Dees et al, 2001; Juteau et al, 2004b). Dees et al. (2001), par exemple, ont identifié d'un compost hyperthermophile, une espèce bactérienne inconnue de type *Bacillus* qu'ils ont nommée pPD14 et qu'ils n'ont pu cultiver. Cette nouvelle espèce représentait l'espèce bactérienne la plus fréquemment retrouvée dans ce compost. Ces bactéries ont également été retrouvées dans le bioréacteur aérobie thermophile traitant le lisier de porc développé par Juteau et al. (2004a, 2004b) qui sont parvenus à en isoler plusieurs souches en culture pure sur un milieu à base de lisier partiellement traité (non publié). Il convient donc de mentionner la diversité des populations microbiennes retrouvées dans différents bioréacteurs thermophiles selon la provenance des eaux usées ou de l'effluent traité (Juteau et al, 2004b).

1.1.7 Les bactéries thermophiles

1.1.7.1 Généralités

Plusieurs habitats naturellement thermophiles sur la terre abritent une flore bactérienne spéciale, supportant les hautes températures. Il existe plusieurs catégories de bactéries poussant à des températures supérieures à 55°C. En effet, les bactéries dites thermophiles ont une température optimale de croissance supérieure à 55°C, alors que celles poussant à des températures supérieures à 65°C sont considérées comme étant des thermophiles extrêmes, et celles croissant à 80°C et plus sont nommées hyperthermophiles. Fréquemment, les bactéries thermophiles (toutes classes confondues) sont retrouvées dans des environnements extrêmes mis à part le facteur température. Par exemple, des pH très acides ou très basiques ou un degré de salinité très élevé ou faible peuvent être associés aux températures élevées (Wiegel et Kevbrin, 2004). Pour illustrer ceci, prenons comme exemple les bactéries aérobies strictes hyperthermophiles qui requièrent toutes obligatoirement un pH inférieur à 4.0 pour leur croissance. Plusieurs microorganismes thermophiles sont connus depuis plus de 100 ans comme par exemple, *Geobacillus stearothermophilus* (préalablement classifié comme *Bacillus stearothermophilus*). Bien qu'il y ait à la fois des bactéries aérobies et anaérobies thermophiles, seules les bactéries aérobies thermophiles seront retenues dans cet ouvrage.

La distribution géographique des bactéries thermophiles semble être beaucoup plus étendue qu'initialement présentée. Les sources géothermales, cheminées hydrothermales en mer profonde ainsi que les champs d'huile à haute température, ont depuis longtemps été identifiées comme étant l'habitat naturel des bactéries thermophiles (McMullan et al, 2004; Wiegel, 1998). Des genres tels *Thermus*, *Thermomicrobium*, *Geobacillus*, *Bacillus* et *Symbiobacterium*, entre autres, ont pu en être isolés (Brock et Freeze, 1969; Rhee et al, 2002; Wiegel et Kevbrin, 2004; Montanari et al, 2004; Schäffer et al, 2004; McMullan et al, 2004). Les bioréacteurs thermophiles et autres milieux thermophiles créés par l'activité humaine sont une autre source où des microorganismes thermophiles peuvent être isolés et identifiés. Il serait raisonnable de croire que la présence de bactéries thermophiles se limiterait à ces milieux adaptés à leurs besoins de croissance. Marchant et al. (2002) ont cependant démontré que des bactéries thermophiles extrêmes et

hyperthermophiles peuvent être retrouvées de façon ubiquitaire dans l'environnement après enrichissement de différents échantillons de sol provenant de divers endroits de par le monde. Bien que ces microorganismes ne puissent croître dans ces sols, en moyenne 10 espèces ont néanmoins pu être identifiées par RFLP dans chaque échantillon analysé, ce qui amène les auteurs à se questionner sur la fonction de ces microorganismes dans l'environnement.

1.1.7.2 Besoins nutritifs des bactéries thermophiles

Les besoins nutritifs des bactéries thermophiles sont différents de ceux des bactéries mésophiles. En effet, plusieurs auteurs ont noté un besoin particulier de vitamines, d'acides aminés tels l'histidine, la méthionine, la thiamine et la riboflavine, mais aussi de calcium et de magnésium pour stimuler ou permettre la croissance des bactéries (Sürücü, 1999). Chez les *Bacillus*, par exemple, certaines espèces nécessitent l'ajout d'urée, de chlorure d'ammonium, ou même d'ammoniac pour croître (Mair, 1986). De plus, certains problèmes peuvent survenir lorsque la température de croissance optimale de la bactérie devient plus élevée que 75°C. En effet, Kim et Lee (2003) notent une transformation des sucres et acides aminés d'un milieu par réaction de brunissement de Maillard à des températures de 90°C et plus, alors que Park et Lee (2000) constatent le comportement létal du L-pyroglutamate formé par la transformation du L-glutamate sous l'effet de la température à partir de 75°C. Il faut également considérer l'utilisation des agents gélifiants plus thermostables que l'agar, comme par exemple, du polysilicate ou de la gomme de gellan (Gelrite). Certaines bactéries hyperthermophiles ne peuvent pas croître sur milieu solide (Huber et al, 2000).

1.1.7.3 Les Bacillaceae

La famille des *Bacillaceae* est un groupe fort diversifié de bâtonnets Gram positifs, sporulés ou non, croissant à des températures psychrophiles, mésophiles, thermophiles et à des pH acides, basiques ou neutres. Il y a également mention d'espèces de *Bacillus* anaérobies aérotolérants bien qu'en général cette famille comporte majoritairement des espèces aérobies strictes. Plus particulièrement, le genre *Bacillus* est particulièrement hétérogène mais la production d'endospores est essentielle à la classification de nouvelles espèces dans ce genre (Mair, 1986). Les bactéries du genre *Bacillus* sont, de surcroît, très

utilisées en production industrielle pour leur capacité à produire de grandes quantités de protéines, ou pour leur métabolisme rapide et efficace (Schallmey et al, 2004). Certaines espèces sont même placées sur la liste du GRAS (considéré généralement comme sécuritaire) de la FDA. *Bacillus* est fréquemment retrouvé en forte majorité dans différents biotraitements par bioréacteur ou par compostage de diverses eaux usées, boues, etc. Plusieurs espèces inconnues thermophiles et mésophiles fortement apparentées aux *Bacillus* ont pu être identifiées par PCR-DGGE ou par RFLP de ces biotraitements (Gagné et al, 2001; Juteau et al, 2004b; Dees et Ghiorse, 2001).

En 2001, Nazina et al. ont procédé à la reclassification des *Bacillus* du groupe 5 dans le nouveau genre *Geobacillus*, groupe thermophile aérobic stricte homogène où la similarité des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16s s'élève entre 98.5-99.2%. *Geobacillus stearothermophilus* a été considérée comme la souche type du genre. Les *Geobacillus* sont fortement répandus dans l'environnement. Ils ont été isolés à partir de plusieurs sols de par le monde, dans des champs d'huile thermophiles, des sources géothermales et des bioréacteurs thermophiles (Schäffer et al, 2004; Hawumba et al, 2002; Kuisene et al, 2004, McMullan et al, 2004).

1.1.7.4 Les thermozymes

Beaucoup d'études ont porté sur les bactéries thermophiles et à leur habilité à produire des enzymes thermostables. Ces dernières ont par ailleurs été nommées thermozymes dû à leur optimum d'activité et à leur stabilité qui se situent au-delà de 60°C. Les enzymes ayant leur activité maximale au-dessus de 80°C sont considérées comme des enzymes hyperthermophiles (Li et al, 2005). Bien que les thermozymes possèdent les mêmes mécanismes d'action que les enzymes mésophiles, elles sont cependant légèrement différentes quant à leur structure, ce qui leur permet d'améliorer leur stabilité (Zeikus et al, 1998). Différents mécanismes sont employés, dont l'addition de ponts salins supplémentaires, d'interactions hydrophobiques et de liens hydrogènes. L'utilisation de différents acides aminés, telles les isoleucines, les alanines et les prolines en plus grande quantité dans les centres hydrophobiques, assure une meilleure efficacité d'organisation de la protéine (Bruins et al, 2001). La rigidité des thermozymes à la température de la pièce est beaucoup plus élevée que pour les mésozymes, mais redevient fluide (active) à

des températures thermophiles (Zeikus et al, 1998). On note aussi une meilleure stabilité des thermozymes pour une plus grande variété de pH, de salinité, de concentrations en solutés, etc. Les thermozymes peuvent donc être utiles dans différentes applications industrielles où elles remplacent avantageusement les mésozymes.

Un avantage majeur à l'utilisation de thermozymes en procédé industriel est la possibilité de conserver l'activité enzymatique désirée en conditions thermophiles, tout en prévenant la croissance de bactéries pathogènes présentes dans le milieu de réaction lorsque la température est supérieure à 70°C, et ce, en réduisant la viscosité des fluides (Bruins et al, 2001). Les conditions thermophiles peuvent également permettre la destruction des pathogènes. Ainsi, des thermozymes agissant sur les sucres, les lipases, les estérases et autres substrats ont déjà été utilisées dans différents domaines d'application tels l'alimentation humaine et animale, l'industrie des détergents, des pâtes et papier, du tannage, etc. (Pantazaki et al, 2002; Kirk et al, 2002). Le rôle des enzymes en industrie sera discuté dans la section suivante de ce mémoire.

1.2 Les enzymes dans l'industrie

1.2.1 Généralités

Depuis plusieurs années, l'intérêt pour les enzymes en industrie a considérablement augmenté proportionnellement au nombre croissant d'applications qu'elles ont démontrées. Au niveau mondial, le marché des enzymes est évalué entre 1.5 à 2 milliards de dollars (Godfrey et West 1996; Kirk et al, 2002) réparti en plusieurs secteurs d'activité telle l'alimentation humaine et animale, les pâtes et papier, ainsi que les textiles et détergents. La plus grosse part du marché va au domaine dit technique c'est-à-dire, aux pâtes et papiers, aux textiles et détergents, à l'alcool-essence, à l'amidon et au cuir (Kirk et al, 2002). Le domaine de l'alimentation humaine et le domaine de l'alimentation animale viennent en dernier lieu. L'intérêt pour les phytases, les cellulases et hémicellulases est à l'origine d'un grand développement du marché des enzymes dans les domaines de l'alimentation animale et dans l'industrie de production d'aliments de cette dernière décennie.

La majorité des enzymes utilisées en industrie sont hydrolytiques. Les protéases sont particulièrement utilisées dans les procédés de fabrication de fromage, de yogourt, etc. Leur implication dans les détergents permet d'éliminer différentes substances naturelles, telles les taches de fruits, par exemple. Les protéases sont également utilisées depuis peu dans le dépoilage et le battage des peaux de cuir, en remplacement de certains produits toxiques (Rao et al, 1998). Les carbohydrases sont placées en deuxième position après les protéases pour leur implication en industrie. On les retrouve surtout dans les procédés portant sur l'amidon, les textiles, les 'cuissons', l'alimentation animale, etc. (Godfrey et West, 1996). Les applications industrielles des cellulases et hémicellulases seront traitées plus en détail plus loin. L'émergence des lipases dans différents domaines, tels le bio-diésel, la synthèse de produits pharmaceutiques, la production d'herbicides, et les cosmétiques attire de plus en plus l'attention et appelle à une forte croissance de leur utilisation dans le futur (Jaeger et Eggert, 2002).

1.2.2 Les phytases

1.2.2.1 Le phytate

L'alimentation animale étant un moteur important de l'économie mondiale, plusieurs recherches ont été effectuées afin d'améliorer l'efficacité des processus de fabrication des aliments, augmenter l'absorption des nutriments et diminuer la pollution causée par l'élevage d'un nombre important de bétail.

Les légumes et céréales retiennent jusqu'à 80% de leur phosphore sous forme d'acide phytique en prévision de son utilisation lors de la germination des graines et comme messagers secondaires dans la transduction des signaux (Vohra et Satyanarayana, 2003; Berridge et Irvine, 1989). L'acide phytique ou le myo-inositol-dihydrogène-phosphate étant chargé négativement chélate les ions positifs divalents pour former des sels et prend alors le nom de phytate (figure 1). Ainsi, l'acide phytique est principalement retrouvé sous forme de phytate dans la plante (Lei et Porres, 2003).

L'alimentation animale est en majeure partie basée sur l'ingestion de farines d'origine végétale. Ces dernières possèdent par conséquent une forte concentration de phosphore

(jusqu'à 80%) sous forme de phytate (Vohra et Satyanarayana, 2003). Cette source abondante de phosphore qui représente de 1 à 5 % du poids comestible de certains végétaux n'est cependant pas métabolisée par les animaux monogastriques tels le porc et le poulet (Vohra et Satyanarayana, 2003). L'intégralité du phytate est alors rejetée dans

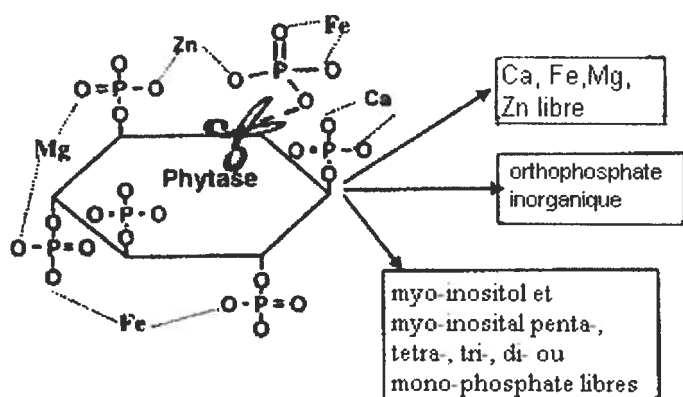


Figure 1. Structure du phytate et produits de l'hydrolyse par la phytase. (Adapté de Lei et Stahl, 2001)

l'environnement où l'ajout de phosphore résultant de sa dégradation peut causer une pollution sur les lieux de forte production animale. En effet, l'excédent de phosphore qui ne peut être accepté par le sol se retrouve lessivé par les pluies dans les cours d'eau environnants et participe à l'eutrophisation des lacs et des rivières (Pandey et al, 2001).

En tant qu'agent chélateur, le phytate peut également diminuer la biodisponibilité de certains métaux nécessaires à l'alimentation tels le calcium, le zinc, le fer et le magnésium (O'Dell and Savage 1960; Lei et Stahl, 2001). L'absence de métabolisation du phytate par les animaux monogastriques oblige l'addition de phosphore inorganique à l'alimentation, ressource non renouvelable et coûteuse (Lei et Stahl, 2001). En solution à ces problèmes, diverses études ont prouvé l'efficacité de l'addition de phytases dans l'alimentation animale. Il a été démontré que l'ajout de phytase à l'alimentation des jeunes poussins pouvait augmenter jusqu'à 60% la disponibilité du phosphore tout en réduisant de 50% le rejet de ce dernier dans les fèces (Vohra et Satyanarayana, 2003).

1.2.2.2 Les phytases

Les phytases sont classées sous le nom de myo-inositol-hexakisphosphate 6(3)-phosphohydrolases selon le comité de Nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire. Membres du groupe des phosphatases, elles hydrolysent le phytate en myo-inositol et en acide phosphorique, libérant par le fait même les métaux chélatés divalents qui redeviennent alors disponibles pour la nutrition des animaux. Les phytases se divisent en trois sous-groupes; les phosphatases histidine acides, les phosphatases acides pourpres et les phytases alcalines.

Les phosphatases histidine acides (HAP) forment un large groupe d'enzymes qui hydrolysent les monophosphoesters par un mécanisme en deux étapes et qui partagent le même groupe actif, selon le motif RHGXXRP, mais dont seul le groupe des phytases peut hydrolyser le phytate. La majorité des phytases connues appartiennent aux HAP mais se subdivisent en deux groupes où le premier comprend les phytases HAP à large spécificité (Ullah et Cummins, 1987) et le deuxième, les phytases HAP à spécificité étroite pour le phytate (Wyss et al, 1999). La spécificité au substrat chez le premier groupe serait contrôlée par la conformation et la charge des 6 acides aminés présents dans le site de spécificité au substrat de l'enzyme qui entoure le site actif de l'enzyme (Kostrewa et al, 1999; Mullaney et al, 2000). La présence de seulement 2 acides aminés dans le site de spécificité au substrat des phytases du second groupe rend ce dernier moins négativement chargé que celui du premier groupe, ce qui lui permet d'accepter un plus grand nombre de substrats moins chargés que l'acide phytique.

Les principales représentantes de la sous-classe des phytases HAP sont produites par différentes moisissures, levures, plantes et bactéries, tel *Aspergillus niger* et *Escherichia coli*. (Mullaney et Ullah, 2003). La phytase produite par *Aspergillus niger* NRRL 3135, phyA, est hautement spécifique à l'acide phytique et est déjà commercialisée comme additif alimentaire animal sous le nom de Natuphos.

Le second groupe de phytases fait partie du groupe des phosphatases acides pourpres. Elles ont été peu étudiées puisque l'activité spécifique pour le phytate y était faible. De

type métallo-protéiniques, GmPhy, provenant de la fève de soya et Apase 6 d'*Aspergillus niger* sont les seules enzymes de ce groupe connues à date (Mullaney et Ullah, 2003).

Le dernier groupe de phytases dites alcalines, ont été isolées à partir des bactéries de type *Bacillus*. Elles ne présentent aucune similitude avec les autres phosphatases retrouvées dans la littérature, i.e, le motif RHGXRXP des phosphatases histidine acides ainsi que les ponts disulfures retrouvés dans plusieurs phytases provenant des mycètes ne sont pas présents chez ces enzymes. La phytase alcaline possède une structure de « 6-bladed-propeller folding ». Son activité et sa stabilité sont métallo-dépendantes, elle comporte six sites de liaison au calcium, dont 3 à basse affinité, qui seraient essentiels à l'activité de l'enzyme en créant un environnement électrostatique favorable à la réaction. (Oh et al, 2001). La thermostabilité de l'enzyme résulte en partie des trois autres sites de liaison à haute affinité au calcium qui ne participent pas à l'activité de l'enzyme (Kerovuo et al, 2000a). L'ajout d'agents chélateurs tels l'EDTA inhibe complètement l'enzyme lorsque la concentration de l'agent dépasse celle des ions Ca^{2+} , mais pourrait augmenter l'activité de l'enzyme lorsqu'en plus faible concentration en empêchant la formation de complexes phytate-Ca peu solubles. Jusqu'à présent, seulement quelques phytases alcalines ont été clonées, dont la phytase de *Bacillus* sp. DS11 (Kim et al, 1998a), *168phyA* et *phyC* de *Bacillus subtilis* 168, et *phyL* de *Bacillus licheniformis* (Tye et al, 2002). Ces enzymes sont en majeure partie plus actives à des pH variant de 6 à 7.5 et à des températures de 40-80°C.

1.2.2.3 Applications commerciales des phytases

En comparant les caractéristiques des trois sous-classes de phytases, il est possible de déterminer différentes applications industrielles pour ces enzymes. L'utilisation la plus fréquente des phytases se situe en alimentation animale. Le processus de fabrication des farines végétales incluant une étape de lyophilisation qui atteint des températures de 60-80°C, exige l'addition d'une phytase thermostable à la farine. La phytase alcaline devient alors un choix intéressant pour cette application. Cependant, la température optimale d'activité de cette enzyme étant élevée, son activité pourra être diminuée dans le système digestif de l'animal dû aux températures plus basses qu'on y retrouve (Lei et Porres,

2003). De plus, avec un pH optimal d'activité se situant à la neutralité, les phytases alcalines ne peuvent être actives qu'à l'intérieur de l'intestin où le pH s'y trouve plus élevé. Dans ces conditions, l'enzyme doit être résistante à l'action des peptidases et à l'acidité de l'estomac. Plusieurs tests de susceptibilité aux protéases ont été effectués sur la phytase alcaline. La présence des ions Ca^{2+} chez l'enzyme induirait un changement de conformation qui diminuerait l'accessibilité des protéases à la structure interne de l'enzyme (Reinhardt et al, 1997; Spurway et al, 1997). Ainsi *phyC* de *Bacillus subtilis* présente 100% de résistance à la papaïne, la pancréatine et la trypsine (Kerovuo et al, 2000b).

Plusieurs conséquences dues à l'addition de phytases à l'alimentation des animaux ont été observées sur leur croissance et sur leur absorption des nutriments. En effet, Sebastian et al. (1996) ont observé une augmentation du poids corporel des poulets mâles et femelles de 13.2 et 5.8% respectivement, suite à une étude de 3 semaines sur des poulets de 180 jours. Ils ont également observé une augmentation de l'absorption du phosphore, du calcium, du cuivre et du zinc de 12.5, 12.2, 19.3 et 62.3% respectivement.

L'utilisation de phytases a aussi été notée en boulangerie. Effectivement, des taux de 0.29 à 1.05% d'acide phytique ont été mesurés dans le pain de blé entier. L'ajout de phytase à la pâte éliminerait complètement les résidus d'acide phytique (Vohra et Satyanarayana, 2003). Les conditions retrouvées dans la pâte de pain nécessitent une phytase acide (pH 4.5-5.0) qui ne requiert pas la présence d'ions Ca^{2+} . En ce cas, l'ajout de phytases HAP ou de phytases acides pourpres serait un bon choix.

1.2.3 Le complexe cellulolytique

1.2.3.1 La cellulose

La paroi végétale est la source des matières lignocellulosiques, matières biodégradables les plus abondantes sur la planète. En effet, les différents composés lignocellulosiques comprennent la cellulose, polymère insoluble de β -1,4-glucane, l'hémicellulose, formée de polysaccharides tels le glucane, le mananne et le xylane (le mélange diffère selon l'espèce de végétal), et finalement la lignine, composé polyphénolique (Wong et al,

1988). La paroi végétale est structurée de façon à ce que les fibrilles de cellulose qui forment son squelette primaire soient maintenues ensemble par l'association des molécules d'hémicellulose et de lignine. Cette dernière comporte également comme fonction de maintenir la cohésion entre les différentes cellules.

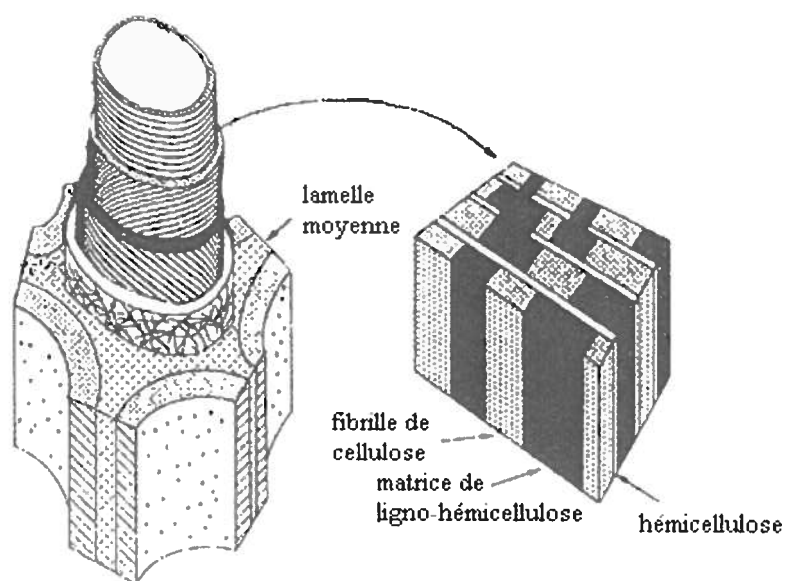


Figure 2. Structure de la paroi cellulaire des cellules de bois ainsi que l'arrangement moléculaire des différents constituants cellulosiques de la paroi. (Adapté de Béguin et Aubert, 1994).

Une molécule de cellulose comprend habituellement entre 100 à 10 000 unités de glucose reliées entre elles par des liaisons β -1,4. Ces liaisons pivotées de 180° sont responsables de la forme compacte de la molécule, repliée en rangées parallèles et renforcée par des liens hydrogènes et liaisons de van der Waal formés entre les différentes rangées symétriques (Rouvinen et al, 1990). Ainsi, chaque molécule d'anhydroglucopyranose contient 2 ponts hydrogènes inter-chaîne, et 2 à 3 ponts hydrogènes intra-chaîne (Gardner et Blackwell, 1974). En conséquence de la configuration et du nombre très élevé de ponts hydrogènes, la molécule de cellulose tend à être très compacte. La cellulose plus ordonnée devient cristalline alors qu'un moins grand degré d'organisation, donc une structure moins compacte, représente une zone amorphe de la molécule.

Plusieurs facteurs intrinsèques à la molécule de cellulose même influent grandement l'activité des cellulases. Un premier facteur à considérer est l'indice de cristallisation de la cellulose dont sa provenance régit le degré de cristallisation. Par exemple, certaines algues produisent une forme plus cristalline de la cellulose alors que si ces dernières ont été moulues, la cellulose deviendra plus amorphe. Les substrats habituellement utilisés au laboratoire, dérivant de poudres de pâtes de bois blanchies, comme l'avicel, sont un mélange des deux formes de cellulose (Gilkes et al, 1991).

Le second facteur impliqué est le degré de polymérisation de la molécule qui se définit comme étant l'abondance relative de liaisons β -1,4 glucosidiques intérieures et extérieures susceptibles d'être clivées par les endo et les exoglucanases (Zhang et Lynd, 2004). Plus le degré de polymérisation augmente (10-10000 molécules de glucose) moins la molécule sera soluble. Un degré de polymérisation plus faible signifie habituellement qu'il y a un plus grand nombre d'extrémités réductrices et non-réductrices disponibles pour l'action des exoglucanases.

L'accessibilité au substrat par l'enzyme est un autre facteur affectant l'efficacité de la dégradation de la cellulose. La structure, la taille, la surface extérieure de la molécule par rapport à la forme de l'enzyme en affectent le taux d'adsorption. Diminuer la taille de la molécule de cellulose augmente la surface externe exposée, ce qui augmente le taux d'adsorption des cellulases (Zhang et Lynd, 2004).

1.2.3.2 Les cellulases

Plusieurs microorganismes aérobies, anaérobies, mésophiles et thermophiles parmi les bactéries et les champignons produisent les enzymes nécessaires à la dégradation de la cellulose native (Ljungdahl et Eriksson, 1985). Les organismes cellulolytiques tels certains champignons et plusieurs bactéries peuvent produire le système cellulolytique complet, alors que d'autres ne peuvent produire que quelques enzymes qui ne pourront dégrader complètement la cellulose native (Kirk et Farrell, 1987). Les enzymes capables de dégrader la cellulose proviennent du complexe enzymatique cellulolytique. Chez les bactéries anaérobies, tel *Clostridium sp.*, ce complexe constitue le cellulosome, un amalgame de protéines (endo, exoglucanases et β -glucosidases), qui une fois séparées,

perdent en majeure partie leur activité. Les organismes anaérobies n'étant pas le sujet de ce mémoire, le cellulosome ne sera pas abordé dans le présent ouvrage. Le complexe cellulolytique est composé de trois classes d'enzymes séparées en 15 familles de 92 familles de glycosyl hydrolases classées selon leur domaine catalytique :

1-L'endo- β -1,4-glucanase ou la β -1,2-glucan-glucanohydrolase (E.C.3.2.1.4) familles 5, 7, 8, 9, 10, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 60 et 61.

2-L'exo- β -D-glucanase ou la β -1,4-glucan-cellobiohydrolase (E.C.3.2.1.91) familles 6, 7, 9 et 48.

L'exo- β -D-glucanase ou la β -1,4-glucan-glucosidase (E.C.3.2.1.74) familles 9 et 10.

3- La β -1,4-glucosidase ou cellobiase (E.C.3.2.1.21), familles 1 et 3 (Henrissat, 1991, Henrissat et Bairoch, 1996).

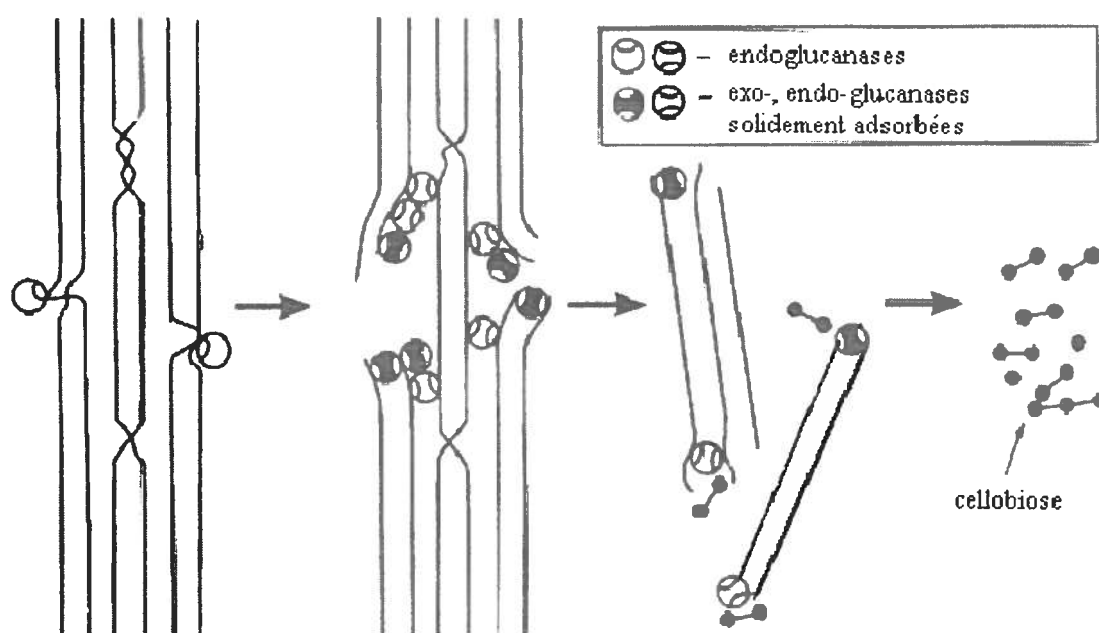


Figure 3 Mécanismes d'action des endo et exoglucanases. (Adapté de Rabinovich et al. 2002). Tandis que les endoglucanases vont dégrader l'intérieur de la molécule, les exoglucanases s'attaquent au extrémités réductrices. L'action des endoglucanases augmente le nombre de sites où les exoglucanases peuvent agir et vice-versa, créant une action dite de synergie dans la dégradation de la cellulose en cellobiose.

Les fonctions générales de ces enzymes dégradant la cellulose cristalline sont généralement bien connues. En premier lieu, les endoglucanases à faible affinité pour la cellulose, i.e, sans domaine de liaison à la cellulose, coupent à l'intérieur de la molécule

de cellulose dans les régions amorphes créant ainsi une ouverture dans la fibrille de cellulose. Les endoglucanases à forte affinité, i.e, possédant un domaine de liaison à la cellulose, peuvent alors dégrader la cellulose plus ordonnée de l'intérieur de la fibrille. Ces dernières sont absolument nécessaires à la dégradation efficace de la cellulose. L'action des endoglucanases résulte en la création d'extrémités réductrices et non-réductrices qui pourront être hydrolysées par les exoglucanases. La structure tubulaire de ces dernières (Sanchez et al, 2003) cache le site actif de l'enzyme et ce n'est que lorsque la cellulose pénètre dans le tunnel qu'elle devient accessible au site actif. L'enzyme avance ainsi sur la molécule en libérant derrière elle de la cellobiose (dimère de glucose) ou du glucose mais également des cellotrioses, cellotétraoses, cellopentoses, etc. En général, les endoglucanases sont de 3 à 30 fois plus efficaces sur les régions amorphes de la cellulose que sur les régions cristallines. En revanche, plusieurs recherches semblent indiquer que les exoglucanases agiraient préférentiellement sur les régions cristallines (Teeri, 1997). L'action des endoglucanases diminue rapidement le degré de polymérisation de la cellulose alors que les exoglucanases le diminuent au fur et à mesure qu'elles clivent les molécules de cellobiose de la molécule totale (Teeri, 1997). Le rôle des β -glucosidases sera étudié plus en profondeur à la section 1.2.3.5.

Les glycosidases, en général, hydrolysent le lien glycosidique selon deux méthodes: par inversion ou par rétention. Chaque famille des glycosyl hydrolases utilise soit l'une ou l'autre de ces méthodes pour cliver la molécule glycosidique. La méthode par inversion s'accomplit par un mécanisme de « déplacement direct » lors d'un état de transition où l'intermédiaire ionique est un oxocarbonium. Le site actif comprend 2 acides carboxyliques où l'un catalyse l'attaque basique de la molécule d'eau et l'autre l'acidité nécessaire au clivage du lien glycosidique (Withers et al, 1988). La méthode par rétention s'effectue par la formation d'un intermédiaire enzyme-glycoside covalent qui sera hydrolysé par plusieurs étapes de transition où l'intermédiaire ionique est également un oxocarbonium. La réaction est effectuée selon un mécanisme de « déplacement double ». Le site actif est composé de 2 groupes carboxyl où seulement l'un d'entre eux catalyse la réaction acide lors de la glycosilation et la réaction basique lors de l'étape de déglycosilation, alors que le second groupement carboxyl joue le rôle de nucléophile.

(Withers, 2001). L'analyse structurale de l'enzyme lors de la réaction démontre que celle-ci subit peu de changements conformationnels étant donné que la forme de la cavité catalytique est optimale pour la liaison du substrat. Cependant, le substrat subit de nombreux changements de conformation lors de l'état de transition à l'aide d'une suite de charges successives dispersées par un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques. Cette stratégie facilite la réaction de glycolyse (Withers, 2001).

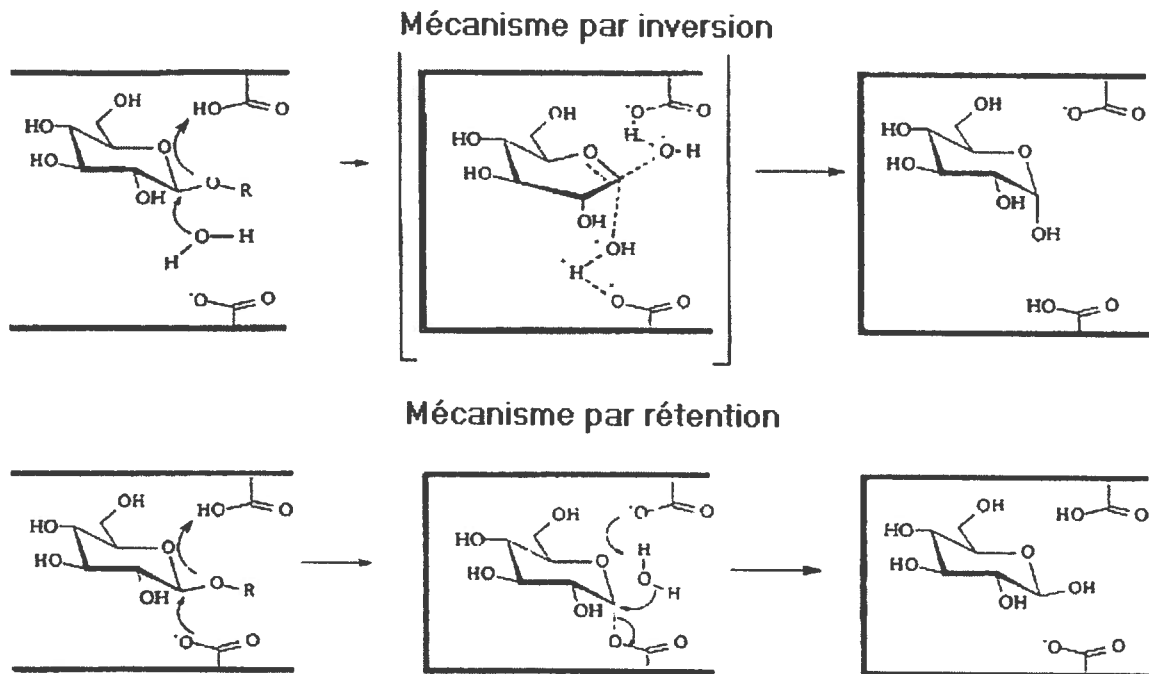


Figure 4. Mécanismes d'action par inversion ou rétention des glycosidases (tiré de Withers, 2001). Les deux mécanismes utilisent un oxocarbone comme intermédiaire ionique. Ce dernier sera lié de façon covalente avec l'enzyme dans le mécanisme par rétention.

La majorité des cellulases sont composées d'au moins 3 domaines protéiniques, redondants entre les différents types d'enzymes, soit le domaine catalytique, le domaine de liaison à la cellulose et les domaines de jonction. La présence de domaines de liaison à la cellulose chez plusieurs endoglucanases et exoglucanases facilite l'activité enzymatique en augmentant la proximité substrat-enzyme, en améliorant l'accessibilité du substrat ainsi qu'en modifiant la surface de la cellulose cristalline (Warren, 1996; Carrad et al, 2000). Les domaines de jonction sont également retrouvés chez l'ensemble des cellulases. La taille, la structure, la spécificité des endo et exoglucanases varient

énormément. Par exemple, deux endoglucanases possédant une structure semblable pourront avoir des mécanismes d'action et des spécificités très différentes l'une de l'autre.

Le mécanisme d'induction du système cellulolytique et hémicellulosique a été très étudié lors des dernières années. Étant donné la faible solubilité de la cellulose, et le caractère inductible du système des cellulases (Bhat et Bhat, 1997), on dénote que les microorganismes possèdent un système de reconnaissance de la présence de leur substrat. En effet, un niveau constitutif de production de cellulases est exprimé par l'organisme afin de dégrader suffisamment de cellulose pour que les produits de dégradation puissent pénétrer dans la cellule et induire la production d'une plus grande quantité d'enzyme (Bisaria et Mishra, 1989). Le système des cellulases est régulé par 2 systèmes différents. Par exemple, chez plusieurs bactéries telles *Thermomonospora sp.*, *Streptomyces sp.* et *Thermobifida fusca*, ainsi que chez les moisissures comme *Trichoderma reesei*, la présence d'un régulateur-'répresseur' bloque la transcription des gènes du système cellulolytique jusqu'à ce que la présence de cellobiose vienne détacher le répresseur. La présence de cellobiose augmente la production de l'enzyme par un facteur de 12 (Nikolay et Wilson 1999; Wilson, 2004). Le deuxième système de régulation est un système de répression catabolique où le glucose inhibe la transcription des gènes. La dérégulation des gènes codant pour des cellulases induit leur production par un facteur de 9 (Wilson, 2004). L'ensemble des gènes de cellulases possède un site de liaison aux ribosomes de type Shine-Dalgarno typique aux bactéries Gram-positives. De plus, des séquences promotrices possédant la boîte TATA ou des séquences typiques riches en AT ont également été identifiées pour les β -glucosidases (Béguin et Aubert, 1994).

Le plus haut niveau de production d'enzyme est obtenu par induction par la cellulose puisque celle-ci induit et dérégule les gènes à la fois, c'est-à-dire active directement la transduction des gènes en se liant au promoteur et enlève les répresseurs qui bloquent la transduction du gène. Outre la cellulose, différentes autres molécules tels la sophorose, la cellobiose, le lactose, le cellobiolactone, et les dérivés de cellulose peuvent être utilisés pour induire le système cellulolytique (Bisaria and Mishra, 1989). Cependant, pour

certaines espèces, ces différents inducteurs ne permettront pas la production du système complet des cellulases (Bhat et Bhat, 1997).

1.2.3.3 Rôle des cellulases dans l'industrie alimentaire

Depuis la découverte des cellulases pendant la deuxième guerre mondiale, de nombreuses recherches ont été effectuées quant aux applications industrielles possibles de ces enzymes. Bien que le but premier des études sur les cellulases était de biotransformer la lignocellulose en sucres solubles, il a rapidement été démontré que ce procédé n'était pas viable commercialement (Coughlan, 1985). Cependant, les données obtenues sur les propriétés des cellulases ont permis de développer de nouvelles applications pour ces enzymes. Outre les domaines des pâtes et papier (modification de la texture du bois préalablement au « battage de la pâte » afin d'en améliorer la performance, amélioration du drainage de la pâte, participation au bio-désencrage) (Bajpail, 1999; Bhat, 2000), du textile (bio-ponçage du denim et bio-polissage de différents tissus comprenant de la cellulose) (Galante et Formantici, 1998; Bhat, 2000), et des détergents (augmentation de l'efficacité du pouvoir nettoyant, élimination des fibrilles disloquées de la surface du vêtement sans le détériorer)(Ito, 1997; Bhat, 2000) l'utilisation des cellulases et enzymes associés augmente de plus en plus. Leur présence en industrie alimentaire, en fermentation, en alimentation animale et en agriculture est également notée.

En industrie alimentaire, le secteur de la production de jus de fruits naturels et de compotes de fruits est un secteur où les cellulases sont particulièrement utilisées. En effet, de concert avec d'autres enzymes de type hémicellulases et pectinases (communément appelées les enzymes de macération), ces dernières participent à la macération des pâtes de fruit afin d'augmenter la quantité de jus récupérable, par liquéfaction partielle de la pommade provenant du broyage mécanique du fruit. Le jus obtenu est subséquemment retraité par ces enzymes afin d'en clarifier ou de stabiliser le contenu pour fin de conservation et de commercialisation (Galante et Formantici, 1998, Bhat, 2000). Dans le même domaine, les enzymes de macération participent à la diminution de la viscosité et à l'amélioration de la texture et du processus de concentration du jus et des purées de fruits tropicaux mixtes acides, qui seraient autrement trop goûteux pour être vendus séparément (Grassin, 1996). La production d'huile d'olive est également fortement améliorée par

l'ajout du mélange d'enzymes de macération où elles sont responsables de l'augmentation du taux d'extraction d'huile (jusqu'à 2 kg d'huile par 100 kg d'olives), d'un meilleur fractionnement des phases huileuses, d'une meilleure rétention des anti-oxydants et de la vitamine E, d'une diminution de l'induction de la rancidité, de l'amélioration de l'efficacité de l'usine en général, et finalement, elles diminuent le taux d'huile dans les rejets de l'usine (Galante et Formantici, 1998).

L'industrie de la fermentation profite également de l'action des enzymes de macération, en particulier pour la production du vin. Les bénéfices apportés par le mélange d'enzymes sont surtout notés, entre autre, par une augmentation de 10-35% de la quantité d'extrait du premier moult de vin obtenue et par une plus grande facilité de filtration de ce moult (70-180%) suivant la diminution de sa viscosité (30-70%) (Galante et Formantici, 1998).

L'alimentation animale est un secteur d'activité important au niveau commercial ce qui assure un fort marché pour les cellulases qui y jouent aussi un rôle important (Bhat, 2000). Elles sont surtout utilisées comme additif alimentaire dans le fourrage utilisé pour l'alimentation des ruminants. Comme pour les phytases, une cellulase qui aurait un effet significatif dans une meilleure absorption de la cellulose devrait posséder plusieurs caractéristiques essentielles, telles que résister aux traitements donnés à la nourriture, être active et résister aux conditions présentes dans le tractus digestif, et finalement que les produits de la réaction enzymatique soient compatibles avec les besoins de l'animal (Bhat, 2000). Selon les recherches effectuées, un accroissement du poids corporel (jusqu'à 35%) et de la production de lait (de 5-25%) chez le ruminant aurait été constaté suite à l'ajout d'un mélange de cellulases, d'hémicellulases et de pectinases à l'alimentation. Toutefois, il semblerait que ces résultats ne soient pas reproductibles sur l'ensemble des expériences effectuées sur le sujet puisque plusieurs auteurs n'ont pu démontrer une action significative de l'ajout de cellulases à l'alimentation sur les animaux testés (Lewis et al, 1996).

1.2.3.4 Les β -glucosidases

Comme mentionné précédemment, l'action synergique des endo- et exo-glucanases donne

comme produit final majeur la cellobiose, dimère de glucose. La cellobiose est considérée comme étant l'unité répétée de base de la cellulose (Zhang et Lynd, 2004). Un obstacle majeur à l'utilisation des cellulases dans les procédés industriels de valorisation de la cellulose et autres molécules associées est l'inhibition par le produit effectuée par la cellobiose sur les endoglucanases et les exoglucanases. Les β -glucosidases, ou cellobiases, sont les enzymes responsables de la dégradation de la cellobiose en molécules de glucose. Elles ont donc un rôle crucial dans la dégradation de la cellulose puisque leur activité est le facteur limitant de l'efficacité des glucanases. En général, les cellobiases sont souvent moins efficaces que les glucanases quant à leur rapidité de transformation du substrat ce qui mène à l'inhibition rétroactive des glucanases dans les procédés de saccharification et d'alcoolisation de la cellulose.

Les β -glucosidases font partie de la famille 1 et 3 (Bhatia et al, 2002) des glycosyl hydrolases mais sont subdivisées en 3 classes : les 'vraies' cellobiases, hydrolysant uniquement les disaccharides, les aryl- β -glucosidases et les enzymes à large spécificité de substrat qui sont la classe de β -glucosidases la plus représentée actuellement (Bahtia et al, 2005). Elles sont retrouvées soit sous forme membranaire, intracellulaire ou extracellulaire (Bisaria et Mishra, 1989). Les β -glucosidases de la famille 1 proviennent principalement des mammifères, des plantes et des archaebactéries, alors que celles de la famille 3 sont d'origine bactérienne, fongique et des levures. De façon surprenante, les enzymes de la famille 1, bien que de provenances très diverses, présentent une très forte homologie de séquences entre elles, avec une structure de type tonneau 8-brins (β/α)₈ (Bhatia et al, 2005). Bien que les séquences des β -glucosidases de la famille 3 soient aussi connues, peu de travaux ont été effectués sur les enzymes de cette famille par rapport à la famille 1. Une seule structure tridimensionnelle d'exoglucanase a été déterminée pour cette famille, (Varghese et al, 1999) qui se subdivise en 2 classes, AB et AB' selon le type de domaine dont est composé la protéine. Les deux classes sont caractérisées par la présence d'un résidu actif Asp dans la cavité catalytique du domaine B. La division de la famille 3 en deux classes résulte d'une compression de la séquence en acides aminés du domaine B dans la classe AB' sans toutefois avoir une perte des séquences conservées entre les deux classes, responsables de l'activité de l'enzyme (Vroemen et al, 1995).

Outre leur action sur la dégradation de la cellulose, les β -glucosidases sont aussi impliquées dans diverses fonctions métaboliques chez les plantes et les animaux. En effet, chez les plantes, ces dernières sont utilisées pour la défense contre les pestes par la libération d'aglycones toxiques ou amères, pour l'activation des phytohormones, pour la lignification et pour le catabolisme des parois cellulaires. Chez l'humain, les β -glucosidases acides font partie du métabolisme du lysosome où elles dégradent les glucocérébrosides (Brady et al, 1965). Une mutation responsable d'une diminution de l'expression de la β -glucosidase cause la maladie de Gaucher qui se traduit par une accumulation des glucocérébrosides dans les lysosomes des monocytes et des macrophages. L'amoncellement dans les organes de ces cellules, nommées cellules de Gaucher, est responsable des symptômes de la maladie, c'est-à-dire du gonflement de différents organes de l'organisme (Beutler et al, 1995; Wenstrup et al, 2002).

La β -glucosidase catalyse l'hydrolyse du lien glycosidique présent entre le groupe hémiacétal-OH de l'aldose cyclique ou du glucose, et le groupe OH d'un autre produit, soit, un sucre, un amino-alcool, un aryl-alcool, ou un alcool primaire, secondaire ou tertiaire. La spécificité de l'enzyme est régie par la partie aglycone du substrat et dépend des différents acides aminés de la cavité catalytique (Bhatia, 2002). L'activité cellobiasique est maximale pour les disaccharides et diminue avec l'augmentation de la longueur de la chaîne polysaccharidique (Bisaria et Mishra, 1989). Un grand intérêt a également été accordé à l'activité synthétique des β -glucosidases (Gueguen et al, 1997). En effet, celles-ci peuvent catalyser la formation de différents produits à base de disaccharides ou d'aryl-glycosides en ajoutant d'autres molécules glycosidiques, ou différents alcools, à la molécule originale. Différentes applications commerciales et pharmaceutiques ont été identifiées pour ces produits. Le mécanisme des deux réactions catalysées par les β -glucosidases sera explicité plus bas.

Les β -glucosidases des deux familles catalysent l'hydrolyse du lien glycosidique en utilisant le mode par rétention qui maintient le carbone en configuration anomérique, (Withers, 2001) tel qu'expliqué à la section 1.2.3.2. Selon la famille étudiée, les groupes

carboxyle catalytiques (acide/base et nucléophile) varient en position et en composition mais le mécanisme est généralement semblable (Li, Chir et Chen, 2001). Le mécanisme de la famille I ayant été bien étudié, c'est celui qui sera relaté ici. Brièvement, lors de la glycosilation (première étape de la réaction), le nucléophile enzymatique attaque le carbone anomérique C1 du substrat glucidique entraînant, par l'état transitaire d'un ion oxocarbonium, la formation d'un intermédiaire enzyme- α -glycosyl (ose). Le groupe carboxyle de l'enzyme donne un électron H^+ à l'oxygène du substrat ce qui permet le départ de la partie aglycone ou le deuxième sucre de la molécule. Lors de la déglycosilation (la deuxième étape de la réaction), l'intermédiaire enzyme-glycosyl est hydrolysé par l'attaque d'une molécule d'eau au carbone anomérique, catalysée par le groupement carboxyle basique enzymatique donnant comme produit du β -glucose. Pour retrouver la configuration anomérique du carbone C1, l'ajout d'un groupement OH est ajouté par l'intermédiaire d'un état transitaire ionique oxocarbonium (Withers et al, 1988).

Comme mentionné précédemment, la β -glucosidase possède une activité de synthétase. Deux types de réactions ont été notés soit l'hydrolyse inverse et la transglycosilation qui se déroulent selon le mécanisme décrit ci-haut. Dans le premier type, le substrat est un ose simple qui, une fois sous forme d'intermédiaire enzyme-glycosyl, reçoit son électron d'un autre ose, produisant ainsi un disaccharide (Bhatia et al, 2000). Pour la transglycosilation, le substrat est un oside activé où l'accepteur d'électron, à l'étape de déglycosilation, est une autre molécule que l'eau. Cette molécule peut être soit un monosaccharide, un disaccharide un aryl-, un amine-, un alkyl-alcool ou un monoterpène alcool (Seidle et Huber, 2005). Le produit de cette réaction est un autre oside. La réaction de synthèse est moins fréquente que l'hydrolyse puisque l'accepteur d'électron final est toujours en compétition avec l'eau. De plus, l'activité dépend de l'affinité et de la concentration de l'accepteur et de sa propension à réagir avec le donneur (Yazaki et al, 1997).

Chez les organismes cellulolytiques, les β -glucosidases sont régulées par les mêmes mécanismes que le système des cellulases (voir section 1.2.3.2). Deux mécanismes sont

retrouvés : la répression catabolique et l'induction par le substrat. Outre la cellulose, l'inducteur par excellence du système des cellulases, la β -glucosidase est également induite par les méthyl β -glucosides, la cellobiose et par la gentobiose. La sophorose est considérée comme étant à la fois inducteur et répresseur chez *Trichoderma reesei* (Bisaria et Mishra, 1989). Plusieurs études ont démontré une diminution de la production ou une répression occasionnée par le glycérol (Lee et al, 1996). En plus de la répression catabolique médiée par le glucose sur le système des cellulases, la β -glucosidase est sujette à l'inhibition par le produit effectuée par le glucose. Chez certains organismes, l'AMPc serait également un répresseur de la β -glucosidase et des cellulases mais ce mécanisme de régulation est absent chez *Trichoderma reesei*.

1.2.3.5 Applications industrielles des β -glucosidases

En tant que membre du système des cellulases, la β -glucosidase est incluse dans plusieurs des secteurs d'activité énumérés dans la section 1.2.3.3. Elle est retrouvée dans le mélange d'enzymes nommées de « macération » où elle participe à la clarification des jus, la modification de la texture des purées, etc. On la retrouve également dans les mélanges d'enzymes ajoutées dans l'alimentation animale pour augmenter la digestibilité de la cellulose.

Plusieurs fruits et légumes possèdent des arômes et saveurs liés à des molécules glycosidiques où ils constituent la partie aglycone de la molécule. En cet état, ces saveurs ne sont pas discernables par les sens. L'habileté des β -glucosidases de cliver le lien liant l'aglycone de saveur ou d'arôme à l'ose les rend particulièrement intéressantes, par exemple, chez les bleuets, les framboises, les mûres, les pêches, les abricots et les tomates où plusieurs molécules de ce type ont été clairement identifiées (Humpf et Scherier, 1991; Krammer et al, 1991). La même application est attendue de ces enzymes lors de la production de vins, où l'enzyme peut libérer différents arômes, de type monoterpène, ou des dérivés de shikimate, prisonniers de l'oside chez le raisin et autres jus de fruits (Spano et al, 2005).

L'activité transglycosidase de l'enzyme lui ouvre certaines applications au niveau de la production de molécules pharmaceutiques tels les terpénoïdes indoles alkaloïdes. Par

exemple, l'ajmalicine est utilisée pour l'amélioration de la circulation cérébrale alors que deux alcaloïdes dimériques seraient des agents antitumoraux importants. Le précurseur de la famille des TIA, la strictosidine, doit être modifiée avant d'être acheminée dans les différentes voies métaboliques pour sa transformation en différents types de TIA (Geerlings et al, 2000), consistant en l'élimination de la partie ose de la molécule glycosidique par la β -glucosidase. En ce sens, les β -glucosidases peuvent être utilisées en pharmaceutique pour faciliter la production de ces molécules thérapeutiques.

1.2.4 Les xylanases

1.2.4.1 L'hémicellulose

Les hémicelluloses sont la deuxième matière organique biodégradable la plus abondante de la planète après la cellulose et représente 20-30% de la biomasse lignocellulosique (Kim, Irwin and Wilson, 2004). Comme décrit à la section 1.2.3.1 l'hémicellulose est étroitement associée à la lignine et, ensemble, ces deux molécules servent de soutien pour la cellulose, et de colle entre les cellules des végétaux. Le xylane, constituant majeur de l'hémicellulose est formé d'un squelette polysaccharidique de D-xylose lié en conformation β -1,4. Cette chaîne peut être hautement substituée par différents groupes tels les O-acétyls, l'arabinose, l'acide 4-O-méthyl-D-glucuronique, l'acide acétique, le glucuronoarabinose et quelques feruloyls et acides p-coumaroyls liés par l'intermédiaire de molécules de L-arabinose liées en C-5 sur la molécule de xylose (de Vries et Visser, 2001). Les substitutions du xylane diffèrent selon leur provenance : bois dur, bois mou, plantes, etc. D'autres molécules sont aussi retrouvées en bonnes quantités dans l'hémicellulose, comme par exemple, le β -mannane, polymère constitué de mannose et de quelques D-glucoses liés en β -1,4, les arabinanes, constitués de polymères de α -1,5-L-arabinofuranosyle substitué de α -1,2 et d' α -1,3 L-arabinofuranosides, et finalement, les arabinogalactanes, polymère de β -1,3-galactose, substitué par des molécules de β -1,6-galactose, de α -1,3-L-arabinofuranosyl, avec des chaînes latérales d'arabinanes (Shallom et Shoham, 2003). La structure de l'hémicellulose rend nécessaires les deux modes catalytiques des hémicellulases soient les glycosyl hydrolases et les carboxy-estérases. On retrouve une très grande diversité d'enzymes ayant pour fonction la dégradation complète

de l'hémicellulose, chacune spécifique aux différents constituants qui la composent (voir la figure 5 pour quelques exemples). Dans le cadre de cette revue, seule la xylanase sera abordée.

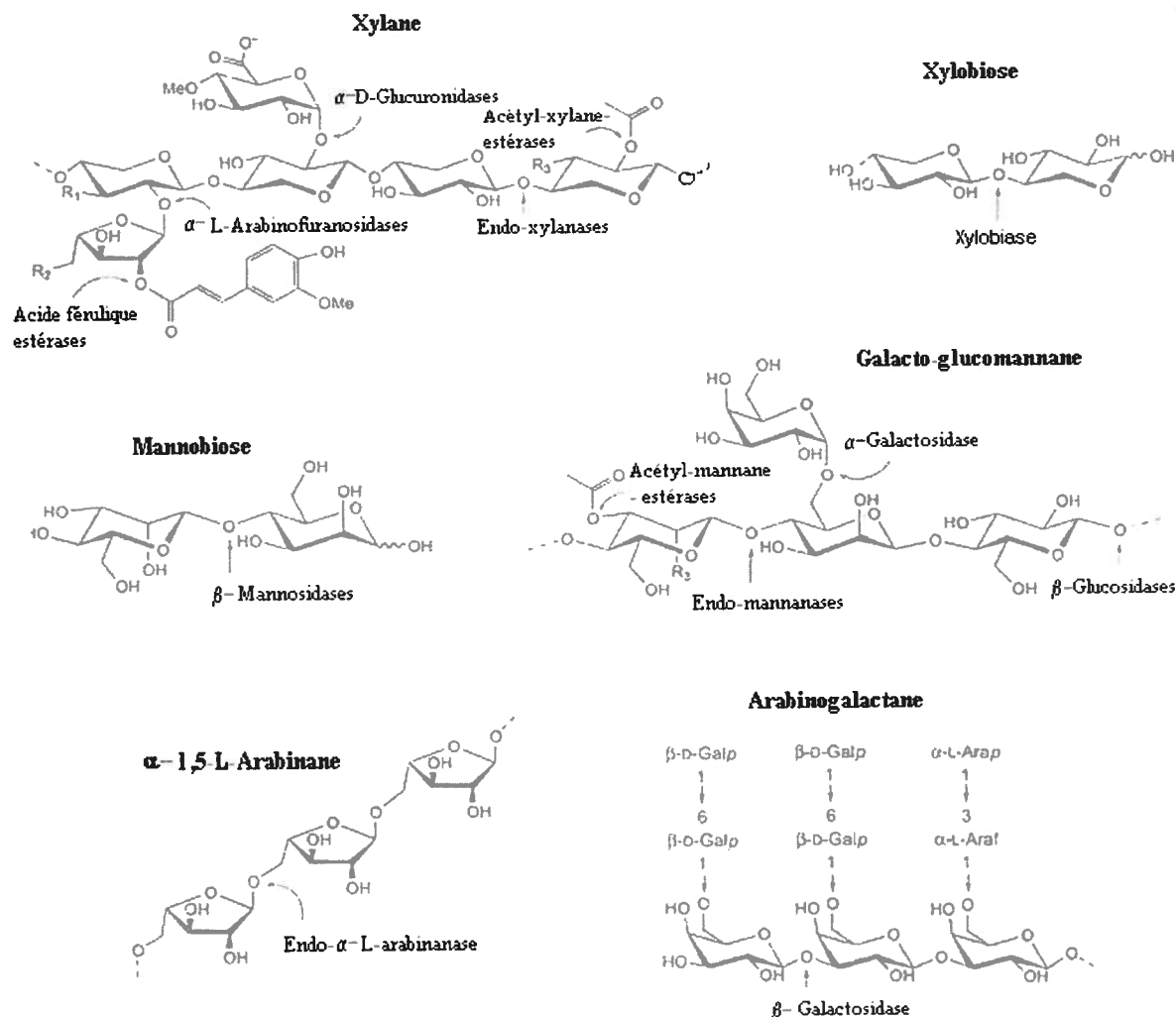


Figure 5. Structure de différentes hémicelluloses ainsi que les enzymes associées à leur dégradation(Adapté de Shallom et Shoham, 2003).

1.2.4.2 La xylanase

1.2.4.2.1 Fonctions de la xylanase

La dégradation complète du xylane, substitué ou non, requiert un complexe enzymatique complet. Tandis que l'endo-1,4- β -xylanase (ci-après nommée xylanase) hydrolyse le squelette interne, la β -xylosidase, de la même façon que les exoglucanases, hydrolyse l'extrémité non réductrice de différents xylooligosaccharides libérés par l'action de la

xylanase, l'activité diminuant avec l'augmentation du nombre d'unité de xylose (Polizeli et al, 2005). Différentes enzymes sont impliquées dans l'enlèvement des chaînes de substitution comme par exemple, l'acide férulique estérase, l'acétylxylane estérase et l' α -glucuronidase. La xylanase, en particulier, clive le lien β -1,4 du squelette de xylane selon la longueur de la chaîne, le degré de branchement et de substitution, produisant différentes longueurs d'oligosaccharides (Polizeli et al, 2005). Les enzymes impliquées dans la biodégradation de l'hétéroxylane travaillent en synergie les unes avec les autres pour faciliter l'activité de l'endoxylanase. Sans l'action des enzymes associées à l'enlèvement des substituants du xylane, la xylanase devient beaucoup moins active (Pronovost, 1991). L'effet global des xylanases sur la molécule de xylane se traduit par la diminution du degré de polymérisation de cette dernière (voir section sur la cellulose).

Les xylanases sont produites par une vaste diversité de microorganismes thermophiles, psychrophiles, mésophiles, acidophiles, alkalophiles et neutrophiles, tels les bactéries, les champignons et les levures. Les champignons de type *Trichoderma*, *Aspergillus* et *Penicillium* sécrètent une énorme quantité d'hémicellulases diversifiées dans leur entourage, alors que les bactéries sécrètent beaucoup moins d'enzymes extracellulaires mais possèdent des enzymes ou associées aux membranes, ou intracellulaires pour terminer la dégradation des oligosaccharides produits (Shallom et Shoham, 2003). Le même microorganisme peut sécréter plusieurs xylanases ayant des caractéristiques physicochimiques, une structure, des activités spécifiques et des spécificités différentes. Chez *Streptomyces lividans*, 3 xylanases sont produites ayant la même spécificité mais provenant de différentes familles des glycosyl hydrolases (Biely et al, 1993). En comparaison, *Trichoderma viride* sécrète 13 xylanases différentes alors qu'*Aspergillus niger* en sécrète 15. Cette multiplicité des xylanases est expliquée en partie par l'avantage évolutif que procure un plus grand nombre d'enzyme ayant des activités similaires pour dégrader un substrat diversifié (Collins et al, 2005).

1.2.4.2.2 Classification des xylanases

La majorité des xylanases sont classées dans les familles 10 (10 espèces) et 11 (17 espèces) des glycosyl hydrolases, avec quelques autres placées dans les familles 5, 7, 8 et

43 (Biely et al, 1997), selon le modèle basé sur l'analyse des modules hydrophobiques et la similarité des séquences d'acides aminés des protéines (Henrissat et Bairoch, 1993). Ce modèle prédit le repliement d'une protéine selon ses patrons hydrophobes/hydrophiles et permet de relier entre elles différentes protéines possédant la même fonction catalytique (Biely et al, 1997). Ainsi, les xylanases acides à haute masse moléculaire, possédant une structure de type tonneau (α/β)₈, ont été classées dans la famille 10 et les xylanases basiques à faible poids moléculaire, avec une structure de type β -'jelly roll', dans la famille 11. Récemment, une xylanase psychrotrophe a été identifiée d'une espèce bactérienne de l'antarctique, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, possédant une structure de type tonneau (α/α)₆, typique de la famille 8. Une particularité propre à cette xylanase vient de son mécanisme catalytique par inversion qui ne maintient pas la configuration anomérique du carbone C1 de la molécule de xylose, tandis que les autres xylanases possèdent plutôt un mécanisme catalytique de type rétention (van Petegem et al, 2003). Les mécanismes d'action des glycosyl hydrolases ont été présentés à la section 1.2.3.2. Une deuxième méthode de classement a été suggérée par Wong et al. (1988) suggérant qu'il existe 2 types de xylanases, les premières clivant le lien glycosidique aux embranchements de 1,3- α -L-arabinofuranosyl de l'arabinoxylane ce qui libère comme produit de l'arabinose, les deuxièmes étant incapables de cliver aux sites substitués du xylane.

1.2.4.2.3 Structure des xylanases

Les xylanases, tout comme les cellulases, sont composées de différents domaines, soit un ou plusieurs domaines catalytiques, le domaine de liaison à la cellulose et les domaines de jonction se subdivisant en différents domaines. Le domaine thermostabilisateur et un domaine de type NodB présentant une fonction acétyl xylane estérase, s'ajoutent à ceux précédemment mentionnés. La présence du CBD (Cellulose Binding Domain) sur des protéines incapables d'hydrolyser la cellulose peut être expliquée en fonction de la nécessité de rapprocher l'enzyme de la paroi cellulaire végétale. En effet, il a été démontré que le CBD permet de modifier la structure de la cellulose cristalline en libérant un brin de cellulose de la masse cristalline ce qui pourrait contribuer à mettre de l'avant les molécules d'hémicellulose (Linder et Teeri, 1997). Comme chez les cellulases, l'élimination des domaines de jonction ne pose aucun problème de repliement de la

protéine, aucune diminution de l'activité de l'enzyme, ni de son affinité pour la forme soluble du substrat chez les xylanases (Black et al. 1997). Il en va de même pour le domaine de liaison à la cellulose. Cependant, en présence du mélange naturel de cellulose/hémicellulose, les domaines de jonction et les CBD sont favorables à l'activité de l'enzyme en lui allouant la flexibilité nécessaire à atteindre plusieurs sites favorables à son activité et, en allongeant la durée de fixation de l'enzyme au substrat. Chez certaines xylanases, un domaine de liaison au xylane a également été démontré (Black et al, 1995; Irwin et al, 1994).

1.2.4.3 Régulation des xylanases

Chez les champignons tel *Trichoderma reesei*, les xylanases sont soumises aux mêmes mécanismes de régulation que le système enzymatique des cellulases. Le répresseur catabolique CREI (ou CREA chez *Aspergillus*) réprime la synthèse des cellulases et des hémicellulases en se liant au promoteur des gènes lorsqu'il y a du glucose disponible dans la cellule (Margolles-Clark et al, 1997). On retrouve le même type de répression catabolique chez les bactéries (Shallom et Shoham, 2003). Chez certains microorganismes, le régulateur transcriptionnel serait contrôlé par la concentration d'AMPc résultant de l'utilisation du glucose par le microorganisme, plutôt que directement par le glucose (Béguin et Aubert, 1994). Chez les aspergilli, un activateur transcriptionnel, XlnR, a été isolé. En présence de xylose, ce dernier se fixe sur une séquence de la région promotrice de plusieurs gènes du système des xylanases et des cellulases et induit leur transcription (van Peji et al, 1997).

La production du système des xylanases est induite par la croissance sur de l'hétéroxylane, du xylane, et sur les oligosaccharides à base de xylose tel le xylobiose, le xylotriase, etc. La cellule doit maintenir un niveau de production de xylanases constitutives afin que la présence du substrat insoluble (xylane ou hétéroxylane) dans le milieu puisse être détectée. Effectivement, l'activité basale des xylanases constitutives permet la production de xylobiose qui une fois transporté dans la cellule pourra induire une plus forte quantité de xylanases pour répondre à la présence du substrat. D'autres sucres, comme par exemple le L-arabinose, la cellobiose ainsi que la cellulose peuvent induire l'expression des gènes xylanasiques selon l'organisme étudié (de Vries et Visser,

2001).

Comme pour les cellulases, les endo- et les exoxylanases sont inhibées par les produits résultant de l'hydrolyse de l'hétéroxylane i.e. le xylobiose et les différents oligosaccharides à courte chaîne à base de xylose. L'activité des β -xylosidases est donc limitante à celle des xylanases. De la même façon, l'activité des β -xylosidases est inhibée par le xylose résultant de la dégradation du xylobiose.

1.2.4.4 Rôles des xylanases dans l'industrie

Les hémicelluloses, et en particulier les xylanases sont retrouvées dans plusieurs procédés industriels, mais surtout dans l'industrie des pâtes et papier. Leur fonction principale dans ce procédé consiste à dégrader le complexe lignohémicellulosique, composé de coloration plus ou moins foncée considéré comme indésirable pour la production de papiers de qualité (Polizeli et al, 2005). L'utilisation de la xylanase (sans activité cellulasique résiduelle) permet une forte diminution de la coloration de la pâte de papier, ce qui réduit grandement la quantité de produits chimiques blanchissants à ajouter à la pâte. Les conséquences économiques mais surtout environnementales de l'utilisation des xylanases dans cette situation sont très positives (Christov et al, 1999; Vikari et al, 1994).

En alimentation humaine, les xylanases sont utilisées dans la fabrication du pain, des jus et d'autres aliments. Les hémicelluloses tels l'arabinoxylane représentent jusqu'à 4% du poids de la farine et ont un grand impact sur la texture du pain de par leur structure longue et hautement substituée. La solubilisation de ces composés par digestion enzymatique permet une meilleure répartition de l'eau et par conséquent, une meilleure hydratation de la pâte du pain. Une augmentation de l'élasticité de la pâte due à la réduction des longs polymères de xylane entraîne une plus grande rétention des gaz produits par la fermentation sans qu'il y ait écroulement des microstructures de la pâte (Godfrey et West, 1996; Polizeli et al, 2005).

Comme mentionné précédemment, les xylanases font partie du mélange d'enzymes de macération utilisé dans la clarification des jus, dans l'augmentation de la récupération de jus à partir de la pâte de fruit, la diminution de la viscosité des pâtes de fruit, etc. (voir

section 1.2.3.3). Dans la production de la bière, la xylanase hydrolyse les arabinoxylanes qui donnent une texture visqueuse et une apparence boueuse à la bière. En alimentation animale, les xylanases sont utilisées en partie pour accomplir la même fonction que celle utilisée dans la production de la bière. En effet, l'hémicellulose retrouvée dans la nourriture rend cette dernière plus visqueuse. Cette viscosité réduit la biodisponibilité de certains nutriments chez les animaux tels le poulet en diminuant la mobilité des nutriments dans le tractus digestif (Twomey et al, 2003).

L'utilité des enzymes thermostables pour certaines applications industrielles a été exposée dans les pages qui précèdent. Il devient donc intéressant d'étudier des espèces bactériennes thermophiles, qui sont souvent peu connues, et d'en évaluer le potentiel d'enzymes thermostables. La flore du bioréacteur thermophile traitant le lisier de porc étudiée dans ce projet comprend plusieurs souches peu étudiées. Ces dernières seront caractérisées plus en profondeur.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Origine des microorganismes utilisés dans cette étude et conditions de culture.

Les bactéries thermophiles utilisées sont présentées au tableau 1 et proviennent d'une collection de bactéries isolées dans nos laboratoires à l'INRS-Institut Armand-Frappier à partir de réacteurs aérobies thermophiles traitant du lisier de porc. Les souches d'*Ureibacillus thermosphaericus* ont été isolées par Beaudet et al. (1990) d'un réacteur maintenu à 55°C, alors que les souches de *Bacillus* de la série pPD14, et *Bacillus thermocloacae* ont été isolées récemment d'un réacteur à partir d'échantillons prélevés à des températures de 60 et 74°C (Juteau et al, 2004a et b; Tremblay, 2003). Les souches Sb3, *Geobacillus thermodenitrificans* Sb1 et *Geobacillus toebii* Sb2 ont été isolées au cours de ce travail. Après leur isolement, toutes les souches ont été conservées dans du milieu Brain Heart Infusion (BHI) contenant 10% (v/v) de glycérol stérile dans des tubes en plastique à -80°C sauf pour les souches isolées par Tremblay (2003) où le BHI a été remplacé par un tampon phosphate salin, pH 8.0, 0.02M (8.5 g/L NaCl).

Lorsque nécessaire, un tube était rapidement décongelé dans un bécher contenant de l'eau et un volume de 0.1 ml était prélevé et étalé sur le milieu solide approprié. Les Pétri inoculés ont été placés dans un sac scellé pour éviter l'évaporation et incubés à la température désirée (généralement de 60 à 65°C) dans une étuve (Air incubator BleuM, BlueM Electric Cie, IL). Les cultures en milieu liquide ont été effectuées dans des erlenmeyers à bouchon vissé de 1 L contenant 60 ml de milieu. Les erlenmeyers étaient incubés dans un bain-marie avec agitation latérale à niveau 6 (Water Bath Shaker modèle 406015, American Optical, NY) maintenue à température constante.

Tableau 1. Énumération des souches de la banque de bactéries aérobies thermophiles isolées des bioréacteurs traitant le lisier de porc

Espèce	Souches	Référence
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	S2, S3, S4, S5, S6, S8, S9, S10, S11, Sol13, TG3, RD2, D1, D2, D2A	Beaudet et al, 1990; Gagné et al, 2001
<i>Bacillus sp.</i>	T3, 60S1b, 60S2, 60S3, 60S5, 60L1bb, 60L1p, 60L4	Juteau et al, 2004, 2005; Tremblay, 2003
<i>Bacillus thermocloacae</i>	60L2, 60L3, 60L5, 60L7, 60L8, 60S4	Juteau et al, 2004, 2005; Tremblay, 2003
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	Sb1	Isolées au cours de cette étude
<i>Geobacillus toebii</i>	Sb2	
Inconnue	Sb3	

2.2 Caractérisation de *Bacillus sp* T3 et 60S1B

2.2.1 Milieux de culture.

Tous les milieux solides utilisés pour la croissance bactérienne des souches T3 et 60S1B ont été incubés à 63°C (Air incubator BleuM, BlueM Electric Cie, IL), de 18 à 24h dans un sac scellé pour éviter l'évaporation des milieux. Différents milieux ont été testés pour leur capacité à faire croître les souches T3 et 60S1B de façon comparable à la croissance obtenue sur gélose lisier partiellement traité 24h utilisé lors de leur isolement (section 2.2.1.1). Pour chaque milieu, 3 repiquages ont été effectués et les résultats notés pour la croissance obtenue au 3^e passage.

2.2.1.1 Milieu lisier partiellement traité.

Initialement, les souches T3 et 60S1B ont été cultivées sur milieu solide constitué de 50% lisier partiellement traité (24h). Ce lisier avait été prélevé du réacteur aérobie thermophile (après 24 heures de traitement) en fonction dans le laboratoire du Dr Pierre Juteau à l'INRS-IAF (Juteau et al, 2004a). Ce lisier partiellement traité était conservé dans des bouteilles en verre à 4°C et utilisé pour la préparation des milieux de culture. Une quantité égale d'eau a été ajoutée au lisier partiellement traité puis la solution a été centrifugée à 4000g, pendant 30 minutes. Le surnageant a été utilisé pour la préparation

du milieu solide avec l'ajout de 15g/L d'agar (Difco). Le milieu a été stérilisé par autoclave à 121°C pour une durée de 30-40 minutes.

2.2.1.2 Milieu utilisé pour la sporulation.

Le milieu utilisé pour favoriser la sporulation était composé de (pour 100 mL de milieu) :

5 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

100 mL de surnageant de lisier partiellement traité

1.5 g agar

Des milieux composés de lisier partiellement traité (conservé à 4°C pendant 6 mois) sans ajout de MnCl_2 ont également été efficaces pour permettre la sporulation des souches T3 et 60S1B. La présence des spores a été observée après une coloration de Gram (BD) des bactéries.

2.2.1.3 Essais de culture avec lisier brut, partiellement traité ou traité (2005).

2.2.1.3.1 Milieu lisier partiellement traité.

Le lisier partiellement traité provient du bioréacteur aérobique thermophile de type AT-SBR (Réacteur aérobique thermophile séquentiel en batch) dans le laboratoire du Dr. Juteau à l'INRS-Institut Armand-Frappier (Juteau et al, 2004). Après 12h, 24h et 48h de traitement, le lisier a été retiré du réacteur et ajouté à une quantité égale d'eau puis centrifugé à 4000g pendant 30 minutes. Le surnageant a été utilisé pour la préparation du milieu solide avec l'ajout de 15g/L d'agar (Difco). Le milieu a été stérilisé par autoclave à 120°C pour une durée de 30-40 minutes. Des milieux de lisier partiellement traités (12h, 24, 48h, juin 2005)-Tryptic Soy Agar (TSA) ont également été mis à l'essai. Deux concentrations de lisier ont été testées pour les milieux lisier 12h-TSA, la première à 10% et la seconde à 50%. La concentration en lisier des milieux lisier 24h, 48h-TSA est de 10%.

2.2.1.3.2 Milieu lisier brut.

Le lisier brut (juin 2005) a été dilué à 50% avec de l'eau milli-Q puis centrifugé une fois à 4000g, 30 minutes. Le surnageant a été utilisé pour la préparation du milieu solide avec

l'ajout de 15g/L d'agar (Difco). Le milieu a été stérilisé à l'autoclave à 121°C pour une durée de 30-40 minutes.

2.2.1.3.3 Milieu lisier traité.

Le lisier traité (cycle de 72h, janvier 2004) a été dilué de moitié dans de l'eau milli-Q puis centrifugé à 4000g pendant 30 minutes. Le surnageant a été utilisé pour la préparation du milieu solide par l'ajout de 15g/L d'agar.

2.2.1.4 Milieu Basal Salts (BSM) pour les espèces *Thermus*.

Ce milieu a été utilisé comme base pour les différents milieux utilisés pour la croissance des espèces thermophiles (Methods for General and Molecular Bacteriology, Philipp Gerhardt).

Solution A :	Acide nitrilotriacétique	1g
	CaSO ₄ · 2H ₂ O	0.6g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1g
	NaCl	0.08g
	KNO ₃	1.03g
	NaNO ₃	6.89g
	Na ₂ HPO ₄	1.11g
	H ₂ O	1000mL
100 mL final:	Na ₂ HPO ₄	1.115/100mL
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.07g/100mL

Le pH du tampon phosphate a été maintenu à 7 afin d'éviter la précipitation des différents composés de la solution principale lors de l'ajout du tampon.

Solution B:	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.0046g
	H ₂ O	1000mL

Solution C:	MnSO ₄ · H ₂ O	0.22g
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.05g
	H ₃ B ₃	0.05g
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.0025g
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.0025g
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0.0046g
	H ₂ O	1000mL
	H ₂ SO ₄	0.5mL

Pour préparer 1L du milieu BSM- enrichi (BSME): 100mL de la solution A

10 mL de la solution B

10 mL de la solution C

8g Nutrient Broth (BD)

2g Yeast extract (Difco)

15g agar (Difco) (pour un milieu solide)

Le volume final a été complété à 1000 mL avec de l'eau milli-Q. Le milieu a été stérilisé à l'autoclave, 20 minutes à 120°C.

2.2.1.5 Milieu BSME additionné de protéose peptone et du mélange vitaminique Wolin.

Pour évaluer la capacité des différents constituants à soutenir la croissance des souches T3 et 60S1B, différentes combinaisons de protéose peptone, de mélange de vitamines Wolin et de NH₄Cl ont été testées (tableau 2). Chaque milieu de 100 mL a été fait à partir du milieu BSME avec agar (1.5g/100mL). Le NH₄Cl est préparé en solution de 0.25g/mL et stérilisé par filtration sur filtre de 0.2µm (Sarstedt, inc.) et ajouté au milieu à la concentration voulue après que le milieu ait été autoclavé. Le pH optimal de croissance des souches T3 et 60S1b étant entre 8 à 8.5, le pH du milieu a été ajusté avec une solution de NaOH 1N stérile une fois le milieu stérilisé. Le milieu 7 sera ci-après mentionné sous le nom de PP-Wolin et le milieu 10, PP-NH₄Cl.

Dans un autre essai de croissance, le mélange de vitamines Wolin a été subdivisé en 2 parties (milieux 12 et 13), la première contenant la biotine, la riboflavine et la vitamine B12, et le second mélange comprenant l'hydrochloride de pyridonine, l'acide panthoténique, l'acide p-aminobenzoïque et l'acide thioctique. Le mélange complet de vitamines est composé de 2mg/L de biotine, 2mg/mL d'acide folique, 10mg/L d'hydrochloride de pyridonine, 5mg/L de riboflavine, 5mg/L d'acide nicotinique, 5mg/L d'acide panthoténique, 0.1mg/L de vitamine B12, 5mg/L d'acide p-aminobenzoïque et 5mg/L d'acide thioctique.

Tableau 2. Concentrations des différents composants ajoutés au milieu BSME (pour 100mL de milieu).

Milieu	Protéose peptone no 3 (BD)	Wolin	NH ₄ Cl (Baker Chemical Co)	Urée
1	—	1%(v/v)	—	—
2	0.5g	1%(v/v)	—	—
3	0.5g	2% (v/v)	—	—
4	1g	1%(v/v)	—	—
5	1g	2%(v/v)	—	—
6	2g	1%(v/v)	—	—
7	2g	2%(v/v)	—	—
8	2g	2%(v/v)	1g	—
9	1g	2%(v/v)	1g	—
10	2g	—	1g	—
11	2g	2%(v/v)	—	1g

2.2.1.6 Milieu BSME additionné de différents constituants.

D'autres milieux à base de BSME ont été testés pour leur capacité à faire croître les souches T3 et 60S1b de façon optimale à pH ajusté entre 8.0 et 8.6. Sont ajoutés séparément au milieu BSME : 3.7g/ 100 mL de Brain Heart Infusion (Difco), 2g de caséine (Baker), 2g de tryptone peptone (Difco) ou 2g de protéose peptone. Une quantité

de 2g d'hydrolysats acides de caséine ou 0.5g d'acide humique (Aldrich) ont aussi été ajoutés au milieu PP-NH₄Cl (sans NaNO₃ dans la solution A du BSM).

2.2.2 Essais de croissance en milieu liquide.

Des essais de croissance ont été effectués dans différents milieux liquides énumérés au tableau 3. L'inoculation des milieux a été effectuée avec 1.0 mL d'une préparation bactérienne récupérée de milieu solide dont la densité optique était de 2.5 à 600nm sur un spectrophotomètre SP6-550 (Canlab, PYE Unicam). Les bactéries récoltées des milieux solides (BSME + PP-NH₄Cl) sont issues du deuxième passage sur ces milieux à partir de la souche congelée.

Tableau 3. Concentration des différents composés ajoutés au milieu liquide BSME (pour 100mL de milieu).

Milieu	Protéose peptone no 3	Wolin	NH ₄ Cl	Méthionine	Glucose	Lisier
1	2g	2%(v/v)	—	—	—	—
2	2g	—	1g	—	—	—
3	2g	—	2g	—	—	—
4	2g	—	6g	—	—	—
5*	1g	—	1g	—	—	—
6*	2g	—	1g	—	—	—
7*	2g	—	1g	—	1g	—
8*	2g	—	1g	0.006g	—	—
9*	1g	—	1g	—	—	1%(v/v)
10*	2g	—	1g	—	—	5%(v/v)
11*	2g	—	1g	—	—	15%(v/v)
12*	2g	—	1g	—	—	30% (v/v)

* Le NaNO₃ de la solution A du BSM a été retiré du mélange.

Le NH₄Cl a été ajouté aux milieux tel que décrit à la section précédente. Des essais de culture ont également été effectués dans un milieu contenant du lisier partiellement traité (24h) conservé à 4°C pendant 1 an. Les pH ont été ajustés entre 8.0 et 8.5 après stérilisation des milieux. Afin de maximiser l'échange d'oxygène, seulement 60 mL de milieu ont été ajoutés aux erlenmeyers de 1L. Tous les erlenmeyers ont été incubés dans

un bain-marie dont la température était maintenue à 65°C avec une agitation latérale à niveau 6 et un couvercle isolé (Water Bath Shaker modèle 406015, American Optical, NY). Des échantillons de 1mL ont été collectés à intervalles réguliers de 2h et la densité optique (DO) a été mesurée à 600nm.

2.2.3 Microscopie électronique.

Les souches T3 et 60S1B ont été cultivées sur milieu lisier partiellement traité 24h (juin 2003) pendant 24h à 63°C. Les bactéries ont été récoltées du Pétri dans 5 ml de tampon phosphate salin PBS 0.01M à pH 7 à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Les bactéries ont été colorées négativement avec une solution d'acide phosphotungstique 2.0% à pH 6.5 contenant 0.01% de sérum d'albumine bovin (Gagné et al. 2001). L'observation des préparations a été effectuée avec un microscope électronique Hitachi (model 7100). Des examens en microscopie électronique ont également été effectués sur des coupes ultra-minces des bactéries préparées selon la procédure suivante effectuée par le service de microscopie de l'INRS-IAF. Les bactéries ont été fixées pendant 15 minutes à température de la pièce avec 2.5% (v/v) de glutaraldéhyde dans 0.05 M de tampon cacodylate à pH 7.2 puis centrifugées à 15000g pendant 3 minutes. Le culot a été lavé 3 fois avec une solution de sucrose 3% diluée dans du tampon cacodylate. Les cellules ont été fixées dans une solution d'osmium tetroxide 2% puis déshydratées dans de l'acétone et finalement, fixées dans une matrice de résine 'Spurr' (Bouchard et al, 1996). La matrice de résine a été coupée en couches ultra-minces par le service de microscopie.

2.2.4. Analyse du profil des acides gras.

Les souches T3 et 60S1b ont été cultivées pendant 24 h sur un milieu de lisier partiellement traité (produit en juin 2004) et récoltées dans du tampon PBS 0.01M à pH 7.0. Les préparations bactériennes (5mL) ont été expédiées dans des bouteilles de sérum au service de diagnostic de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal pour les analyses de leur contenu en acides gras. Les acides gras méthyl ester ont été analysés avec un système MIS version 2.11 selon le protocole du manufacturier (MIDI).

2.2.5 Analyse du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S de T3 et 60S1b

2.2.5.1 Extraction d'ADN par broyage par billes de verre.

Les colonies bactériennes ont été récoltées des Pétri dans du TEN (Tris HCl 50mM, EDTA 10mM, NaCl 150 mM, pH 8.0). La préparation a été centrifugée puis le culot a été resuspendu dans 250 µL de TEN. Pour aider à briser la paroi des bactéries Gram positives, 0.75 mg de lysozyme par 250µL de TEN a été ajouté à la préparation puis incubé 30 minutes à 37°C. Par la suite, 250mg de billes stériles (0,4-0,5 mm) ont été ajoutées au mélange. La solution a été broyée 20 secondes par l'appareil FastPrep FP120 (Bio 101, ThermoSavant) puis mise sur glace 5 minutes. Ce cycle a été répété deux fois puis le mélange a été centrifugé 15 minutes à 13000g. Le surnageant a été récolté et ajouté d'un microlitre de RNase (10mg/mL), suivi d'une incubation à la température de la pièce de 10 à 15 minutes. L'ADN a été purifié à l'aide d'une extraction par 1 volume de phénol/chloroforme/isoamyl (25:24:1), suivi d'une centrifugation de 2-5 minutes. Une extraction par 1 volume de chloroforme/ isoamyl (24:1) a été effectuée suivie d'une seconde centrifugation de 2-5 minutes. L'ADN a été précipité par 1/4 de volume d'acétate d'ammonium 10M et 2 volumes d'éthanol 95% en agitant très doucement la solution, et le tout a été placé 30 minutes à -20°C. Une centrifugation de 25 minutes a permis de récupérer l'ADN dans le culot qui a été lavé avec de l'éthanol 70%, suivi d'une centrifugation de 2 minutes. L'ADN ainsi purifié a été resuspendu selon l'abondance dans 50-200µL d'eau milli-Q stérile. La présence et la qualité de l'ADN ont été vérifiées de la façon décrite à la section 2.2.5.3.

2.2.5.2 Conditions pour la réaction de la polymérase en chaîne (PCR).

Deux différentes amorces ont été utilisées pour amplifier le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S des deux souches, soit les amorces pA et pH dont les séquences respectives sont explicitées dans le tableau 4. Chaque échantillon d'ADN total a été préparé de la façon suivante pour l'amplification : 1 µL de chacune des amorces (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.), 1 µL de dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.), 5µL de tampon d'amplification10X (100mM Tris-HCl pH 9.0 , 15mM MgCl₂, 500mM KCl) (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.), 1µL d'albumine de sérum bovin 50X (20mg/mL) (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.), 0.5 µL de TAQ polymérase

(Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) et complété avec 38.5 μ L d'eau milli-Q stérile. L'emploi du thermocycleur Perkin Elmer DNA Thermal Cyclers 480 requiert l'ajout de 30 μ L d'huile stérile afin d'éviter l'évaporation du contenu du tube. Les échantillons d'ADN (2 μ L) ont été rajoutés une fois les solutions d'amplification placées dans l'appareil et préchauffées à 80°C. Une fois le chargement de l'échantillon terminé, la température a été augmentée à 94°C pour une durée de 5 minutes afin de permettre la dénaturation des brins d'ADN. La température a été diminuée par la suite à 55°C pour 5 minutes permettant ainsi aux amorces pA et pH de se lier sur les brins dénaturés. La température de 72°C permet à l'enzyme TAQ polymérase de poursuivre l'élongation des brins d'ADN à partir des amorces. Les 30 cycles effectués ont donc débuté par une température de 72°C pour 1 minute, suivi d'une période de 40 secondes à 94°C et se terminant par 1 minute à 55°C. L'amplification prend fin par une période finale de 10 minutes à 72°C. L'absence de contamination et la présence des amplicons ont été vérifiées sur gel d'agarose tel que décrit à la section 2.2.5.3.

Tableau 4. Liste des séquences des amorces pA et pH.

Amorces	Séquence	Position chez <i>E.coli</i>	Références
pA	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	8-27	Edwards et al., 1989
pH	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'	1541-1522	Edwards et al., 1989

2.2.5.3 Préparation des gels d'agarose.

Les gels d'agarose utilisés (10 cm de long) pour vérifier la présence de bandes d'ADN ont été préparés à une concentration d'agarose de 1% (p/v). Les gels ont ensuite été soumis à un voltage de 80V pour une durée minimale de 45 minutes. Le gel contenant l'ADN a été coloré 10 minutes dans une solution contenant du bromure d'éthidium et du TAE avec agitation (Fisher clinical rotator, 80rpm) puis décoloré dans de l'eau avec agitation pendant 15 minutes. Les solutions d'ADN à charger dans les puits du gel ont été préparées en ajoutant à 5 μ L d'échantillon, 2 μ L de tampon de chargement. La quantité et la longueur de l'ADN ont été comparées à l'ADN total du phage lambda Sty I (site de reconnaissance :

C]C(A/T)(T/A)GG) dont la concentration et la longueur des bandes (tableau 5) sont connues. Les gels ont été observés et photographiés par un transilluminateur UV (GelDoc 1000, BioRad).

Tableau 5 Longueur (kb) des fragments de l'ADN du phage lambda Sty I.

no de fragment	Longueur (Kb)
1	27837
2	23538
3	7743
4	6223
5	4284
6	3472
7	2690
8	1882
9	1489
10	925
11	421
12	72

2.2.5.4 Étude phylogénétique du gène codant pour l'ARNr 16S de T3 et 60S1b.

Les séquences d'ADN des deux clones de chaque souche obtenues de chez DNALandmark ont été vérifiées à l'aide du logiciel Chromas 2.23 (Technelysium, <http://technelysium.com.au/chromas.html>) pour des disparités entre l'abondance d'un nucléotide et la lettre donnée par le logiciel. Les séquences ont ensuite été alignées avec BioEdit 6.0.6 (Isis Pharmaceuticals, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). La séquence a été comparée aux banques de données de NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.Fcgi?db=nucleotide&itool=toolbar>). Les séquences codant pour l'ARNr 16S des bactéries les plus semblables ainsi que la séquence 16S d'un représentant de chaque genre de la famille des *Bacillaceae* ont été recueillies et comparées aux séquences de T3 et 60S1b à l'aide du logiciel Phylips 3.63 (<http://evolution.genetics>

.washington.edu/phylip.html) pour former un arbre phylogénétique de similarité de séquences où un « bootstrap » de 1000 a été utilisé.

2.3 Évaluation du potentiel enzymatique de la banque de bactéries aérobies thermophiles isolées des bioréacteurs aérobies thermophiles traitant le lisier de porc.

2.3.1 Banque de bactéries aérobies thermophiles

Le potentiel enzymatique des souches de la banque de bactéries thermophiles présentées au tableau 1 a été évalué dans cette étude. Les souches de *Ureibacillus thermosphaericus* ont été cultivées sur milieu BHI; les souches de la série pPD14 et les souches de *Bacillus thermocloacae* ont été cultivées sur milieu lisier partiellement traité 24h (janvier 2004). Les souches T3 et 60S1b ont été cultivées sur le milieu BSME + PP-NH₄Cl à moins d'indications contraires. Les souches de *Geobacillus* ont été cultivées sur milieu TSA. Tous les pH des milieux de culture ont été ajustés entre 8.0-8.5 avec une solution de NaOH 1N stérile.

2.3.2 Galeries API-Zym.

Les galeries API-Zym (BioMérieux) ont été utilisées pour évaluer la capacité des différentes souches bactériennes à produire des activités enzymatiques selon 19 différentes enzymes et leurs substrats respectifs énumérés dans le tableau 6. Les tests ont été effectués selon la procédure recommandée par le manufacturier. Les souches T3, 60S1b, 60S2 et 60S3 ont étéensemencées sur 2 Pétris de milieu BSME + PP-Wolin. Les autres souches de la série pPD14 et les souches de *Bacillus thermocloacae* ont étéensemencées sur milieu lisier partiellement traité 24h (janvier 2004). Les souches d'*Ureibacillus thermosphaericus* ont été inoculées sur milieu BHI (Difco). Les souches *Geobacillus thermodenitrificans* Sb1, *Geobacillus toebii* Sb2 et Sb3 ont été cultivées sur milieu TSA. Tous les Pétris ont été incubés à 63°C pour 24h. Les bactéries issues du deuxième passage sur le milieu respectif à chaque souche ont été récoltées dans de l'eau milli-Q stérile pour un total de 2 mL de préparation bactérienne par galerie. Chaque souche a été testée en duplicata. Chaque galerie a été placée dans un contenant prévu à cet effet où les puits sont emplis d'eau milli-Q. Trois gouttes de la préparation bactérienne ont été placées dans chacun des 20 puits de la galerie. Ces dernières ont été placées dans

un sac scellé contenant de la ouate humidifiée, et incubées à 63°C pendant 4h. Les résultats ont été obtenus en ajoutant une goutte des réactifs ZymA et ZymB (BioMérieux) à tous les puits, suivi par une incubation minimale de 5 minutes à la lumière. L'absence de coloration est notée par un 0 et la coloration la plus intense par 5. L'intensité de la coloration est jugée de façon arbitraire et est dépendante de l'activité enzymatique.

Tableau 6. Liste des substrats associés aux 20 puits de la galerie API-Zym et des enzymes correspondantes testées.

Puits	Substrat	Enzyme testée
1	-	Témoin négatif
2	2-naphtyl phosphate	Phosphatase alcaline
3	2-naphtyl butyrate	Estérase (C4)
4	2-naphtyl caprylate	Estérase Lipase (C8)
5	2-naphtyl myristate	Lipase (C14)
6	L-leucyl-2-naphtylamide	Leucine arylamidase
7	L-valyl-2-naphtylamide	Valine arylamidase
8	L-crytyl-2-naphtylamide	Cystine arylamidase
9	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide	Trypsine
10	N-glutaryl-phénylalanine-2-naphtylamide	α -chymotrypsine
11	2-naphtyl phosphate	Phosphatase acide
12	Naphtol-AS-BI-phosphate	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase
13	6-Br-2-naphtyl- α -D-galactopyranoside	α -galactosidase
14	2-naphtyl- β -D-galactopyranoside	β -galactosidase
15	Naphtol-AS-BI- β -D-glucuronide	β -glucuronidase
16	2-naphtyl- α -D-glucopyranoside	α -glucosidase
17	6-Br-2-naphtyl- β -D-glucopyranoside	β -glucosidase
18	1-naphtyl-N-acétyl- β D-Glucosaminide	N-acétyl- β -glucosaminidase
19	6-Br-2-naphtyl- α -D-mannopyranoside	α -mannosidase
20	2-naphtyl- α -L-fucopyranoside	α -fucosidase

2.3.3 Recherche de souches produisant de la phytase.

2.3.3.1 Milieux utilisés.

Pour mettre en évidence la production de phytase par les bactéries de la banque de bactéries thermophiles, différents milieux solides ont été utilisés. Tous les Pétris ont été incubés 5 jours à 63°C. Les souches 60S3, 60S5, 60L3, 60S1b, S8, D2A et RD2 ont été

inoculées sur le milieu PS1. La composition du milieu PS1 (pour 100 ml) est : 0.5g de NH_4NO_3 , 0.05g de $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.05g de KCl, 0.001g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2g de protéose peptone no 3, 0.8g de bouillon nutritif, 0.2g d'extrait de levures, 1.5 g d'agar, 70mL de H_2O , 1g de NH_4Cl (à partir d'une solution stock 0.25g/mL stérile, après autoclave) et 0.5% de Ca-phytate.

Les milieux gélose-lisier partiellement traités 24h (janvier 2004) (milieu PS2) et BSME-PP- NH_4Cl (milieu PS3) ont aussi été utilisés pour l'expérience décrite à la section 2.3.3.2. À tous les milieux, on a ajouté 0.5% de phytate de calcium. Le phytate de calcium a été préparé avec un mélange de CaCl_2 et de sel de sodium d'acide phytique ou phytate de sodium de maïs (Sigma). Pour obtenir une concentration de 0.5%, la quantité de phytate nécessaire pour 100 ml de milieu est de 685.8 μmoles (où le poids moléculaire arbitraire est de 729). En ajoutant l'équivalent molaire de CaCl_2 , il est possible, en abaissant le pH de la solution au dessous de 7, de solubiliser le phytate de sodium et de le transformer, en milieu alcalin, en phytate de calcium. La solution a été stérilisée par filtration sur un filtre de 0.2 μm et ajouté tel quel dans le milieu de culture. Le pH du milieu a été ajusté entre 8 et 8.5 avec du NaOH 1N ce qui fait précipiter le Ca-phytate.

Le principe du milieu pour détecter une activité de phytase est axé sur l'insolubilité du Ca-phytate qui produit une opacité du milieu solide. L'utilisation du composé par la bactérie permet la formation d'une zone claire sur la gélose, autour de la colonie (Kim et al. 1998a). L'acidification du milieu autour de la colonie peut également produire une solubilisation du phytate et ainsi former un faux positif.

2.3.3.2 Recherche de microorganismes produisant une phytase à partir d'échantillons du réacteur thermophile.

La présence de microorganismes producteurs de phytase dans le lisier partiellement traité a été étudiée en effectuant des dilutions (10^{-2} à 10^{-6}) d'échantillons du réacteur thermophile du lisier, prélevés à deux températures (40°C et 60°C), dans du PBS (pH 7), et en inoculant en triplicata 100 μL de chaque dilution sur les 3 milieux PS1, PS 2 et PS3. Les Pétris inoculés avec un échantillon de lisier provenant de la phase du réacteur à 60°C

ont été incubés à 63°C alors que ceux ensemencés avec du lisier provenant du réacteur à 40°C ont été incubés à 37°C. La présence de zones claires autour des colonies a été recherchée.

2.3.3.3 Enrichissement au son de blé d'un extrait de lisier.

Pour induire la production de phytase par les microorganismes potentiellement producteurs de phytase, du son de blé biologique (La Milanaise, QC) a été ajouté dans les milieux de culture (Kim et al. 1998a). Un échantillon de 1.5 mL de lisier partiellement traité provenant des phases du réacteur à 40° ou à 60°C a été inoculé à 50 ou 60mL respectivement à partir des milieux énumérés ci-dessous dans des erlenmeyers de 250 mL ou dans des erlenmeyers de 1L respectivement. Les erlenmeyers de 250 mL ont été incubés à 37°C dans un incubateur à agitation rotative à 250 rpm (Incubator shaker modèle G25, NB Scientific Co Inc) ou à 65°C (erlenmeyer de 1 L) dans un bain-marie à agitation latérale à niveau d'agitation 6. Deux repiquages de 1 mL ont été effectués après deux jours d'incubation dans du milieu frais pour un total de 3 passages. Des volumes de 100µL des dilutions 10^{-2} à 10^{-6} du surnageant issu du troisième passage de l'enrichissement ont été ensemencés en triplicata sur les milieux solides énumérées ci-dessous. Les Pétris ont été incubés à 40° ou 60°C pendant 8 jours en présence d'oxygène ou en atmosphère microaérophile à l'aide d'un sachet « gaz-pack » (BBL) introduit dans une jarre anaérobie ou aérobie.

Milieu liquide 1 (PL1) (pour 100mL)	6g son de blé (La Milanaise, PQ) 0.04g NH_4NO_3 0.02g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g hydrolysats de caséine 0.2g CaCl_2 (à ajouter à l'ensemencement)
Milieu liquide 2 (PL2) (pour 100mL)	6g son de blé Milieu BSME 2g protéose peptone no 3 1g NH_4Cl (ajouté après stérilisation)

0.2g CaCl₂ (à ajouter à l'ensemencement)

Le CaCl₂ est ajouté à partir d'une solution stock de 0.2g/mL stérilisée par filtration sur filtre de 0.20µm de porosité (Sarstedt inc). Le pH des milieux a été ajusté à 8.4 à l'aide de tampon borate 0.1M, deux fois par jour.

Milieu solide 1 (PS3) (pour 100mL)	1g son de blé 0.04g NH ₄ NO ₃ 0.02g MgSO ₄ ·7H ₂ O 1g hydrolysats de caséine 1.5g agar
Milieu solide 2 (PS4) (pour 100mL)	2g protéose peptone no 3 0.8g bouillon nutritif 0.2g extrait de levures 0.5g Ca-phytate 0.5g NH ₄ NO ₃ 0.05g MgSO ₄ ·4H ₂ O 0.05g KCl 0.001g FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01g MnSO ₄ ·4H ₂ O 1g NH ₄ Cl 1.5g agar
Milieu solide 3 (PS5) (pour 100 mL)	0.5g NH ₄ NO ₃ 0.05g MgSO ₄ ·4H ₂ O 0.05g KCl 0.001g FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01g MnSO ₄ ·4H ₂ O 1.5g glucose 0.5g Ca-phytate

Le pH a été ajusté avec du tampon borate 0.1M. Le phytate de calcium a été fabriqué selon la méthode décrite à la section 2.3.3.1.

Trois types majeurs de colonies ont été isolés des milieux PS4 et PS5 incubés en aérobiose. Ces dernières ont été isolées en cultures pures, congelées et identifiées sous le nom de Sb1, Sb2 et Sb3.

2.3.3.4 Dosage colorimétrique de la libération des phosphates (méthode de Kim et al, 1998).

La phytase étant une enzyme permettant la libération de molécules de phosphate à partir de l'acide phytique ou du sel d'acide phytique, l'activité de cette dernière est directement proportionnelle à la libération des phosphates. Les activités phytasiques des souches Sb1, Sb3, *B. subtilis* et *B. licheniformis* ont donc été évaluées à l'aide de la méthode de dosage colorimétrique des phosphates modifiée de Fiske et Subbarow (1925). Pour ce faire, les souches Sb1 et Sb3 ont été mises en culture dans 60 mL du milieu liquide « son de blé-TSB » décrit plus bas dans un erlenmeyer de 1L à 60°C pour 40h. *Bacillus licheniformis* (ATCC 10716) et *Bacillus subtilis* DS11 ont été inoculés dans 50mL du milieu PL2 et incubés 40h à 30° et 37°C respectivement, à 200 rpm (Incubator shaker modèle G25, NB Scientific Co Inc.). L'inoculum de 1 mL provenait d'une préculture de 18h dans du milieu TSB pH 8.3 pour Sb1 et Sb3 et dans du bouillon nutritif pH 7.3 pour *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*. Des échantillons des surnageants de culture de Sb1 et Sb3 ont été collectés à différents temps d'incubation (T24h, T48h) pour être testés pour la libération enzymatique de phosphate.

Milieu son de blé-TSB (100mL)	6% son de blé 0.04% NH ₄ NO ₃ 0.02% MgSO ₄ ·7H ₂ O 3% TSB 0.2% CaCl ₂ (à ajouter à l'ensemencement)
Milieu son de blé-NB	6% son de blé

(100mL)	0.04% NH_4NO_3
	0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	0.8% NB
	0.2% CaCl_2 (à ajouter à l'ensemencement)

Le pH du premier milieu a été ajusté à 8.3 avec du NaOH 5N et le pH des deux milieux a été ajusté régulièrement lors de l'incubation.

Le test enzymatique a été effectué de la façon suivante sur les surnageants de culture de SB1 et SB3 et de la culture obtenue lors de l'enrichissement au son de blé. Dans un Eppendorf de 1.5mL, sont ajoutés 40 μL d'une solution de phytate de sodium 20mM, 40 μL de tampon Tris-HCl pH7.0 à 1M, 40 μL de CaCl_2 20mM et 280 μL d'eau milli-Q. La solution a été préincubée à 40°C et à 60°C, puis 100 μL du surnageant de culture à tester ont été ajoutés. Le test enzymatique était d'une durée de 30 minutes, suite à quoi, la réaction était arrêtée en ajoutant 500 μL d'acide trichloroacétique à 15%. Les contrôles ont été effectués en faisant bouillir le surnageant de culture 10 minutes pour inactiver les enzymes, puis en ajoutant cette solution au lieu de la solution d'enzyme active. Le dosage des phosphates libérés a été effectué en incubant 1mL de la solution test enzymatique à 4mL du réactif A (en ratio de 1 : 1 : 1 : 2, H_2SO_4 6N, ammonium molybdate 2.5%, acide ascorbique 10%, eau milli-Q) à 37°C pour 30 minutes. L'absorbance est lue à 820 nm sur spectrophotomètre SP6-550 (Canlab, PYE Unicam). Les résultats ont été analysés par rapport à une courbe standard de concentrations connues en phosphate (KH_2PO_4) variant de 1 mM à 1M. Le surnageant de culture de l'enrichissement au son de blé a été dosé directement sans essai enzymatique, où le blanc, dans ce cas, est le temps 0 d'incubation. *Bacillus licheniformis* (ATCC 10716) et *Bacillus subtilis* DS11 ont été utilisés comme contrôles positifs de production de phytase.

2.3.3.5 Identification de la présence de phytases par amplification du gène.

Afin d'identifier la présence du gène codant pour la phytase chez les microorganismes issus de la banque de souches thermophiles (SB1, SB2, SB3, RD2, S8, Sol13, 60S1b, 60S3), du lisier (brut, partiellement traité à 60°C et traité) et de l'enrichissement au son de

blé, des amorces d'ADN dégénérées spécifiques aux phytases β -propeller sont conçues à partir des séquences connues de gènes de phytases retrouvées sur Pubmed. La spécificité de l'amorce pour le gène voulu a été vérifiée par BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&itool=toolbar>) l'extraction de l'ADN a été effectuée selon le protocole décrit à la section 2.2.5.1. L'état de l'ADN extrait a été vérifié sur gel d'agarose 1% tel que décrit à la section 2.2.5.3.

Chaque échantillon d'ADN total a été préparé de la façon suivante pour l'amplification; 1 μ L de chacune des amorces (décrites dans le tableau 7), 1 μ L de dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.), 5 μ L de tampon d'amplification 10X (100mM Tris-HCl pH 9.0, 15mM $MgCl_2$, 500mM KCl) (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.), 1 μ L d'albumine de sérum bovin 50X (20mg/mL) (Sigma Chemical CO. St.Louis, MO), 0.5 μ L de TAQ polymérase (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) et complété avec 38.5 μ L d'eau milli-Q stérile. Les échantillons d'ADN (2 μ L) ont été rajoutés une fois les solutions d'amplification placées dans le thermocycleur GeneAmp (PCR System 2700, Applied Biosystems) et préchauffées à 80°C. Une fois le chargement de l'échantillon terminé, la température a été augmentée à 94°C pour une durée de 5 minutes afin de permettre la dénaturation des brins d'ADN. La température diminue ensuite à 55°C pour 5 minutes permettant ainsi aux amorces phyG et phyD de se lier sur les brins dénaturés. Les 35 cycles effectués débutent donc par une température de 72°C pour 45 secondes, suivi d'une période de 45 secondes à 94°C et se terminant par 45 secondes à 50°C. L'amplification prend fin par une période finale de 10 minutes à 72°C. La température de 72°C permet à l'enzyme TAQ polymérase de poursuivre l'élongation des brins d'ADN à partir des amorces. Le résultat du PCR a été observé sur gel d'agarose 1% tel que décrit à la section 2.2.5.3.

Un PCR a été effectué sur les amplicons obtenus du PCR (PCR niché) précédent selon les mêmes conditions qu'énumérées ci-haut. Pour vérifier la température optimale d'hybridation des amorces, un PCR à gradient de température a été effectué sur l'échantillon d'ADN du lisier partiellement traité à 60°C à l'aide du thermocycleur Stratagene (Robocycler Gradient 96, Stratagene) selon le cycle suivant : 94°C pendant 5

minutes pour dénaturer les brins d'ADN, suivi de 35 cycles de 45 secondes à 72°C, puis par 50 secondes à 94°C, et finalement par 40 secondes à des températures variant de 50 à 61°C. L'amplification se termine par une période d'élongation de 10 minutes à 72°C.

Tableau 7. Liste des séquences des amorces dégénérées phytG et phytD.

Amorces	Séquence	Position dans le gène	Références
phytG	5'-GCWGATGAAC CBGCGATTTGG-3'	160-181	Genbank: <i>phyC</i> , <i>Ts-phy</i> , <i>phyL</i> et <i>168phyA</i> * Tye et al, 2002
phytD	5'-CCGCCGTYYGGC TCAGCGCTGAA-3'	700-723	

* Keruvo et al. (1998), Kim et al. (1998), Tye et al. (2002)

2.3.4 Recherche de la xylanase et de la cellulase.

2.3.4.1 Milieux utilisés pour la détection des activités de xylanase et cellulase.

La production de xylanase et de cellulase par les souches de la banque a été évaluée à l'aide de milieux solides permettant la formation de zone d'hydrolyse du substrat approprié. Pour mettre en évidence la présence de xylanase, du RBB-xylane (0.1% p/v) provenant de flocons d'avoine a été ajouté aux milieux respectifs aux souches testées. Les souches de la série pPD14, et de *Bacillus thermocloacae* ont été cultivées sur milieu BSME-PP-NH₄Cl. La production de cellulase a été évaluée en ajoutant aux milieux respectifs aux souches testées, 1% (p/v) de carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne (Sigma). Le carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne doit être broyé préalablement à son ajout aux milieux. Les milieux ont été inoculés puis incubés 24h à 63°C. Les Pétris ont ensuite été submergés par une solution de rouge congo 5mg/mL pendant 20 minutes, puis décolorés par une solution de NaCl 5M pendant 20 minutes. La présence de l'enzyme est observable par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (Rahman et al. 2003).

2.3.4.2 Test PAHBAH pour les xylanases (méthode de Lever et al., 1984).

Le test PAHBAH (p-HydroxyBenzoic Acid Hydrazide, Sigma noH-9882) est une méthode permettant de calculer l'activité enzymatique des xylanases en mesurant la libération des sucres réducteurs produits par la réaction enzymatique. La solution d'enzyme a été obtenue de la façon suivante. *G. thermodenitrificans* SB1 a été récolté

d'un pétri BHI/ 0.1% xylane de flocons d'avoine (Sigma) et inoculé dans un erlenmeyer de 1L contenant 60mL de bouillon BHI/ 0.1% de xylane de flocons d'avoine à pH 8.5. Le tout a été incubé 24h à 60°C dans un bain-marie à agitation latérale à niveau 6. Les cultures ont par la suite été centrifugées à 4000g, 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant a été récupéré et concentré 10 fois sur cellule Amicon (Amicon Corp. Lexington, Mass.) avec une membrane (Diaflo, Amicon Corp, Lexington, Mass.) de 10 000 Dalton à 4°C. Le concentré de surnageant a été testé pour son activité sur gélose RBB-xylane en déposant 15 µL de surnageant dans des puits creusés dans la gélose (apparition de zones claires sur fond bleu). Les surnageants ont par la suite été conservés au congélateur pour être utilisés ultérieurement pour les essais enzymatiques.

Les essais enzymatiques ont été effectués comme suit. Dans un Eppendorf de 1.5 mL, 100µL de tampon 1M au pH désiré (tampon acétate pH4, tampon citrate pH6, tampon phosphate pH 6.5 et 7, tampon Tris-HCl pH8.5), 800 µL de solution de xylane (5 mg/ml $\approx$ 50-57mM de sucre réducteur)(fraction soluble lyophilisée de xylane de flocons d'avoine préparé par Roger Dubuc, (Laboratoire de Claude Dupont, INRS-IAF)) ont été préincubés à la température désirée (60°, 70°, 80°C) dans un incubateur à sec (Dry bath incubator, Fisher Scientific) puis 100 µL de solution d'enzyme ont été rajoutés. Les essais de température ont été effectués à pH 6.5 et les essais de pH à une température de 70°C. L'essai enzymatique a été d'une durée de 10 minutes et a été effectué en triplicata. La réaction a été arrêtée en ajoutant 100µL du mélange réactif dans 300 µL de PAHBAH 0.25% (p/v) dans du NaOH 0.5M. Les sucres réducteurs libérés par la réaction enzymatique ont été colorés en incubant le mélange avec la solution de PAHBAH dans un bain-marie (Haake W26-E3) à 95°C pour 5 minutes puis immédiatement placé dans un bain d'eau froide et de glace pour 5 minutes. Le PAHBAH doit être préparé au maximum 2h avant son utilisation et gardé à l'obscurité. Pour la lecture de la D.O., 200 µL de ce mélange ont été placés dans une microplaque de 96 puits Falcon, puis le tout est lu à 405nm avec l'appareil Microplate Autoreader EL309 (Bio-Tek Instruments) ou le µQuant (Bio-Tek Instruments Inc.).

Pour éliminer le biais dû aux sucres réducteurs déjà présents dans le milieu de culture, des blancs ont été effectués pour chaque tube testé. Une solution d'enzyme est bouillie pendant 15 minutes pour inactiver toutes les enzymes présentes. Lors de l'essai enzymatique, 100 µL de cette solution ont été ajoutés en lieu et place de la solution d'enzyme active. Les blancs subissent toutes les étapes subséquentes effectuées pour les tubes tests. Une courbe standard de xylose (Sigma) en concentrations connues a été réalisée à des concentrations variant de 0mM à 10mM. Pour chaque concentration de xylose, 100µL ont été rajoutés à 300µL de PAHBAH puis colorés à 95°C pour 5 minutes sur le même support que les échantillons. Une courbe standard a été effectuée pour chaque solution de PAHBAH utilisée et sur chacun des supports où des échantillons ont été colorés. L'activité enzymatique de la xylanase est exprimée en unités internationales (UI), où une UI est la quantité d'enzyme nécessaire pour produire 1 µmole de sucres réducteurs en une minute.

Pour les essais de stabilité de la xylanase à différentes températures (70°, 80°, 90°C) en présence de son substrat, le même protocole qu'expliqué ci-haut a été utilisé. 100 µL du mélange réactif ont été retirés après une période d'incubation prédéterminée (jusqu'à 12h d'incubation) et placés dans le PAHBAH jusqu'à concurrence de 9 échantillons de 100 µL. En ce qui concerne les essais de stabilité de la xylanase en absence de son substrat, il convenait de procéder différemment. Chaque solution d'enzyme a été incubée (Dry bath incubator, Fisher Scientific) à 70°C pour une période déterminée (5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240 minutes) puis incubée 30 minutes sur glace. On a procédé ensuite à l'essai enzymatique de 10 minutes tel que décrit plus haut.

2.3.4.3 Test PAHBAH pour les cellulases (méthode de Lever et al, 1984).

Le test PAHBAH pour les cellulases fonctionne selon le même principe que le test pour les xylanases. Seuls le substrat et la courbe standard diffèrent. L'activité enzymatique est toujours évaluée en fonction de la quantité de sucres réducteurs libérés lors de la réaction enzymatique entre les cellulases et la cellulose. Trois inducteurs ont été testés, le carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne (Sigma), l'avicel pH 101 et l'avicel pH 105. Les cultures de 60S2, 60L4, S6, D2A, SB1, SB2 et SB3 ont été centrifugées à 4000g pour

30 minutes puis concentrées par un facteur de 6 sur cellule Amicon comme décrit à la section 2.3.4.2. Le concentré de surnageant a été utilisé comme solution d'enzyme pour les essais enzymatiques. Pour effectuer l'essai enzymatique, du carboxyméthylcellulose à viscosité faible (Sigma) à 1% (p/v) a été utilisé comme substrat de la réaction. La courbe standard est quant à elle produite à l'aide de concentrations de glucose (Anachemia) variant de 0 à 10mM. La suite de l'essai enzymatique a été effectuée selon la méthode décrite à la section 2.3.4.2

2.3.4.4 Dosage des protéines.

Le dosage des protéines de nos préparations a été effectué par la méthode de Bradford en utilisant le « BioRad Assay protein Kit » et le sérum albumine bovin (BSA) comme standard. Le réactif de Bradford a été dilué ¼ dans de l'eau milli-Q puis la solution a été filtrée sur filtre Whatman. La courbe standard a été produite à partir de différentes concentrations de BSA (BioRad) : 20, 30, 50, 70, 90µg/L. Pour chaque échantillon, 100µL ont été ajoutés à 5mL du réactif de Bradford (BioRad). La solution a été incubée de 8 à 10 minutes à température pièce puis la DO a été mesurée à 595nm. Les résultats ont été exprimés en mg de protéines par millilitre de milieu.

2.3.5 Caractérisation de la β -glucosidase de *Geobacillus thermodenitrificans* SB1.

2.3.5.1 Production de la biomasse et de la préparation d'enzyme

La souche *G. thermodenitrificans* Sb1 a été décongelée et étalée sur gélose TSA. Suite à l'incubation O/N à 63°C, les bactéries ont été récoltées dans 1mL de milieu TSB additionné de 0.1 % de cellobiose (Sigma). Dans un erlenmeyer de 1 L contenant 60mL du milieu précité, 1 mL d'inoculum a été introduit. La pré-culture a été incubée 24h à 60°C dans un bain-marie au niveau d'agitation 6, puis 1 mL a été repiqué dans du bouillon frais. Ce dernier a également été incubé 24h à 60°C. Les cultures ont été centrifugées à 4000g pour 30 minutes, à 4°C. Toutes les étapes subséquentes ont été effectuées à 4°C. Le culot de bactéries a été pesé puis resuspendu dans 1 volume (ou jusqu'à fluidité de la solution) de tampon sodium phosphate 0.05M à pH 7 froid. Avec un appareil à ultra-sons (Sonicator Ultrasonic processor XL, Mandel Scientific Compagny,

Ltd.), les bactéries ont été sonifiées en 60 cycles de 1 minute suivi de 45 secondes de repos entre chaque cycle ou jusqu'à ce qu'une observation au microscope montre le bris de la majorité des cellules. Les bactéries restantes et les débris ont été centrifugés 30 minutes à 17000g. Le surnageant résultant a été utilisé comme préparation d'enzyme pour des essais enzymatiques à différents pH et pour des essais de stabilité de l'enzyme. Les fractions cellulaires ont été centrifugées à 160 000g pendant 90 minutes à 4°C afin de séparer le cytoplasme des membranes. La fraction cytoplasmique et la fraction membranaire (culot) ont été conservées à 4°C pour un maximum de 30 jours et ont servi de préparation d'enzyme pour les essais enzymatiques. Les protéines des membranes ont été solubilisées dans 10 mL de tampon sodium phosphate 0.05M à pH 7 contenant 20% (v/v) de glycérol et de 1% (p/v) de triton X-100 (BioRad) après une agitation de 40 minutes dans la glace. La fraction cytoplasmique a été utilisée pour les essais enzymatiques permettant de déterminer l'optimum de température pour l'activité de l'enzyme ainsi que pour les essais de stabilité enzymatique.

2.3.5.2 Essais enzymatiques de la β -glucosidase avec le pNPG (Han et Srinivasan, 1969).

L'activité de la β -glucosidase a été mesurée en dosant la libération d'un composé chromogène jaune associé au substrat de l'enzyme. Le *p*-nitrophényl- β -D-glucoside (pNPG, Sigma), sous l'action de l'enzyme, se scinde en *p*-nitrophénol (chromophore jaune) et en glucose. À l'aide d'une courbe standard de *p*-nitrophénol (gardé à l'obscurité et congelé), de 0.001 mM à 1mM de concentration, il est possible d'obtenir une valeur de l'activité de l'enzyme en UI, où une UI représente la quantité d'enzyme nécessaire pour donner 1 μ mole de *p*-nitrophénol libéré par minute. La limite de sensibilité de cette méthode est de 0.001 unité d'enzyme.

Les essais enzymatiques de la β -glucosidase ont été effectués par la méthode suivante et ont servi à évaluer le pH et la température optimale. On doit tout d'abord préchauffer 0.950 mL de solution de pNPG (0.01M) dans un tampon approprié (0.05M) au pH désiré (tampon acétate pH 4, tampon citrate pH 6, tampon phosphate pH 6.5 et 7, tampon Tris-HCl pH8.5), et à la température désirée (50-95°C). La solution de pNPG doit être

préparée fraîchement et gardée à l'obscurité. Des volumes de 50µL des préparations d'enzymes ont ensuite été ajoutés au substrat préchauffé (essais en triplicata). La solution a été incubée 30 minutes à l'abri de la lumière puis arrêtée avec l'addition de 1 mL de Na₂CO₃ 1M froid et les tubes ont été placés dans un bain d'eau et de glace. Tous les échantillons ont ensuite été centrifugés 5 minutes à 13000g pour éliminer les précipités. La coloration a été mesurée à 400nm sur un spectrophotomètre SP6-550 (Canlab, PYE Unicam). Les blancs utilisés ont été obtenus en remplaçant la solution d'enzyme par 50µL de tampon 0.05M. La courbe standard a été effectuée aux mêmes conditions de température que les essais enzymatiques.

Les essais de stabilité de l'enzyme en présence de son substrat ont été effectués selon le même principe que ci-haut. Cependant, 9.5 mL de solution de pNPG et 500 µL de solution d'enzyme ont été ajoutés au tube à essai de façon à ce que 9 échantillons puissent être pris dans un même tube pour former la courbe de stabilité. Un échantillon de 1 mL est recueilli à chaque temps prévu jusqu'à un maximum de 8h d'incubation. Les échantillons d'enzymes pour les essais de stabilité de l'enzyme en absence de son substrat ont été effectués de la façon suivante. Chaque solution d'enzyme a été préincubée à 80° et 90°C pour 2 minutes suivie par une période d'incubation déterminée (5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240 minutes), puis incubée 30 minutes sur glace. On procède ensuite à l'essai enzymatique de 30 minutes tel que décrit plus haut.

2.3.5.3 Zymogrammes au MUG et au pNPG.

Pour tenter de mieux caractériser la β-glucosidase de SB1, des zymogrammes de la fraction cytoplasmique de SB1 ont été effectués après électrophorèse sur gel de focalisation isoélectrique (IEF) et sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodécyl sulfate). Les puits des gels IEF (Novex[®], Invitrogen) ont été chargés avec une solution d'enzyme (fraction cytoplasmique de SB1) préparée de la façon suivante : 5 µL de la préparation d'enzyme, 5 µL de tampon à échantillon pH 3-10. La solution d'enzyme a été déposée dans 2 puits des deux côtés du gel. Le standard BioRad couvre les points isoélectriques allant du pH 4.45 à 9.6. La préparation du tampon de migration et les conditions de migration ont été effectuées selon le protocole fourni par le fabricant en

employant le système de migration Invitrogen. Le gel est divisé en deux parties où chacune d'elle comprend un puit contenant l'échantillon d'enzyme. La moitié du gel comprenant le standard a été colorée 1h au bleu de Coomassie (0.05% (p/v) de Bleu – R250, 50% (v/v) méthanol, 10% (v/v) d'acide acétique, 40% d'eau milli-Q) avec agitation à 80 rpm (Fisher Clinical Rotater), puis décolorée dans une solution composée de 30% (v/v) méthanol, 7% (v/v) d'acide acétique et 63% d'eau milli-Q. Le gel a été conservé dans une solution d'acide acétique à 5 % (v/v). L'autre moitié du gel a été incubée 1h avec agitation à 80 rpm (Fisher Clinical Rotater) dans un tampon sodium phosphate 0.05M à pH 7 afin d'éliminer les ampholytes du gel. Le gel a ensuite été incubé à 60°C, pendant 20 minutes, 1h, 2h, 4h et toute la nuit dans une solution de MUG (4-méthylumbellyféryl- β -D-glucopyranoside, Sigma) 0.1M dilué dans du tampon sodium phosphate 0.05M à pH 7. L'apparition de fluorescence est vérifiée avec un appareil émetteur de UV portatif à 290nm (UVSL-25, Ultra-Violet Products, Inc. Calif). Le gel a finalement été coloré au bleu de Coomassie puis décoloré comme décrit plus haut. Les gels ont été conservés dans une solution d'acide acétique à 5% (v/v).

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS a été effectuée selon la méthode de Laemmli (1970) où le gel de concentration était à une concentration de polyacrylamide de 3% et le gel de séparation à 10%. Les échantillons ont été préparés selon différents protocoles. La solution tampon pour les échantillons (5X) a été préparée avec ou sans β -mercaptoéthanol (1.4 mL d'eau distillée, 1 mL de Tris-HCl à 0.5M, 3.2 mL de glycérol, 1.6 mL de SDS à 10% (p/v) et 0.8 mL de bleu de bromophénol à 0.5% p/v). Certaines préparations d'enzymes ont été préalablement concentrées par un facteur de 10 avec les filtres Nanospin Plus (Gelman Sciences) par une centrifugation de 13000g de 5 minutes. Les échantillons ont été préparés comme suit : 50 μ L de pNPG (0.01M), 60 μ L de solution d'enzyme, 22 μ L de tampon de l'échantillon. Tous les échantillons, ainsi que le standard (préparé avec un tampon d'échantillon comprenant du β -mercaptoéthanol) ont été bouillis 5 minutes, puis 24 μ L des solutions ont été déposés dans les puits du gel. Chaque échantillon d'enzyme a été chargé à 3 puits. Le standard a été chargé à raison de 10 μ L dans un seul puit. Le gel a été migré 7-8 minutes à 90 Volts pour le gel de concentration et 30-35 minutes à 200 Volts pour le gel de séparation.

Le gel est séparé en trois parties, chacune comprenant un puit d'échantillon. La partie du gel comprenant le standard est colorée au bleu de Coomassie comme décrit plus haut. L'autre moitié du gel est incubée 1h avec agitation dans une solution de Triton X-100 (BioRad) à 1% (p/v) puis 1h dans un tampon sodium phosphate 0.05M à pH 7.0 (Bae et al. 1999). Le gel est ensuite incubé à 60° ou 80°C, 20 minutes, 1h, 2h, 4h et toute la nuit dans une solution de MUG (Sigma) 0.1M ou de pNPG (Sigma) dilués dans du tampon sodium phosphate 0.05M à pH 7.0. L'apparition de fluorescence est vérifiée avec un appareil portatif émetteur d'UV à 290nm dans le cas de l'incubation avec le MUG. L'apparition d'une coloration jaunâtre est observée à l'œil nu pour le zymogramme au pNPG. Les deux gels sont finalement colorés au bleu de Coomassie puis décolorés comme décrit plus haut. Les gels sont conservés dans une solution d'acide acétique à 5% (p/v).

3. Résultats

3.1 Caractérisation des souches T3 et 60S1b.

3.1.1 Croissance sur milieux solides.

Afin de remplacer l'utilisation d'un milieu solide composé de lisier partiellement traité, différents milieux ont été évalués pour la croissance des souches T3 et 60S1b. Aucune croissance n'a été observée sur milieu BHI, TSA, Gélose-Columbia (BBL) à pH neutre ou alcalin (8.0-8.5) ainsi que sur milieu BSME utilisé dans la littérature pour la croissance de bactéries thermophiles du genre *Thermus*. Tel que présenté au tableau 8, des milieux contenant divers additifs au milieu BSME ont été expérimentés pour améliorer la croissance des souches. Ainsi, l'addition de protéose peptone 1% et d'un mélange de vitamines Wolin 1 % au milieu BSME a permis l'apparition de quelques colonies sur Pétri. Toutefois, le repiquage de ces colonies ne permettait pas de maintenir la croissance des souches T3 et 60S1b. Les meilleures conditions de croissance ont été obtenues sur milieu très riche composé de BSME additionné de peptone 2% et de vitamines Wolin 2% ou de NH_4Cl à 1%. Ces milieux permettaient d'obtenir un mince tapis bactérien pouvant être maintenu pour au moins plusieurs passages. Toutefois, bien que ces milieux ne permettent pas la production d'une biomasse comparable à celle obtenue sur milieu solide contenant du lisier partiellement traité, ils permettent néanmoins de maintenir les souches T3 et 60S1b. Des essais effectués en divisant les vitamines en 2 groupes, ont montré que le mélange composé de biotine, riboflavine et vitamine B12 était meilleur que le second mélange et permettait d'obtenir un mince biofilm.

Bien que le milieu lisier partiellement traité ait été utilisé initialement comme milieu de croissance optimal pour les souches T3 et 60S1b en produisant un épais tapis bactérien, l'utilisation subséquente de ce milieu s'est avérée inefficace pour leur croissance. Le lisier ayant été conservé pendant près d'un an à 4°C aurait perdu des éléments essentiels nécessaires à la croissance des souches T3 et 60S1b. En effet, après quelques passages, seul un mince tapis bactérien réussit à croître sur les pétris, cette croissance étant

Tableau 8. Intensité de la croissance des souches T3 et 60S1b sur les milieux solides BSME contenant différents additifs. (voir la section 2.2.1.5).

Milieu BSME +	T3 (3 ^e passage)	60S1b (3 ^e passage)
0.1%Wolin	-	-
0.5%PP*, 1%Wolin	+	-
0.5%PP, 2%Wolin	+	+
1%PP, 1%Wolin	+	+
1%PP, 2%Wolin	+	+
2%PP, 1%Wolin	++	+
2%PP, 2%Wolin	++	++
2%PP, 2%Wolin, 1% NH ₄ Cl	+	++
1%PP, 2%Wolin, 1% NH ₄ Cl	+	+
2%PP, 1% NH ₄ Cl	+++	+++
2%PP, 2%Wolin, 1% Urée	+	+
2%PP, 2%Wolin mélange 1	+	++
2%PP, 2%Wolin mélange 2	+	+

Légende : + petites colonies isolées, ++ petit tapis bactérien, +++ tapis bactérien soutenu mais mince. *PP-Protéose peptone no 3.

Tableau 9. Intensité de la croissance de T3 sur les milieux solides à base de lisier partiellement traité (juin 2005).

Milieux	T3 (3 ^e passage)
Lisier traité	+
Lisier - 12h	+
Lisier - 24h	+
Lisier - 48h	-
Lisier brute (non traité)	++
TSA + 10% lisier 12h	+
TSA + 50% lisier 12h	++
TSA + 10% lisier 24h	+
Milieu lisier 12h	+

Légende : + petites colonies isolées, ++ petit tapis bactérien, +++ tapis bactérien soutenu mais mince.

beaucoup plus faible que celle obtenue avec le lisier partiellement traité frais prélevé en 2003. De plus, des essais effectués avec un lisier prélevé de la ferme en juin 2005 n'ont également pas permis de supporter la croissance des souches T3. Ce lisier était différent et ne possédait pas les mêmes caractéristiques que celui obtenu les deux années précédentes. L'ajout de TSA au lisier partiellement traité (12h) semblait aider à la croissance de T3, avec l'apparition d'un mince tapis bactérien.

3.1.2 Essais de croissance de la souche 60S1b en milieux liquide

La croissance de la souche 60S1b en milieu liquide a été évaluée dans différents milieux de culture (Figure 6). Une faible croissance a été observée avec les milieux BSME additionnés de méthionine, de protéose peptone, et de NH_4Cl en forte concentration (6%) ou de mélange de vitamines Wolin, ainsi que le milieu comprenant du glucose. Généralement, après une période de latence de 2 heures, on observe une augmentation de la densité optique (D.O.) pendant les premières 8 heures d'incubation et par la suite, une stabilisation de la D.O. Les milieux contenant peu de NH_4Cl , et le milieu comprenant 30% de lisier partiellement traité ont montré peu ou pas de croissance.

3.1.3 Microscopie électronique de la souche T3.

L'examen microscopique de la souche T3 après coloration négative montre la présence de longs bacilles mesurant $0.3-0.5 \times 3-4 \mu\text{m}$ qui sont généralement réunis en longues chaînes (Figure 7a). Quelques bactéries montrent la présence d'une spore terminale et déformante. Des images de coupes ultra-minces des bactéries sont présentées en Figure 7b). On observe l'absence d'une membrane externe suggérant qu'il s'agit de bactéries Gram positives. Des spores libres ou en formation y sont observées. On peut y voir le noyau, le cortex ainsi que les membranes interne et externe de la spore. La spore libre a un diamètre d'environ $0.7 \mu\text{m}$.

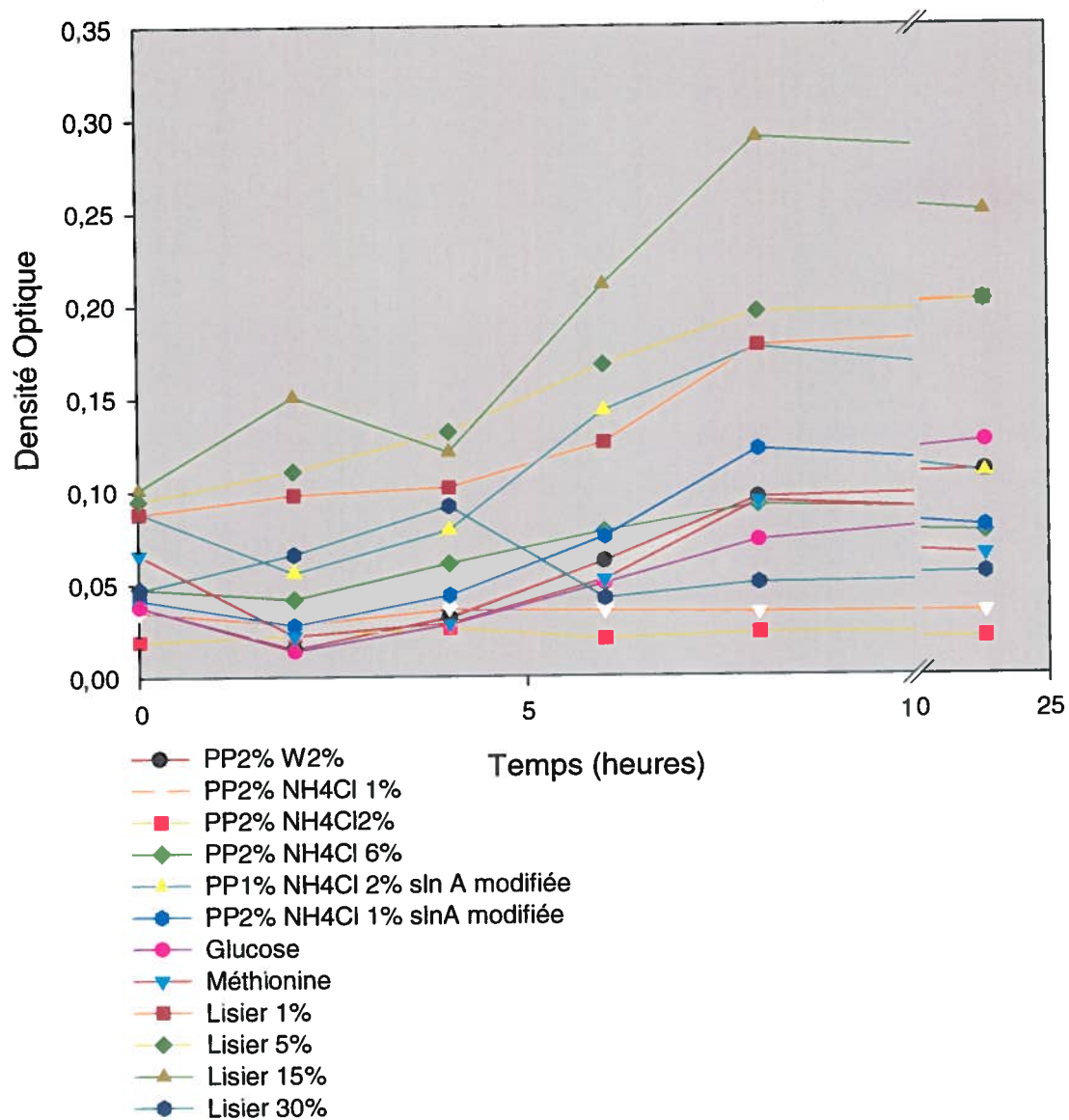


Figure 6. Culture de la souche 60S1b dans différents milieux liquides.

*Tous les milieux sont composés de milieu BSME avec les additifs mentionnés ci-haut. Le lisier partiellement traité utilisé (lot 2003) a été conservé à 4°C pendant un an avant son utilisation.

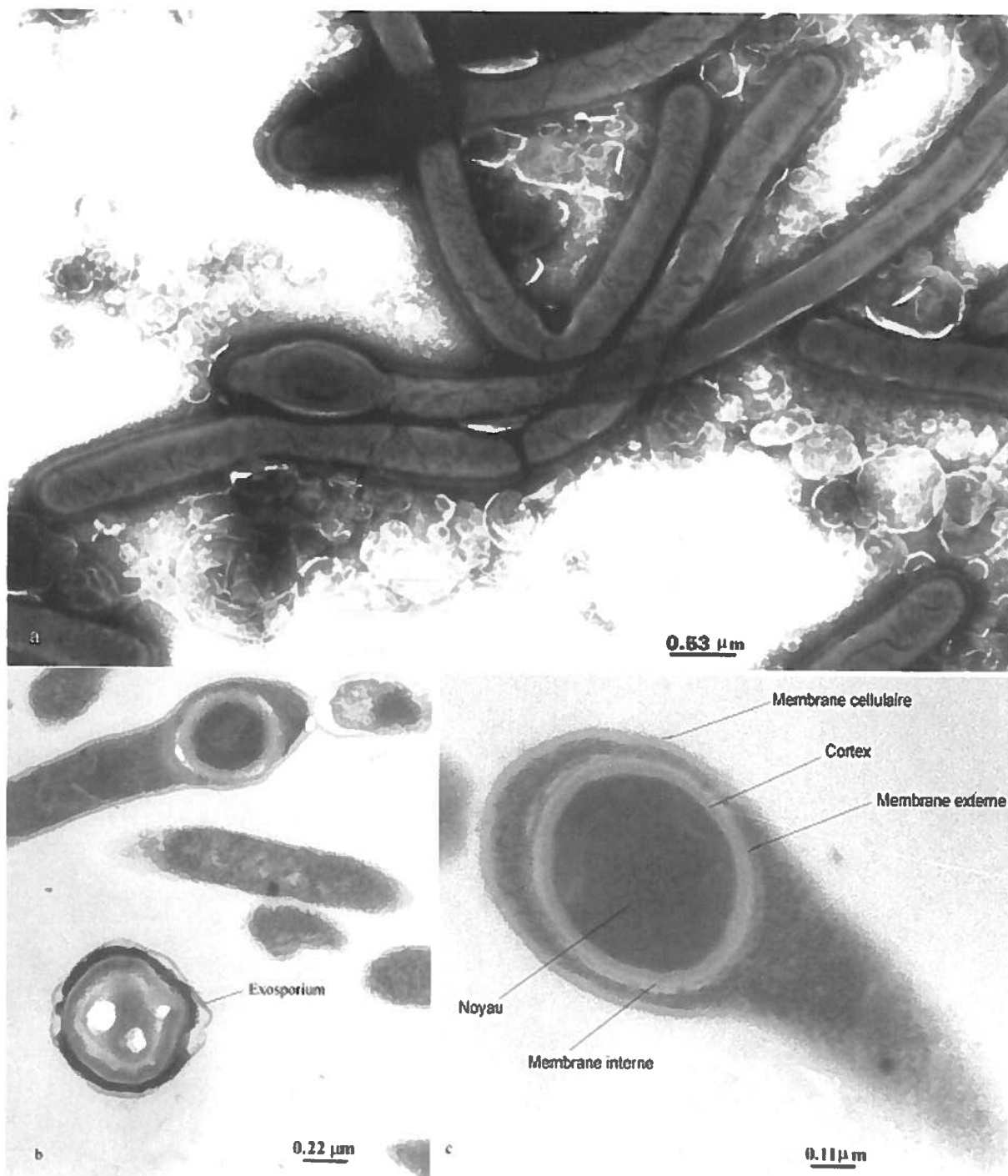


Figure 7. Microscopie électronique de *Bacillus T3*. a) Grossissement de 17 000X ; b) coupe ultra-mince, grossissement de 44 000X ; c) coupe ultra-mince, grossissement de 88 000X.

3.1.4 Profil d'acides gras de T3 et 60S1b.

Les profils d'acides gras des souches T3 et 60S1B sont présentés au tableau 10 ainsi que celles retrouvées dans la littérature concernant des espèces apparentées appartenant à la famille des *Bacillaceae*. On observe, pour les souches T3 et 60S1B, que 50.2 et 51.6 % des acides gras totaux sont retrouvés sous forme d'acide stéarique, alors qu'aucune autre des espèces mentionnées ne possède cet acide gras à un niveau aussi élevé. On retrouve également l'acide gras (14 :0) à 12.4 % pour 60S1B et l'acide gras (18 :0) à 8.5 % pour la souche T3. Les genres *Geobacillus* et *Anoxybacillus* présentent l'acide iso-pentadécanoïque en majorité, alors que pour les genres *Bacillus* et *Planococcus*, l'acide anteiso-pentadécanoïque prédomine.

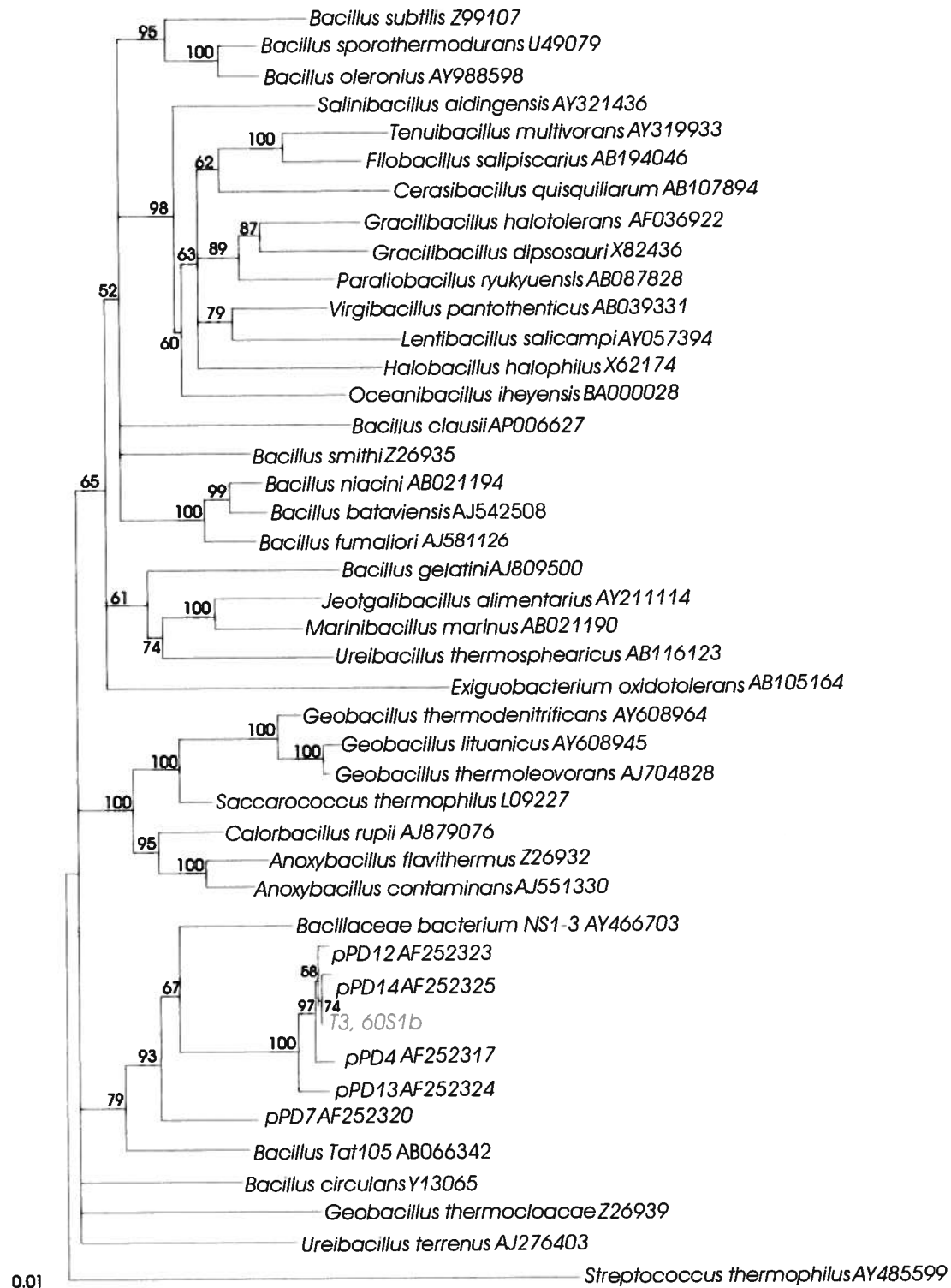
3.1.5 Analyse phylogénétique du gène codant pour l'ARNr 16S de T3 et 60S1b.

Les séquences du gène codant pour l'ARN ribosomal 16s des souches T3 et 60S1B ont été déterminées puis comparées aux banques de données pour évaluer leur similarité avec les autres bactéries apparentées (données fournies en appendice 2). L'analyse phylogénétique des séquences des gènes 16S de T3 et 60S1b a permis d'obtenir l'arbre présenté à la figure 8. Ce dernier comprend à la fois des séquences d'espèces n'ayant pas encore été officiellement publiées, comme les espèces pPD4, pPD7, pPD12, pPD14, *Bacillus* TAT105, ainsi que des séquences d'espèces validement publiées provenant de chaque genre bactérien des *Bacillaceae*. En regardant la localisation de T3 et 60S1b dans l'arbre phylogénétique, on observe qu'elles se retrouvent dans un sous-groupe de bactéries non-cultivées incluant les souches pPD4 à pPD14 et autres souches inconnues. Parmi les espèces analysées pour la construction de l'arbre phylogénétique, l'espèce connue la plus rapprochée de T3 et 60S1b est *Bacillus circulans* avec un pourcentage de similarité de 91.5%, suivie par *Geobacillus thermodenitrificans*, *Ureibacillus terrenus* et *Saccharococcus thermophilus* avec un pourcentage de similarité de 90.9%.

Tableau 10. Comparaison des profils d'acide gras (%) de T3 et 60S1b avec d'autres espèces de la famille des *Bacillaceae*.

Acide gras	T3	60S1B	1	2	3	4	5	6	7	8
10:0	—	0.30	—	—	—	—	—	—	—	—
12:0	0.29	0.24	—	—	—	—	6.9	—	—	—
13:0i	—	—	—	—	0.2	—	—	—	—	—
13:0a	—	—	—	5.1	0.8	—	—	—	—	—
14:0i	—	0.47	0.4	0.1	4.0	2.3	—	13.1	10.4	—
14:0	5.20	12.41	1.8	1.5	2.9	1.1	7.3	—	—	—
15:0i	3.62	2.57	33.6	39.8	13.9	13.2	38.7	9.5	3.8	19.0
15:0a	2.43	1.39	1.8	6.4	58.4	40.0	2.0	30.6	49.7	12.0
15:0	4.25	6.19	2.3	0.5	1.0	—	0.9	3.1	4.9	—
15:0 OH	—	—	—	—	—	—	0.3	—	—	—
16:1w7c OH	—	—	—	—	0.2	—	—	8.9	12.1	—
16:1 w11c	—	—	—	—	2.6	4.8	—	0.7	4.5	—
16:0 2-OH	—	—	—	—	—	—	—	0.8	—	—
16:0i	6.51	—	9.5	6.2	4.4	4.6	2.6	18.5	4.1	6.0
16:0	50.18	51.60	11.0	9.2	2.7	10.2	14.5	0.8	1.5	8.0
16:0 10-Met	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17:1i	—	—	—	—	—	—	—	—	4.4	—
17:1a	—	0.42	—	—	—	—	0.8	1.3	—	—
17:1w7c	—	0.75	—	—	—	—	—	—	—	—
17:1i w10c	—	—	—	—	0.1	1.6	—	0.8	1.7	—
17:0i	4.31	0.70	26.6	17.1	1.3	7.8	0.8	—	—	13.0
17:0a	4.04	0.80	7.3	13.3	4.8	12.2	0.1	4.4	2.8	42.0
17:0	1.97	2.08	2.9	—	—	—	0.5	2.5	—	—
18:1w9c	1.71	5.57	—	—	—	—	4.3	—	—	—
18:1w7c	—	1.37	—	—	—	—	—	—	—	—
18:1w6c	5.07	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18:0i	—	—	0.2	—	—	—	—	2.1	—	—
18:0	8.49	5.08	1.3	—	—	1.0	10.4	—	—	—
18:1 δ 9	—	—	—	—	—	—	4.3	—	—	—
18:1 δ 1	—	—	—	—	—	—	1.0	—	—	—
18:2	—	—	—	—	—	—	2.2	—	—	—
20:0	—	—	—	—	—	—	0.6	—	—	—
20:4 w6,9,12,15c	0.31	1.93	—	—	—	—	—	—	—	—
Somme de 16:1 w7c/15:0i	1.08	1.23	—	—	—	—	—	—	—	—
Somme de 18:2 w6,9c/18:0a	0.55	2.83	—	—	—	—	—	—	—	—
Somme de 17 :1i I, 17 :1a B	—	—	—	—	0.3	1.2	—	1.3	—	—

1: *Geobacillus thermodenitrificans* (Nazina et al. 2001); 2: *Geobacillus stearothermophilus* (Nazina et al. 2001); 3: *Bacillus circulans* DSM11 (Kampfer et al. 1994); 4: *Bacillus subtilis* IAM 1026 (Venkateswaran et al. 2003); 5: *Anoxybacillus pushchinensis* (Pikuta et al. 2000); 6: *Planococcus maritimus* (Yoon et al. 2003); 7: *Planomicrobium chinense* (Wang et al. 2005); 8: *Bacillus smithi* (Bae et al. 2004).



*Les nombres indiqués aux embranchements de l'arbre représentent le nombre de fois où le branchement a été obtenu sur un bootstrap de 1000.

Figure 8. Arbre phylogénétique de la famille des *Bacillaceae* et des souches T3 et 60S1b.

3.2 Évaluation du potentiel enzymatique des souches constituant notre banque de bactéries thermophiles.

Le deuxième objectif du projet a été de faire une évaluation préliminaire du potentiel enzymatique des souches de la banque de bactéries thermophiles. Les galeries API-Zym ont été utilisées comme outil de dépistage d'un large spectre d'enzymes, soit 19 activités enzymatiques différentes sur la totalité des souches de la banque. Les activités phytasiques, xylanasiqes et cellulasiqes ont été évaluées sur divers représentants de chaque espèce de la banque tel qu'indiqué dans la section 3.

3.2.1 Galeries API-Zym.

Les résultats obtenus avec les souches d'*Ureibacillus thermosphaericus* démontrent de très bonnes activités de phosphatase alcaline, d'estérase (C4), d'estérase lipase (C6), de leucine arylamidase, d' α -chymotrypsine, de phosphatase acide et d' α -glucosidase (Tableau 11). Certaines activités sont très variables d'une souche à l'autre, alors que l'estérase (C4) montre une forte activité chez toutes les souches d'*U. thermosphaericus* testées. Les souches *G. thermodenitrificans* Sb1 et *G. toebii* Sb2 ont montré la plus grande diversité d'activités enzymatiques avec une intensité maximale. En plus des activités mentionnées ci-haut, on observe entre autres des activités de phosphohydrolase, α -galactosidase, α - et β -glucosidase.

Les résultats des tests effectués avec les souches de *Bacillus* de la série pPD14 et de *B. thermocloacae* sont présentés au Tableau 12. On dénote, pour les bactéries de la série pPD14, de fortes activités d'estérase (C4), d'estérase lipase (C8), de leucine arylamidase, de cystine arylamidase et d' α -chymotrypsine. Les souches de *B. thermocloacae* démontrent sensiblement les mêmes activités. Toutes les souches de *B. thermocloacae* possèdent cependant une très forte activité d' α -glucosidase, et quelques souches montrent une activité de β -galactosidase.

3.2.2 Recherche de bactéries avec une activité phytase

Comme décrit dans la section 1.2.2.1, le lisier de porc est une substance riche en phytate, puisque les animaux mono-gastriques ne possèdent pas l'enzyme nécessaire à sa

dégradation. De ce fait, nous avons donc de bonnes raisons de croire que des souches de bactéries thermophiles provenant d'un bioréacteur ayant comme substrat du lisier de porc, pourraient posséder un gène codant pour une phytase. La phytase recherchée lors de ce projet a été une enzyme de la famille des β -propeller, étant donné les caractéristiques particulières de cette famille d'enzyme, et la forte majorité des bactéries de la famille *Bacillaceae* dans notre banque.

Tableau 11. Résultat des galeries API-Zym des souches de *Ureibacillus thermosphaericus*, de *Geobacillus thermodenitrificans* (Sb1) , *Geobacillus toebii* (Sb2) et de la souche Sb3.

Puits	S2	S3	S4	S5	S6	S8	S9	S10	S11	Sol13	TG3	RD2	D1	D2	D2A	Sb1	Sb2	Sb3
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	2	0	0	0	4	0	0	3	0	4	5	1	1	1	5	5	3
3	5	4	5	5	4	5	4	4	5	4	5	5	4	4	5	4	4	4
4	3	2	4/3	2	0	4/5	3	1	5	0	4	5	2	2	3	4	4	2
5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	3	1	3	4	1	5	5	1	4	2	5	2/3	3	0/1	4	5	5	1
7	0	1	0	0	0	4	1	0	2	0	2	0	0	0	0	1	5	0
8	0	0	0	0	0	4	1	1	3	1	5/4	4	0	0	0	3	4	0
9	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
10	0	2	0	0	3	5	5	0	5	1	5	5	0	0	0	3	5	3
11	2	3	2	3	2	3	0	0	3	5	5	5	2	2	0	5	5	4
12	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3/4	0	0	0	0	0	5	5	2
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5/4	5
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	3
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

No du puits 1: témoin ; 2 : phosphatase alcaline ; 3 : estérase (C4) ; 4 : estérase lipase (C8) ; 5 : lipase (C14) ; 6 : leucine arylamidase ; 7 : valine arylamidase ; 8 : cystine arylamidase ; 9 : trypsine ; 10 : α -chymotrypsine ; 11 : phosphatase acide ; 12 : naphthol-AS-BI-phosphohydrolase ; 13 : α -galactosidase ; 14 : β -galactosidase ; 15 : β -glucuronidase ; 16 : α -glucosidase ; 17 : β -glucosidase ; 18 : N-acétyl- β -glucosaminidase ; 19 : α -mannosidase ; 20 : α -fucosidase.

0 : pas d'activité ; 5 : activité maximale.

Tableau 12. Résultats des galeries API-Zym des souches de *Bacillus sp.* et *Bacillus thermocloacae*.

Puits	<i>Bacillus sp.</i>								<i>Bacillus thermocloacae</i>					
	T3	60S1b	60S2	60S3	60S5	60L4	60L1bb	60L1p	60L2	60L3	60L5	60L7	60L8	60S4
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	3	4	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3/2	5	4	5	4	5	5	4/5	5	5	4	4	5	5
4	3	3	3	5	3	2	2	3	3	3	2	2	4	3
5	1/0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	3	5	4	3	1	1/2	1	2	1/2	1	1	1
7	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	4	5	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	3	0	0	1	0	1	0	3	0	0	1
10	0	1	5	5	4	5	0	0	0	3	0	0	0	0
11	0	0	2	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
12	0	0	0	4	3	3	0	0	1	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	3	0	0
14	0	0	0	0	0	0	3/2	5	2	0	0	5	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1/0
16	0	5	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5
17	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	1	1	1	1
18	0	0	0	0	0	0	1/0	0	1	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

No du puits 1: témoin ; 2 : phosphatase alcaline ; 3 : estérase (C4) ; 4 : estérase lipase (C8) ; 5 : lipase (C14) ; 6 : leucine arylamidase ; 7 : valine arylamidase ; 8 : cystine arylamidase ; 9 : trypsine ; 10 : α -chymotrypsine ; 11 : phosphatase acide ; 12 : naphтол-AS-BI-phosphohydrolase ; 13 : α -galactosidase ; 14 : β -galactosidase ; 15 : β -glucuronidase ; 16 : α -glucosidase ; 17 : β -glucosidase ; 18 : N-acétyl- β -glucosaminidase ; 19 : α -mannosidase ; 20 : α -fucosidase.

0 : pas d'activité ; 5 : activité maximale.

3.2.2.1 Recherche d'activité phytase sur milieux solides.

En se basant sur la capacité des milieux contenant du Ca-phytate à montrer l'aptitude des bactéries à produire une phytase, plusieurs souches de chaque espèce de la banque de

bactéries ont été inoculées sur ces milieux. Aucune apparition de zone claire autour des colonies n'a été observée suggérant que nos souches ne produisent pas de phytase. Ces résultats nous ont conduits à utiliser des échantillons prélevés du bio-réacteur thermophile comme source potentiel de bactéries productrices de phytase. Une fois de plus, aucune zone claire n'a été observée lors de ces essais. L'utilisation d'un autre inducteur, soit le son de blé, fréquemment utilisé pour la production de phytase, a été expérimentée. Différents enrichissements à partir de la biomasse du bioréacteur dans des milieux contenant du son de blé ont été effectués en conditions thermophiles, puisensemencés sur les milieux solides appropriés, tels que déjà décrits. De ces milieux, trois souches bactériennes ont été isolées en culture pure et ajoutées à notre banque de bactéries thermophiles, soient Sb1, Sb2 et Sb3. Les souches Sb1 et Sb3 sont les seules souches à avoir produit une zone claire autour des colonies sur les milieux solides contenant du Ca-phytate, ces dernières étant issues de l'enrichissement au son de blé à base de milieu BSME-PP2-NH₄Cl. *Bacillus subtilis* DS11 et *Bacillus licheniformis* (ATCC 10716) ont servi de témoin positif pour prouver l'efficacité de notre méthode. Seul *Bacillus licheniformis* a produit une légère zone de décoloration sur les milieux solides.

La souche Sb1 se présente comme un bâtonnet moyen Gram positif formant de longues chaînes. Aucune formation de spore n'a pu être observée. En analysant la séquence d'ADN du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, cette bactérie a été identifiée comme faisant partie de l'espèce *Geobacillus thermodenitrificans*. La souche Sb2 est un long bacille Gram positif produisant des spores en position terminale. L'analyse de la séquence codant pour l'ARN ribosomal 16S révèle l'appartenance de Sb2 à l'espèce *Geobacillus toebii*. La coloration de Gram effectuée sur la souche Sb3 la montre comme un court bacille Gram positif pouvant sporuler. Les trois souches présentent une morphologie coloniale semblable. Les colonies sont larges, blanchâtres et rugueuses.

3.2.2.2 Essai enzymatique de la phytase et dosage colorimétrique des phosphates.

La présence de zones claires autour des colonies des souches Sb1 et Sb3 ayant été observées sur milieu solide contenant du Ca-phytate, des essais ont été effectués à partir de culture liquide pour confirmer la présence de phytase. Les surnageants de culture de

Bacillus subtilis DS11, *Bacillus licheniformis* (ATCC 10716), Sb1 et Sb3 dans un milieu contenant du son de blé ont été utilisés pour l'essai enzymatique décrit à la section 2.3.3.4. La libération de phosphates a alors été mesurée. Aucune augmentation de phosphate n'a été observée au cours de nos essais enzymatiques pour Sb1 et Sb3 (figure 9). *Bacillus subtilis* DS11 et *Bacillus licheniformis* ont servi de témoins positifs comme souches productrices de phytase. Dans les conditions utilisées, seul *Bacillus subtilis* a présenté une activité enzymatique où l'on a observé la production de phosphate. Ces résultats suggèrent que les souches Sb1 et Sb3, du moins dans les conditions de culture utilisées, ne produisent aucune phytase.

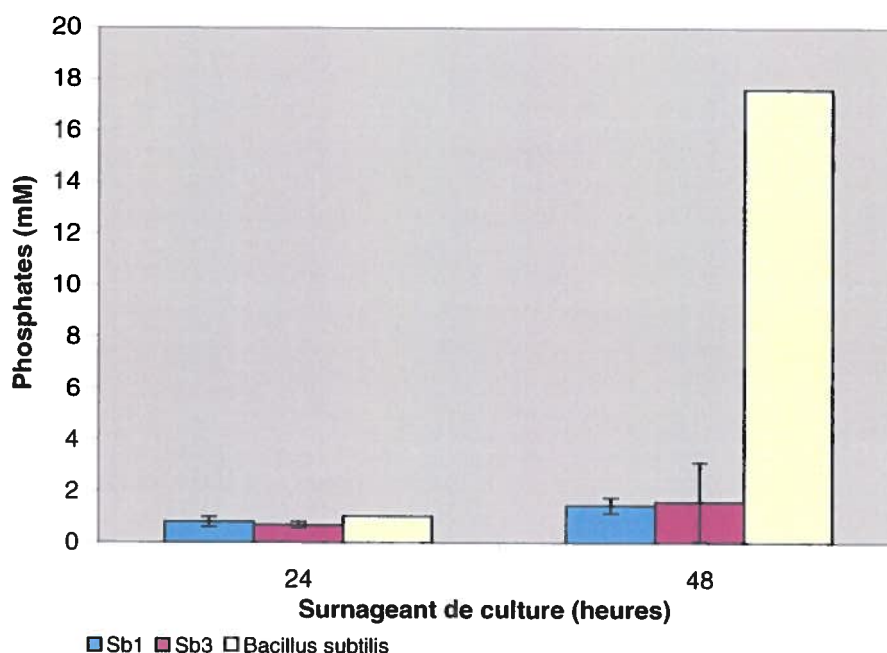
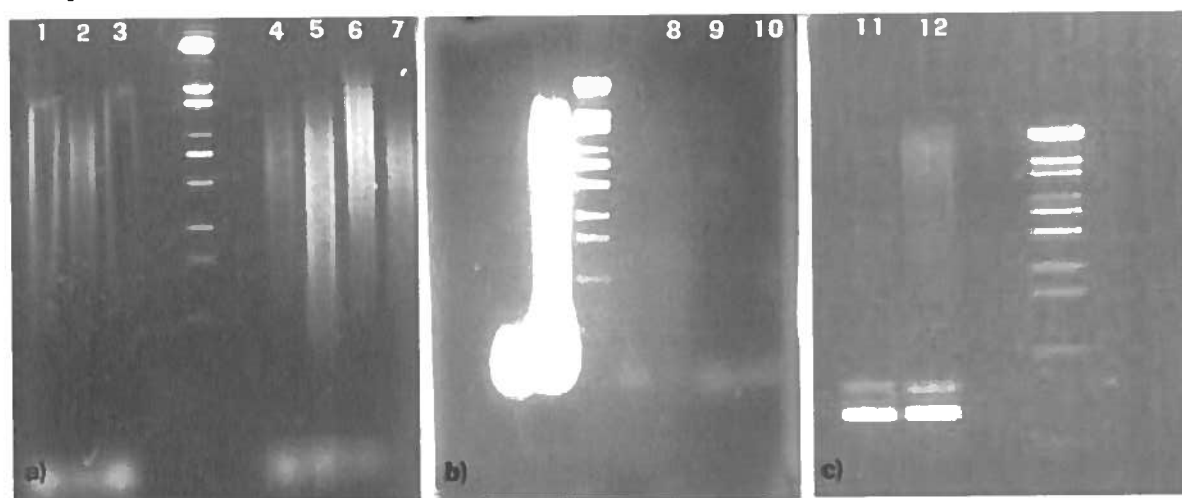


Figure 9. Concentration en phosphate mesurée lors de l'essai enzymatique des surnageants de culture après 24 et 48h d'incubation des souches Sb1, Sb3 et *Bacillus subtilis* DS11 .

3.2.2.3 Recherche d'un gène codant une phytase par PCR dégénéré.

L'absence de production d'activité phytase ne signifiant pas qu'il y ait absence du gène dans les bactéries, ce dernier a été recherché directement par l'utilisation d'amorces de PCR dégénérées. Ces dernières, fabriquées selon les séquences consensus de plusieurs phytases de type β -propeller, devaient être en mesure d'amplifier lors de la réaction de

PCR, un fragment de 560Kb du gène de la phytase désirée du génome de la bactérie. Tel qu'illustré sur la figure 10 a) et b), aucun amplicon de cette taille n'a été observé après PCR pour l'ensemble des échantillons testés, et ce, même après un PCR niché sur les échantillons provenant du lisier brut, du lisier partiellement traité à 60°C et de l'enrichissement au son de blé, échantillons qui semblaient avoir une trace de l'amplicon désiré. Par contre, les amorces ont été testées avec succès sur les deux souches de *Bacillus* publiées comme étant productrices de phytase (Figure 10 c). En conclusion, aucun gène codant pour une phytase n'a été détecté dans la banque de bactéries thermophiles, ni des différents échantillons de lisier testés selon les conditions d'expérimentation utilisées dans ce projet.



1) souche 60S3; 2) RD2; 3) S8; 4) Sol13; 5) Sb1; 6) Sb2; 7) Sb3; 8) lisier traité ; 9) enrichissement au son de blé ; 10) lisier brut; 11) *B. licheniformis*; 12) *B. subtilis*.

Figure 10. a et b) Résultat de l'amplification du gène codant pour la phytase sur les différents échantillons testés. c) Amplification des gènes de la phytase de *Bacillus* DS11 et de *Bacillus licheniformis*.

3.3 Recherche de xylanase.

3.3.1 Détection d'activité xylanase sur milieux solides.

Les souches suivantes cultivées sur milieu solide contenant du xylane ont produit une zone claire autour des colonies après coloration du milieu au rouge Congo, ce qui suggère une activité de xylanase : 60S2-3, 60S5, 60L4, 60L1bb, 60L2, 60L7, 60S4, D2A, D1-2,

S2-S6, S8-11, Sol13. Le surnageant de culture des espèces Sb1, Sb2, Sb3, D2A, Sol13, S6, 60S2 cultivé sur milieu BHI contenant 0.1% de xylane d'avoine a été déposé dans des puits d'une gélose RBB-xylane et incubés 18h afin de vérifier l'activité enzymatique. Seuls les surnageants 24h de D2A et SB1 ont produit une zone claire stable lorsque leur activité de xylanase a été testée sur gélose RBB-xylane (Figure 11).

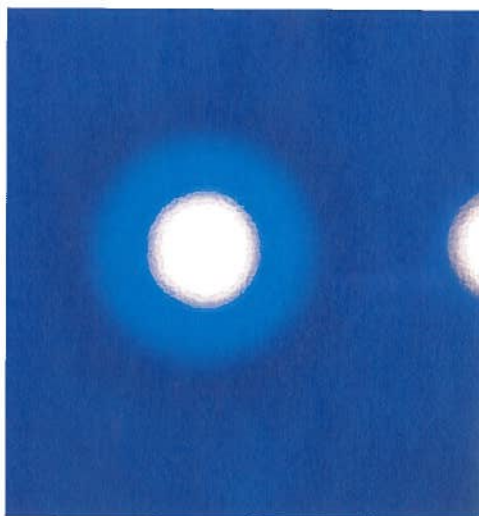


Figure 11. Test d'activité xylanase d'un surnageant de culture de la souche Sb1.

3.3.2 Caractérisation de l'activité xylanasique de *Geobacillus thermodenitrificans* Sb1.

Suite aux résultats obtenus à la section précédente, l'activité de xylanase de la souche Sb1 a été sélectionnée pour une caractérisation préliminaire. La température et le pH optimal ainsi que la stabilité de l'enzyme en présence ou en absence de xylane, ce dernier étant le substrat naturel de l'enzyme, ont été déterminés en utilisant un concentré (10X) de surnageant de culture de la souche Sb1, l'activité de xylanase étudiée étant une enzyme extracellulaire. Aucune purification, ni optimisation de production de l'enzyme n'ont été effectuées. L'activité xylanasique du mélange d'enzyme utilisé pour les essais suivants était de 10.6UI/mg de protéines.

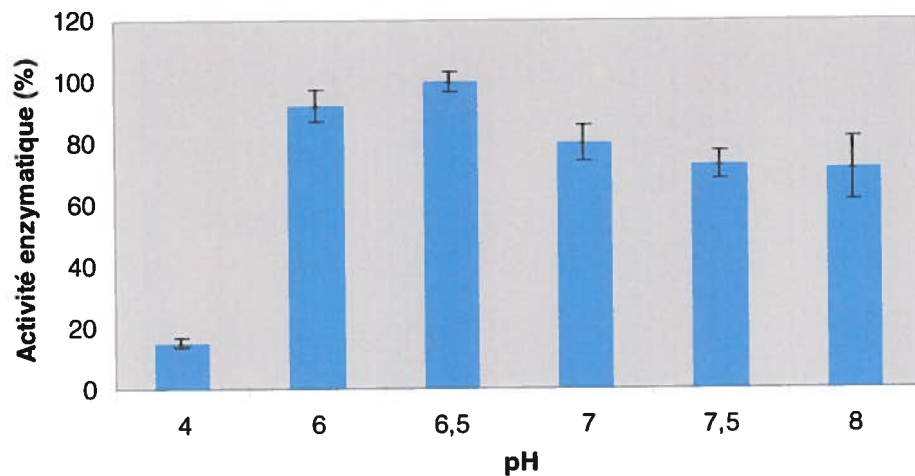


Figure 12. Effet du pH sur l'activité de la xylanase de *G. thermodenitrificans* Sb1.

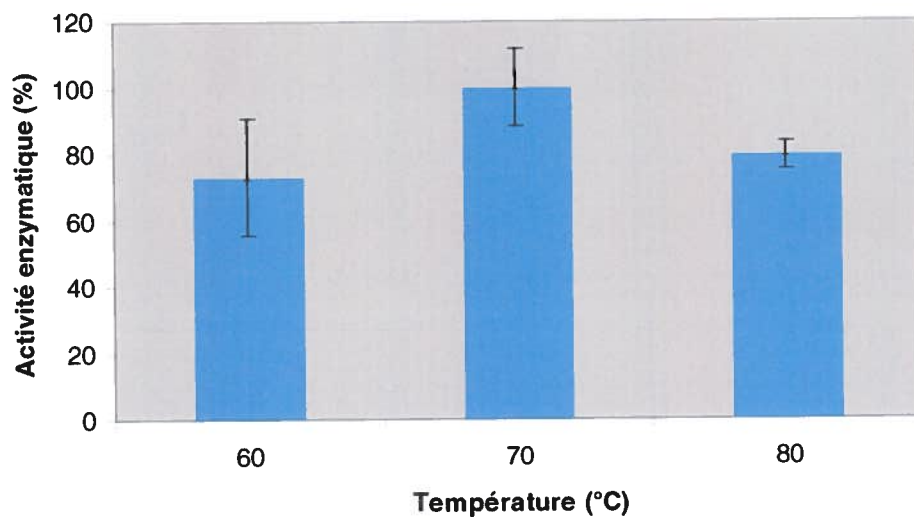


Figure 13. Effet de la température sur l'activité de la xylanase de *G. thermodenitrificans* Sb1.

Selon la figure 12, le pH optimal de la xylanase de la souche Sb1 serait de 6.5 bien qu'une bonne activité ait été observée dans la zone de pH testée, soit entre 6.0 et 8.0. De plus, l'enzyme posséderait une température optimale d'activité voisine de 70°C tout en conservant 80% de son activité à 80°C.

La stabilité de l'enzyme a été évaluée selon la présence ou l'absence du substrat de la xylanase, le xylane. La stabilité en présence de xylane a été évaluée en mesurant l'apparition de sucres réducteurs dans le temps dans le mélange total. La quantité de substrat utilisée dans le test était en concentration non limitante. La stabilité en absence de xylane a, quant à elle, été évaluée en mesurant l'activité enzymatique par l'apparition de sucres réducteurs au cours d'essai d'une durée de 10 minutes, l'enzyme ayant préalablement été exposée un temps prédéterminé à la température désirée. Seulement 2.5mM de sucre réducteurs ont été libérés, confirmant que la concentration en substrat était encore suffisante à la fin de l'essai enzymatique pour protéger les enzymes actives.

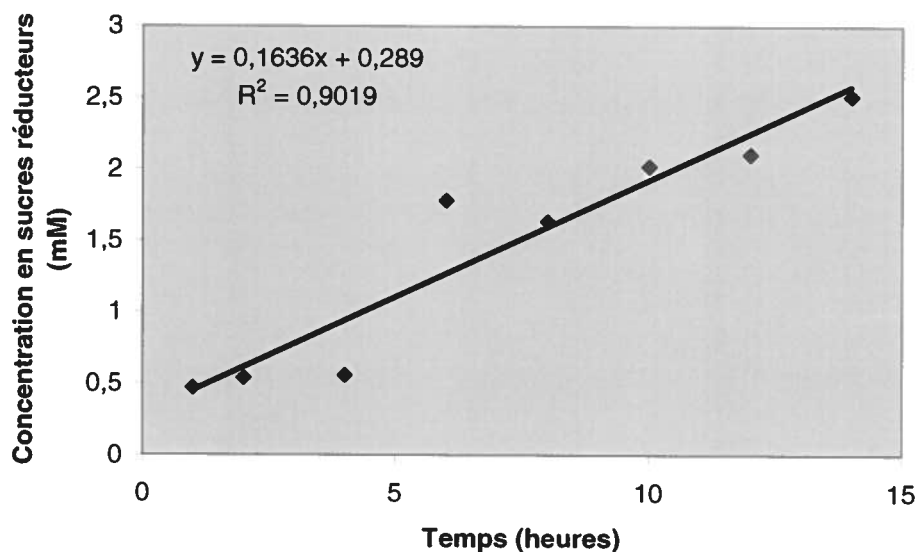


Figure 14. Stabilité de l'activité de xylanase à 70°C en présence de xylane.

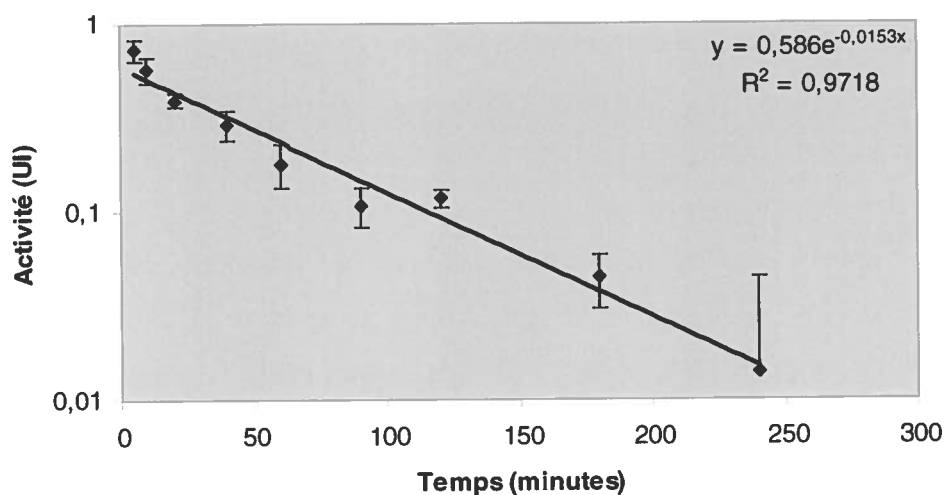


Figure 15. Stabilité de l'activité xylanasique à 70°C en absence de xylane.

On observe que la xylanase lorsqu'incubée à 70°C en présence de son substrat, présente une activité optimale sans diminution pendant les 14 heures testées (figure 14). En absence de substrat, une baisse d'activité de l'enzyme est observée en fonction de la durée d'incubation (figure 15). Dans les conditions utilisées, le temps de demi-vie de l'enzyme, estimé à partir de la courbe de tendance, est de 45.3 minutes.

3.4 Recherche de l'activité cellulasique.

Les souches de notre collection ont été testées pour la production de cellulase sur milieu solide approprié contenant du carboxyméthylcellulose. Les souches suivantes ont montré une zone claire autour des colonies suite à la coloration au rouge Congo suggérant la présence d'une activité cellulasique : 60S2-3, 60S5, 60L4, 60L1bb, 60L2, 60L7, 60S1b, TG3, D2A, RD2, D1-2, S2-6, S8-11 et Sol13. Des surnageants de culture concentrés 6 fois après induction avec, soit du carboxyméthylcellulose à viscosité moyenne, soit de l'avicel pH 101 ou de l'avicel pH 105, ont été préparés pour les souches 60S2, 60L4, S6, D2A, SB1, SB2 et SB3. Aucune activité cellulasique n'a été détectée lors des essais enzymatiques utilisant le carboxyméthylcellulose à viscosité faible comme substrat. Suite à ces résultats, nous avons délaissé notre étude des cellulases pour nous concentrer sur une autre enzyme potentiellement intéressante.

3.5 Étude de l'activité de β -glucosidase de *Geobacillus thermodenitrificans* Sb1.

Les résultats de la galerie API-Zym effectuée sur *G. thermodenitrificans* Sb1 avaient montré une forte activité (niveau 5) de β -glucosidase. Cette enzyme a donc été étudiée plus en profondeur. La production de l'enzyme a été effectuée en milieu liquide TSB contenant 0.1% de cellobiose. Aucune activité n'a été détectée dans le surnageant des cultures mais était retrouvée dans l'extrait cellulaire obtenu après traitement aux ultrasons, suggérant que l'enzyme était intracellulaire. Après fractionnement cellulaire et isolement des fractions cytoplasmiques et membranes, l'activité a principalement été détectée dans la fraction cytoplasmique. Aucune purification de l'enzyme n'a été effectuée sur la fraction cytoplasmique présentant une activité, et aucune optimisation de la production de l'enzyme n'a été tentée.

3.5.1 Caractérisation de l'activité de β -glucosidase de SB1.

Le pH et la température optimaux de l'activité β -glucosidasique de SB1 ont été évalués selon le protocole décrit à la section 2.3.5.2 avec le lysat bactérien brut ou avec la fraction cytoplasmique, respectivement. La stabilité de l'activité enzymatique été testée en présence ou en absence du substrat, le pNPG en concentration non limitante, aux températures et pH optimaux d'activité de l'enzyme (figures 18 et 19), soit à pH 7 et à 90°C, tel que présenté aux figures 16 et 17. Dans les conditions testées, l'activité enzymatique peut rester stable jusqu'à 8 heures d'incubation lorsque mise en présence du substrat (figure 18). Cependant, en absence de ce dernier (figure 19), elle subit une forte diminution d'activité, soit 34.9% dans les 5 premières minutes d'incubation, et continue de décroître, mais à un rythme plus lent dans le temps, démontrant une plus faible stabilité à la chaleur en l'absence de substrat, mais tout en conservant une certaine activité après 2 heures d'incubation.

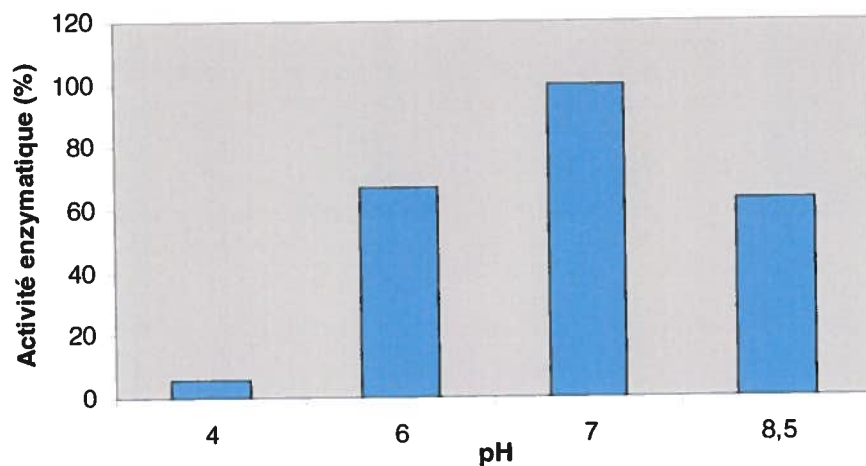


Figure 16. Effet du pH sur l'activité de la β -glucosidase effectué avec un extrait brut de *G. thermodenitrificans* Sb1. L'activité de la préparation était de 0.32UI/mg de protéines.

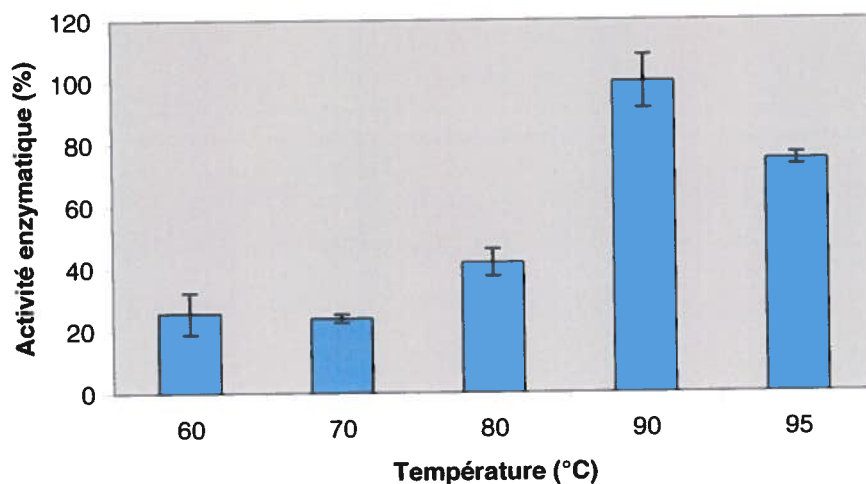


Figure 17. Effet de la température sur l'activité de la β -glucosidase retrouvée dans la fraction cytoplasmique de *G. thermodenitrificans* Sb1. L'activité de la préparation était de 0.49UI/mg de protéines.

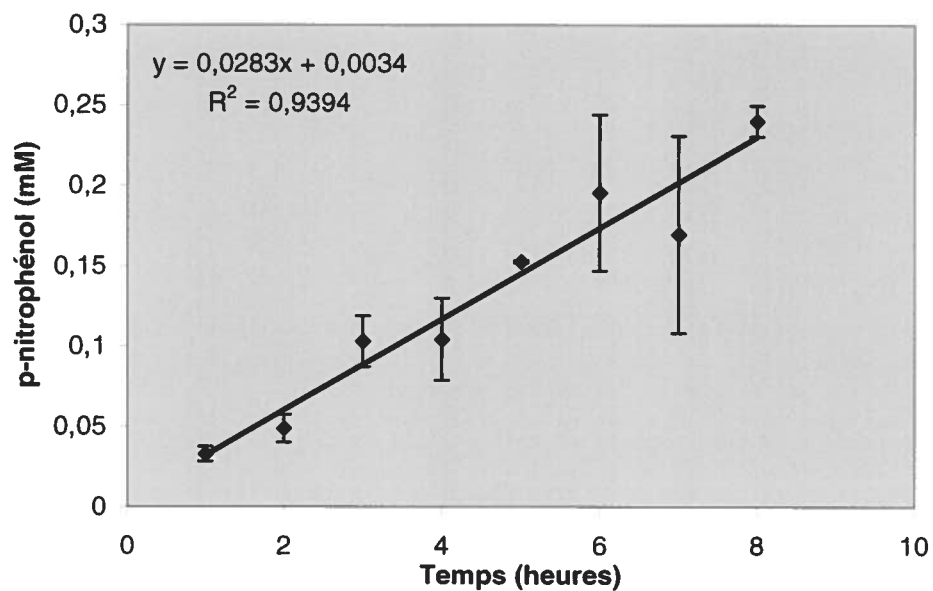


Figure 18. Stabilité de l'activité de β -glucosidase retrouvée dans la fraction cytoplasmique de *G. thermodenitrificans* SB1 incubée à 90°C en présence de substrat. L'activité de la préparation était de 0.32UI/mg de protéines.

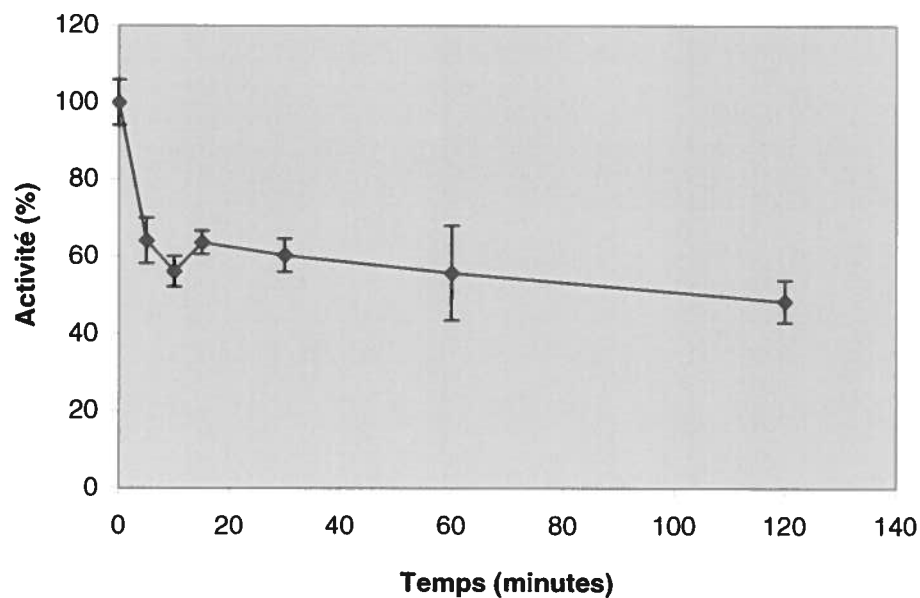


Figure 19. Stabilité de l'activité de β -glucosidase retrouvée dans la fraction cytoplasmique de *G. thermodenitrificans* SB1 incubée à 90°C en absence de substrat. L'activité de la préparation était de 0.32UI/mg de protéines.

3.5.2 Zymogrammes de la β -glucosidase de SB1.

Dans le but d'identifier et d'isoler la β -glucosidase parmi les protéines retrouvées dans la fraction cytoplasmique, des zymogrammes ont été effectués après électrophorèse dans un gradient de pH, ou en condition dénaturante en présence de SDS. L'enzyme présente dans le gel, en clivant le substrat chromogène fourni (MUG ou pNPG), aurait été mise en évidence par l'apparition de fluorescence (avec le MUG comme substrat), ou d'une coloration jaunâtre (avec du pNPG comme substrat) à son emplacement dans le gel après une période d'incubation avec son substrat. Aucune zone de fluorescence n'a été observée sur le gel IEF incubé à 60°C avec une solution de MUG, ni sur le gel de polyacrylamide après électrophorèse en présence de SDS et incubé à 80°C. De même, aucune apparition de coloration jaunâtre n'est apparue sur le gel de polyacrylamide en présence de SDS incubé avec du pNPG à 60°C. Les gels ont été observés aux 15 minutes. Après incubation, durant la nuit, du gel IEF, une coloration subséquente au bleu de Coomassie a révélé que la totalité des protéines avaient diffusées hors du gel. La figure 20c montre cependant que la majorité des protéines sont demeurées dans le gel SDS après le même temps d'incubation. Comme aucune activité n'a été détectée dans les conditions utilisées, il n'a donc pas été possible d'identifier la protéine responsable de l'activité de β -glucosidase de nos préparations, et de déterminer son poids moléculaire et son point isoélectrique.

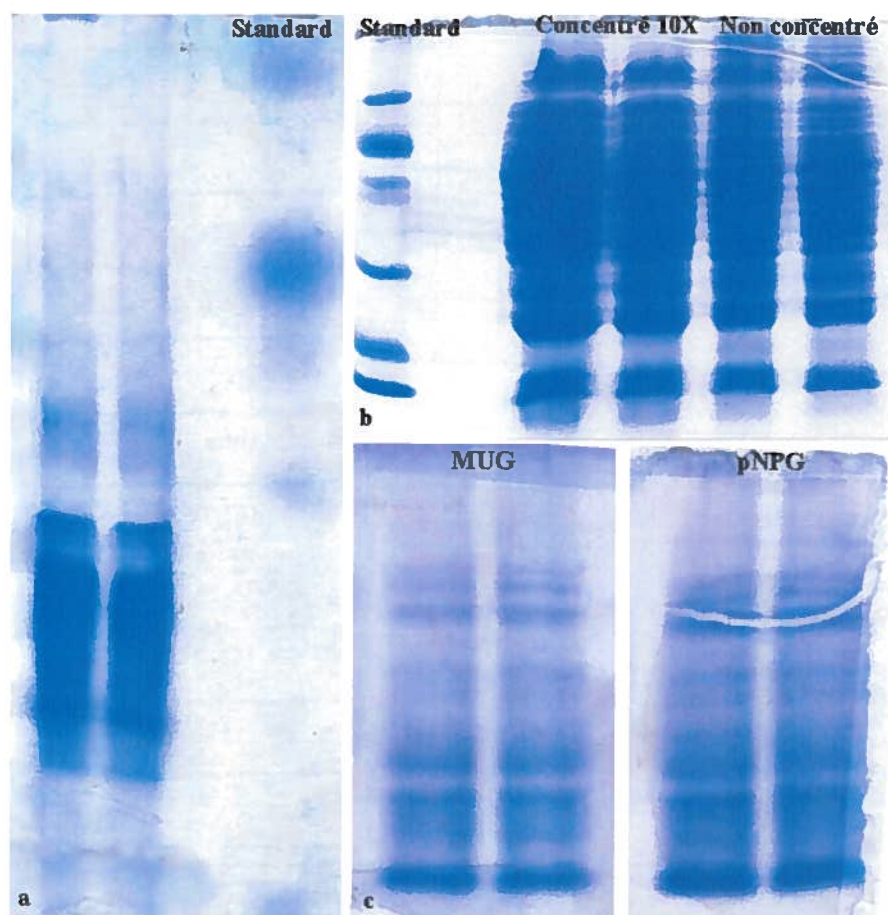


Figure 20. Coloration au bleu de Coomassie des protéines des zymogrammes de la fraction cytoplasmique de SB1. a) Gel IEF, b) gel SDS de la fraction cytoplasmique de SB1, c) gel SDS après incubation overnight (o/n) à 80°C dans une solution de MUG ou de pNPG.

4. Discussion

4.1 Caractérisation de *Bacillus* T3 et 60S1b.

La souche T3 se présente comme un bacille isolé ou en filament, non flagellé, ayant un contenu en G+C de 43.6 mol%, donnant une coloration négative au Gram, mais ayant une paroi de type Gram positive telle que révélée par l'examen de coupes ultramines en microscopie électronique. De plus, T3 ayant un pH optimal de croissance de 8.0-8.5 et une température de croissance supérieure à 60°C, cette dernière entrerait dans la catégorie des bactéries thermophiles alcalitolérantes, selon la définition donnée par Wiegel et Kevbrin (2003). Ces caractéristiques phénotypiques sont apparentées à celles retrouvées dans le genre *Bacillus* qui est, par ailleurs, un genre regroupant une très forte diversité phénotypique et métabolique parmi ses membres.

L'arbre phylogénétique, construit à partir des similarités de séquences du gène codant pour l'ARNr 16S entre les souches T3, 60S1b et d'espèces de chaque genre de la famille des *Bacillaceae*, montre que T3 et 60S1b ne se regroupent avec aucune bactérie des genres représentés. De plus, en comparant la séquence du gène 16S de T3 avec les banques de données de NCBI, cette dernière ne serait qu'à 93% similaire à l'espèce publiée la plus près, c'est-à-dire, *Bacillus thermoamylovorans*. Des séquences de 1430 nucléotides du gène 16S de T3 et 60S1b ont été comparées aux représentants de différents genres bactériens de la famille des *Bacillaceae* (données en appendice 2). Les pourcentages de similarité avec les différents genres se situent entre 87 et 91.5%, ce qui permettrait d'émettre l'hypothèse que T3 serait la représentante d'un nouveau genre bactérien des *Bacillaceae*. Ce genre pourrait inclure le groupe de bactéries non caractérisées, voisin des souches T3 et 60S1b telles qu'observées dans l'arbre phylogénétique. Parmi ces dernières, se trouve pPD14 identifiée d'un compost synthétique thermophile où elle était la bactérie la plus abondante (Dees et Ghiorse, 2003). Ces bactéries représentaient 6% des clones obtenus du réacteur aérobie thermophile traitant le lisier de porc lors de l'étude présentée par Tremblay (2003). Les bactéries T3 et pPD14 auraient un pourcentage de similarité s'élevant à 99%, bien que la séquence complète de pPD14 ne soit pas disponible.

Sur le plan morphologique, la souche T3 est semblable (0.3-0.5 x 3-4µm) en taille à *B. thermoamylovorans* (0.4-0.5 x 3-4 µm), mais est légèrement différente de *G. thermodenitrificans* (0.5-1 x 1.5-2.5 µm) qui est un bacille plus court et plus large. *B. thermoamylovorans* ne produit pas de spore, alors que *G. thermodenitrificans* produit une spore terminale ou subterminale qui ne déforme pas le sporange (Manachini et al, 2000), alors que chez *Ureibacillus terrenus*, les spores sont déformantes tout comme pour la souche T3. En ce qui concerne leurs contenus en G+C, *B. thermoamylovorans* et *U. terrenus* ont une valeur inférieure à T3 (43.6 mol%), avec respectivement 38.8 (Combet-Blanc et al, 1995) et 39.6 mol%, contrairement à *G. thermodenitrificans* qui contient 50.5 mol % (Fortina et al, 2001).

En ce qui concerne les acides gras, on remarque que nos souches possèdent 58.7% de l'ensemble des acides gras sous forme de 16 :0 et 18 :0 pour T3, et 64.0% du total d'acide gras sous forme de 16 :0 et de 14 :0 pour 60S1b. Les deux isolats possèdent tous deux plus de 50% de leur composition en acide gras total sous forme de 16 :0. Parmi d'autres genres de bactéries thermophiles, les *Bacillus* de groupe 5, récemment reclassifiés dans le nouveau genre *Geobacillus*, sont des bactéries possédant en majorité des iso-acides gras de type i15 :0, i16 :0 et i17 :0 (Nazina et al, 2001). Le pourcentage élevé (plus de 50%) en 16 :0 pour les souches étudiées est significativement différent de celui rencontré pour les genres *Thermobacillus* et *Paenibacillus*, avec des pourcentages variant de 8.1-28.0% pour cet acide gras (Touzel et al, 2000). Selon Claus et Berkeley (Mair, 1986), les acides gras iso ou anteiso 12:0 et 17:0 seraient prédominants dans le genre *Bacillus*. Ceci démontre donc une forte différence entre le profil de nos souches et celui de différents représentants de genres de la famille des *Bacillaceae*. En plus de la température d'incubation, le milieu de croissance influe énormément sur la composition des acides gras, il serait important de réévaluer le profil d'acide gras des souches T3 et 60S1b lorsqu'un milieu de culture plus traditionnel aura été mis au point.

Le milieu de culture, tant solide que liquide, qui a permis la meilleure croissance des souches T3 et 60S1b a été un milieu fabriqué à partir de lisier de porc partiellement traité

obtenu en 2003. Ce milieu a été utilisé initialement pour l'isolement des bactéries et, ultérieurement, pour effectuer une caractérisation préliminaire des souches. Ce milieu répandait une très mauvaise odeur et ne pouvait, à cause de sa variabilité et de la difficulté d'obtention (le traitement bio-thermophile auquel le lisier est soumis pouvant être variable selon le lisier de départ, et les différentes conditions retrouvées dans le bio-réacteur), être utilisé de routine ou comme milieu de référence. Les essais effectués dans le but de remplacer le lisier ont donné des résultats très mitigés. Les milieux classiques (BHI, TSA, Bouillon nutritif, gélose Columbia) n'ont pas donné de croissance satisfaisante. Les seuls milieux ayant donné une certaine croissance, bien que limitée, ont été un milieu (BSME) utilisé pour les bactéries du genre *Thermus* qui avait été enrichi avec du peptone 2%, un mélange de vitamines de Wolin ou de NH_4Cl . Les essais effectués en milieu liquide ont aussi montré une croissance très limitée. Les conditions de culture utilisées (agitation, rapport volume de milieu/volume du flask) ne sont pas en cause, puisqu'une croissance donnant une D.O. de 2.0 avait été obtenue antérieurement dans le laboratoire, à maintes reprises, avec les souches T3 et 60S1b, à partir d'un milieu composé de lisier partiellement traité (lot 2003), en utilisant les mêmes conditions.

Claus et Berkeley (Mair, 1986) dans leur revue sur le genre *Bacillus*, avaient noté que certaines espèces avaient des besoins très particuliers. Ainsi *Bacillus fastidiosus* nécessitait la présence d'allantoin ou d'acide urique pour leur croissance, alors que *Bacillus pasteurii* avait besoin de NH_4Cl . L'ajout de NH_4Cl au milieu de croissance de la souche T3 stimulait sa croissance, en comparaison au milieu contenant uniquement du protéose peptone no3. L'ajout de NH_4Cl au milieu BSME, additionné du mélange vitaminique de Wolin, ne produisait aucun effet positif supplémentaire. Toutefois, les essais en milieu liquide ont montré que les milieux contenant du NH_4Cl n'étaient peu ou pas efficace à soutenir leur croissance. Cependant, il a été noté qu'une augmentation de la croissance se produisait lorsque la quantité de NH_4Cl ajoutée était plus élevée. Étant donné que la volatilisation de l'azote ammoniacal augmente avec le pH et la température, il est possible qu'une certaine quantité ait été perdue lors de l'incubation.

Selon Sürücü (1999), la croissance des bactéries thermophiles nécessiterait la présence de quelques vitamines et acides aminés supplémentaires par rapport aux besoins nutritifs des bactéries mésophiles. Le besoin en vitamines et en acides aminés varierait selon la température de croissance des bactéries thermophiles. La méthionine étant l'acide aminé ayant été démontré comme étant essentiel pour la croissance des bactéries lors de cette étude, son ajout, dans les milieux liquides expérimentés, a permis une certaine croissance de la souche 60S1b qui s'est toutefois très rapidement arrêtée. De plus, la forte concentration de protéose peptone utilisée dans les différents milieux de culture expérimentés aurait dû suffire comme source d'acides aminés, si ces derniers étaient l'élément manquant nécessaire à la croissance des souches. De plus, le fer, le magnésium et le calcium seraient également des nutriments essentiels aux bactéries thermophiles (Sürücü, 1999). Toutefois, chacun de ces éléments étaient présents dans le milieu BSME. Pour tous les essais de croissance en milieu liquide, on observe que la croissance plafonne très rapidement. Il semble donc évident qu'un élément essentiel à la croissance de T3 et 60S1b n'était pas présent, ou l'était en faible quantité dans les milieux utilisés.

Comme les premiers lots de lisier partiellement traité (lot 2003) permettaient une bonne croissance des souches, il semble donc que ce milieu contiendrait des éléments nécessaires à leur croissance. Ces derniers seraient résistants aux conditions utilisés lors de la stérilisation du lisier par autoclavage. Malheureusement, comme le lisier prélevé en 2005 n'a pas pu soutenir la croissance de la souche T3, nous n'avons pas pu rechercher ces composés dans ce lisier. Bien que non caractérisé, le lot 2005 semblait différent des lots antérieurs par son apparence (odeurs, couleur...). Afin de compléter cette étude, il serait intéressant de réévaluer la capacité d'autres lots de lisier à faire croître les souches. Advenant une bonne croissance des souches, des extractions à différents pH de la fraction organique du lisier pourraient être effectuées afin d'évaluer la capacité de ces dernières, ainsi que des fractions inorganiques à promouvoir la croissance de T3 et 60S1b. Une caractérisation plus poussée de(s) fraction(s) active(s) nous permettrait peut-être d'identifier un (des) élément(s) essentiel(s) à leur croissance.

4.2 Évaluation du potentiel enzymatique de la banque de bactéries thermophiles.

Les essais effectués avec les galeries API-zym ont permis de mettre en évidence plusieurs activités enzymatiques pour toutes les souches testées. Les résultats obtenus sont fonction des conditions utilisées lors des essais : milieu de croissance, état physiologique des bactéries, pH et température d'incubation des galeries. Pour les souches de *Bacillus* sp, comme le milieu de culture utilisé pour produire la biomasse nécessaire pour l'utilisation des galeries n'était pas idéal, il est possible que d'autres activités enzymatiques soient détectées en utilisant un milieu plus propice à leur croissance lorsque celui-ci sera connu.

Comme les bactéries évaluées sont toutes thermophiles, les galeries ont été incubées à des températures de 60°C. Des conditions thermophiles (70°C) ont déjà été utilisées avec succès, notamment pour la recherche de nouvelles activités enzymatiques des bactéries du genre *Thermus* (Berger et al, 1995). Pour une espèce donnée, on observe une certaine similitude entre les souches testées, quoique des différences pour certaines enzymes ont aussi été observées. Ces différences témoignent qu'il y a une bonne diversité entre les souches isolées. Toutes les souches de *Bacillus thermocloacae* ont montré une activité maximale de α -glucosidase, alors que deux souches seulement ont montré une activité de β -galactosidase. À notre connaissance, aucune étude n'a été effectuée sur le potentiel enzymatique de *B. thermocloacae* depuis la publication officielle de l'espèce en 1989 (Demharter et Hensel, 1989). Parmi les souches testées, signalons que *G. thermodenitrificans* Sb-1, qui a été isolée au cours de ce travail après enrichissement en présence de son de blé, montre plusieurs activités enzymatiques très intéressantes. Entre autre, des activités maximales de phosphatases acide et alcaline et naphtol-ASD-BI-phosphohydrolase sont observées, pouvant laisser croire qu'elle pourrait aussi sécréter une activité phytase. D'importantes activités de α -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase et α -mannosidase ont aussi été détectées; trois enzymes de *G. thermodenitrificans* ont déjà été caractérisées plus en profondeur, une α -glucosidase, une α -amylase (Ezeji et al, 2005) et une endo-arabinase ont été produites et isolées. L'endo-arabinase de *G. thermodenitrificans* possède une activité maximale à des températures se rapprochant de 70°C, et une demie vie de 4h à 75°C (Takao et al, 2002). *G. thermodenitrificans* semble donc être une bonne source d'enzymes thermoactives et

thermostables digne d'être étudiée plus en profondeur. *Geobacillus toebii* Sb2 a également montré un grand nombre d'activités enzymatiques maximales sur les galeries Api-Zym, démontrant par le fait même un fort potentiel enzymatique. Aucune étude n'a été effectuée sur la capacité de cette espèce à produire des enzymes d'intérêt depuis son isolement (Sung et al, 2002).

Comme mentionné dans la revue bibliographique, plusieurs avantages sont reliés à l'utilisation d'enzymes thermophiles dans différents procédés industriels. En premier lieu, à des températures élevées, les risques de contamination par des bactéries pathogènes sont grandement diminués. Ensuite, d'autres facteurs comme une viscosité réduite des fluides, un taux de transfert de masse et de chaleur amélioré, et une meilleure dissolution des substrats sont également appréciables (Bruins et al, 2001). En particulier, une dissolution améliorée des substrats peut être utile dans les réactions d'hydrolyse inverse dans l'eau. La β -glucosidase est une enzyme fréquemment utilisée pour sa capacité d'hydrolyse inverse qui permet la création d'aryl-glucosides. L'utilisation des enzymes thermophiles est encore plus ou moins répandue, mais tout laisse indiquer une très forte augmentation dans ce secteur de l'industrie dans les années à venir (Bruins et al, 2000). Plusieurs classes de protéines incluses dans la galerie Api-Zym sont considérées comme ayant un fort potentiel industriel, telles les estérases, les lipases, les glucosidases et les protéases (Dermijiran et al, 2001).

4.2.1 Caractérisation de l'activité β -glucosidasique de *Geobacillus thermodenitrificans* SB1.

L'activité de type β -glucosidase étudiée au cours de ce projet peut être classifiée dans la catégorie des enzymes hyperthermophiles, de par sa température optimale d'activité qui se situe à 90°C, selon la définition fournie par Bruins, Janssen et Boom (2001). La température optimale d'activité de l'enzyme se compare à celles obtenues de β -glucosidases isolées de microorganismes hyperthermophiles, tels *Thermotoga* et *Pyrococcus* à des températures avoisinant les 90-95°C et 100-105°C respectivement. La stabilité de ces enzymes varie de 6 à 18 h de temps de demi-vie pour les β -glucosidases de *Thermotoga*, et de 15 à 85h pour *Pyrococcus*. Par mutagenèse dirigée, Gonzalez-

Blasco et al. (2000) sont parvenus à modifier une β -glucosidase possédant un temps de demi-vie de 15 minutes à 35°C, et ne possédant aucune activité à 55°C, afin que cette dernière possède un temps de demi-vie de 12 minutes à 65°C. Ceci démontre l'avantage de travailler avec une enzyme possédant déjà une thermostabilité et un optimum de température élevé. Il serait intéressant d'étudier sur une période plus longue, et à des températures plus élevées, la stabilité de la β -glucosidase de *G. thermodenitrificans*. La présence du substrat de l'enzyme a su protéger l'activité de cette dernière dans les conditions de températures utilisées. Même en absence de son substrat, la β -glucosidase a conservé une activité après une perte importante d'activité dans les premières minutes d'incubation. Des études de certains paramètres cinétiques de l'enzyme purifiée, lorsqu'incubée à des températures extrêmes, pourraient permettre de comprendre les changements apportés sur l'affinité de l'enzyme pour le substrat, et la vitesse de la réaction.

La grande stabilité de l'activité de β -glucosidase isolée nous laissait espérer qu'elle aurait pu résister aux conditions dénaturantes rencontrées lors d'une électrophorèse en conditions dénaturantes et donner une réponse positive au zymogramme. Une réponse positive nous aurait permis d'identifier une bande, et d'obtenir des séquences peptidiques après analyse en spectrométrie de masse, et, d'isoler, cloner et séquencer le gène responsable. Plusieurs des β -glucosidases hyperthermophiles connues sont composées, soit de monomères, de dimères ou de tétramères (Bhatia et al, 2002). Comme aucune activité n'a été détectée lors des expériences de zymogramme, on peut émettre l'hypothèse que l'enzyme native serait constituée de plusieurs sous-unités qui auraient été séparées lors des électrophorèses en conditions dénaturantes. Pour poursuivre l'étude de cette enzyme, il serait à considérer d'optimiser, dans un premier temps, les conditions de production par la bactérie pour éventuellement la purifier selon les méthodes biochimiques traditionnelles. Il serait également possible d'isoler le gène codant pour l'enzyme, et de l'insérer dans un hôte mésophile capable de produire l'enzyme en grande quantité pour faciliter sa production et son isolement. Il est intéressant de remarquer l'écart de 30°C entre la température optimale de croissance du microorganisme, et la température optimale d'activité de sa β -glucosidase. Le pH optimal de l'enzyme isolée se

situe dans l'échelle normale des pH observés pour l'ensemble des β -glucosidases (Bhatia et al, 2002).

Plusieurs applications industrielles peuvent être envisagées pour la β -glucosidase de *G. thermodenitrificans* en considérant ses caractéristiques mises à jour au cours de ce projet. L'activité transglucosidasique et d'hydrolyse inverse de la β -glucosidase nécessitent souvent une température de réaction élevée, étant donné la faible solubilité de l'accepteur ou donneur glucoside, tel que mentionné plus haut (Nagatomo et al, 2005). La synthèse enzymatique de glycosides est une avenue intéressante, du point de vue industriel de par la pureté des composés obtenus. Fisher et al. (1996) ont démontré une forte activité de transglucosylation à partir d'alcools organiques primaires et tertiaires, ainsi que des alcools organosilicones primaires et tertiaires comme aglycones, et de cellobiose comme donneur de glucose. Les organosilicones possèdent un potentiel d'applications au niveau des composés agrochimiques et de production de drogues (Fischer et al, 1996). De plus, l'action hydrolytique de la β -glucosidase sur des glucosides phénoliques ou sur des glucosides phytoestrogènes libère la partie aglycone du glucoside, qui peut être utilisée dans les domaines médicaux, en recherche biomédicale et alimentaire (Bathia et al, 2002). On note également un besoin en β -glucosidases thermostables et résistantes à l'inhibition par le glucose pour les procédés de saccharification. Lors d'essais futurs, il serait intéressant de tester la capacité de transglucosylation ou d'hydrolyse inverse de l'activité de β -glucosidase de *G. thermodenitrificans* SB1, ainsi que de tester la diversité de substrats acceptés par l'enzyme dans ses différentes activités.

4.2.2 Caractérisation de l'activité de xylanase de *Geobacillus thermodenitrificans* SB1.

L'activité xylanasique étudiée chez *G. thermodenitrificans* SB1 entre elle, aussi, dans la catégorie des thermozymes. Il existe une très grande diversité de xylanases produites par un grand nombre de microorganismes thermophiles, psychrophiles, alcaliphiles et acidophiles. Ayant une bonne thermostabilité, l'activité de xylanase étudiée au cours de ce projet pourrait avoir un potentiel intéressant pour certaines applications commerciales, dont le blanchiment de la pâte de papier, la production de glycosides et

d'oligosaccharides, et la bioconversion de différentes substances en présence de différents traitements de chaleur et de pH (Collins et al, 2005). En effet, étant toujours active à plus de 75% de son activité maximale à pH 8, l'activité de xylanase isolée au cours de ce projet semble bien résister aux conditions alcalines, tout en étant plus active à pH 6.5. Conservant 100% de son activité initiale après 12h d'incubation à 70°C, l'enzyme peut être considérée pour des applications impliquant un long temps de réaction. D'autres tests devront être effectués pour connaître vraiment son efficacité dans différentes conditions. La xylanase isolée de *Thermomonospora fusca* s'est établie comme l'une des xylanases les plus stables, puisqu'elle maintient 96% de son activité maximale après 18h d'incubation à 75°C (Shibuya et al, 2000). En comparaison, les xylanases de *Streptomyces lividans* sont très peu stables au-delà de 37°C. Dans le procédé de blanchiment enzymatique de pâte de papier, la xylanase n'a pas besoin d'être purifiée, mais doit être exempte de cellulase, et active et stable à hautes températures et à pH alcalin (Collins et al, 2005). Aucune activité cellulasique n'a pu être détectée dans le surnageant de culture de *G. thermodenitrificans* SB1. Il est également possible qu'il y ait plus d'une xylanase dans le surnageant de culture testé, étant donné que la multiplicité de xylanases produites par un même microorganisme n'est pas chose rare (Black et al, 1997; Biely et al, 1993). Un nombre élevé d'enzymes ont auparavant été testées pour leur efficacité dans le blanchiment de la pâte de cellulose. Les xylanases peuvent également être employées, comme les β -glucosidases, pour leur activité de glucosynthases (Shallom et Shoham, 2003). Il faudrait alors tester la diversité de substrats acceptés par l'enzyme pour remplacer le nucléophile de la réaction.

4.2.3 Recherche de l'activité phytasique.

Parmi les 3 classes de phytases connues (histidine acides, pourpres acides et β -propeller), ce sont les phytases de type β -propeller produites par différentes espèces de *Bacillus* qui ressortent comme étant les plus intéressantes pour les applications d'alimentation animale. En effet, ces dernières possèdent une bonne spécificité de substrat, étant plus spécifiques que les phosphatases en général. Elles possèdent également une forte thermostabilité et un pH neutre d'activité (Tye et al, 2002). Le calcium serait indispensable pour le repliement de la protéine ainsi que pour sa thermostabilité (Kerovuo

et al, 2000a). Les phytases produites par des bactéries du genre *Bacillus* ont été désignées comme idéales pour des applications en alimentation animale (Tye et al, 2002). En effet, leur thermostabilité leur permettrait de résister à la dénaturation causée par les hautes températures utilisées lors de la granulation de la nourriture. Avec leur spécificité étroite quant aux substrats qu'elles peuvent cliver, les phytases β -propeller ne causeraient aucune interférence dans le métabolisme des animaux. Quant au pH retrouvé dans l'intestin des animaux mono-gastriques, il se rapproche de la neutralité, et serait ainsi adapté à l'optimum d'activité des phytases de ce type. Les phytases β -propeller font également montre d'une forte résistance aux protéases, ce qui pourrait les aider à résister aux conditions retrouvées dans le système digestif (Kerovuo et al, 2000). C'est dans le but d'identifier une phytase de type β -propeller que la banque de bactéries thermophiles a été étudiée. Étant majoritairement composée de microorganismes de la famille des *Bacillaceae*, la banque de bactéries et le bioréacteur traitant le lisier de porc auraient pu être une bonne source de bactéries produisant ce type d'enzyme. De plus, la température optimale de croissance de ces bactéries étant élevée, il y avait possibilité d'identifier une phytase possédant une thermostabilité plus élevée que celle des enzymes déjà décrites dans la littérature.

Plusieurs auteurs ont procédé à une sélection de souches bactériennes à grande échelle en utilisant des milieux révélateurs. Ceux-ci, composés de phytate insoluble, permettent d'identifier leur activité phytasique par l'apparition d'une zone claire autour de la zone de croissance de la bactérie. Selon Kerovuo et al. (2000b), l'ajout de calcium divalent est essentiel à l'activité des phytases de type *Bacillus*, mais le phytate de calcium serait un substrat peu utilisé par l'enzyme de *Bacillus subtilis* de par son insolubilité. Ainsi pour la PhyC de *Bacillus subtilis*, très peu d'activité a été détectée en utilisant du phytate de calcium comme substrat. Il est donc possible que, lors de la recherche de la phytase sur milieu solide, l'activité de cette dernière aurait été influencée par la présence de fortes concentrations de phytate de calcium. Cependant, d'autres auteurs ont utilisé le phytate de calcium comme phytate insoluble pour les milieux de sélection en obtenant des résultats positifs (Kim et al, 1998). La souche Sb1 ayant produit une légère zone de décoloration sur le milieu contenant le phytate de calcium, des essais enzymatiques ont été effectués,

sans aucune activité détectable. Ceci démontre que la zone obtenue était probablement due à une production d'acidité par la souche, ce qui aurait solubilisé le phytate de calcium. De plus, la quantité de matière organique résiduelle retrouvée dans le lisier partiellement traité est trop élevée pour tenter d'effectuer un dosage du phytate. Ceci nous aurait permis d'évaluer la présence d'une activité phytasique dans le lisier.

Plusieurs phytases du type recherché ont déjà été identifiées et clonées à partir de bactéries provenant d'espèces de *Bacillus*. En analysant les séquences d'ADN de chacune des phytases retrouvées dans les banques de données, il a été possible de créer une paire d'amorces dégénérées permettant d'amplifier les phytases β -propeller. Tye et al. (2002) ont pu détecter une phytase chez *Bacillus licheniformis* par cette méthode. Aucune bande correspondant à la présence de phytase n'a pu être observée après la réaction d'amplification par PCR des échantillons et souches testées dans le cadre de ce projet. On ne peut éliminer la possibilité que d'autres phytases, non reconnues par nos sondes, soient produites par les microorganismes de la banque de bactéries et du réacteur. Il est également possible qu'un gène codant, pour une phytase de type *Bacillus*, n'ait pas été détecté par PCR, de par la faible quantité du microorganisme producteur présente dans les échantillons de lisier brut, traité et de l'enrichissement au son de blé. Plusieurs substrats différents auraient pu être utilisés pour les essais enzymatiques. Cependant, selon Kim et al. (1998), le son de blé serait un bon inducteur pour la production de phytases par les bactéries du genre *Bacillus*. Aucune activité n'a pu être détectée dans le surnageant des enrichissements au son de blé, ni aucun amplicon, lors du PCR dégénéré visant les gènes de phytase de type β -propeller. Ceci tend à soutenir l'hypothèse que les microorganismes présents dans le bioréacteur thermophile aérobie traitant le lisier de porc ne produisent pas de phytase.

Conclusion

Lors de ce projet, nous avons déterminé de nouvelles caractéristiques des souches T3 et 60S1b représentantes d'une nouvelle souche bactérienne isolée du bioréacteur aérobique thermophile traitant le lisier de porc. Cette dernière se présente sous forme de bacille Gram positif de 3-4µm de longueur, par 0.3-0.5 µm de largeur. La bactérie peut produire des spores terminales déformantes lorsque le milieu de culture devient insuffisant pour assurer sa survie. De par l'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, et en comparaison avec les autres genres de la famille des *Bacillaceae*, il a été suggéré que les souches T3 et 60S1b seraient les représentantes d'un nouveau genre bactérien parmi cette famille. L'analyse de la composition du profil en acides gras des deux souches, avec une composition majeure en acide stéarique qui est non observée chez les bactéries apparentées, semble soutenir cette hypothèse. Toutefois, afin de confirmer ce résultat, de nouvelles analyses devront être effectuées à partir de cultures bactériennes provenant de milieux plus standards, lorsque ceux-ci seront connus.

Aucun milieu de substitution au milieu lisier partiellement traité utilisé lors de son isolement n'a pu assurer une bonne croissance des souches T3 et 60S1b. Plusieurs sources de carbones, de vitamines et d'acides aminés ont été testées. De plus, des résultats très différents ont été observés selon les lots de lisier utilisés, certains très favorables et d'autres peu favorables à leurs croissances. Les derniers lots de lisier étant peu efficaces, il ne nous a pas été possible d'y rechercher les substances nécessaires à leurs croissances. Afin d'identifier ces nutriments, il est proposé de rechercher un lot de lisier permettant d'obtenir une bonne croissance et d'y effectuer des extractions et des essais de croissance à partir des phases organiques et inorganiques. L'ajout de ces extraits et de certaines de leurs composantes au milieu BSME pourrait aider à identifier la catégorie de nutriment manquant à ce milieu.

Une étude des souches de notre collection de bactéries aérobies thermophiles avec des galeries API-Zym nous a permis d'identifier plusieurs activités enzymatiques

intéressantes. Plusieurs souches produisaient, lorsqu'incubées à 60°C, de bonnes activités d'estérases, d'estérases-lipases, de protéases, de phosphatases et de glucosidases à 60°C. Ces classes d'enzymes ont fréquemment été mentionnées dans la littérature dans plusieurs applications commerciales intéressantes. Nos travaux ne nous ont malheureusement pas permis de détecter une souche pouvant produire une activité phytase. Une approche moléculaire n'a pas non plus permis de détecter un gène codant pour une phytase dans les souches de notre collection, ni dans des enrichissements en présence de son de blé à partir de la flore bactérienne du bioréacteur thermophile. Ces enrichissements nous ont toutefois permis d'isoler des bactéries telles *Geobacillus thermodenitrificans* SB1 et *Geobacillus toebii* SB2 qui ont montré de nombreuses activités enzymatiques très intéressantes.

D'autres activités enzymatiques, tels l'activité xylanase et β -glucosidase, isolées de *Geobacillus thermodenitrificans* SB1, ont été caractérisées sommairement. Ces dernières ont montré des températures optimales d'activité thermophiles, soit 70°C et 90°C, respectivement et sont demeurées très stables sur de longues périodes de temps à ces températures, lorsqu'incubées en présence de leur substrat respectif.

Les résultats obtenus démontrent tout le potentiel de la microflore présente dans le bioréacteur aérobique thermophile traitant le lisier de porc comme source de bactéries productrices d'enzymes thermostables, aux applications potentiellement intéressantes. Un projet utilisant une approche métagénomique utilisant cette flore thermophile après différentes conditions d'enrichissement est en cours à l'INRS-Institut Armand-Frappier, et devrait permettre éventuellement l'isolement de nouvelles enzymes ayant des applications industrielles.

Appendice A

Séquence ADN du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S de *Bacillus sp.* T3 et 60S1b.

T3

3'AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCGAAAG
GAGAGCTCGCTCTCCTTTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACCGGG
ATAACTCGCGGAAACGCGAGCTAATACCGGATAGGTCCCCTGGCCGCATGGCGACGGGAGGAAAGATGGCGC
GAGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTC
GTAAAGCTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAACGTCCCGGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAA
GCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATCATTTGGGCGT
AAAGCGCGCGCAGGCGGTCCCTTAAGTCTGATGTGAAATCTTGCGGCTCAACCGCAAGGGGTCAATTGGAAAC
TGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGGGAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGA
ACACCAGTGGCGATGGAGGGGTTTACCCTTCAGTGCTGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCATCCCGACCGCTGAGAGATCAGGCCCTTCCCTTCGGGG
ACGGGATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCCTGTCTTAGTTGCCAGCATTCGGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTTAAAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAGC
GGGTTGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCTAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGC
CTGCATGAAGCCGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTTGTACA
CACCGCCCGTCACACCAGAGAGCTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCCCTTAAAGGGAGCCAGCCGC
CGAAGGTGGGGCAAGTGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCT
CCTT 5'

60S1b

3'TGAGTAAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACCGGGATAACTCGCGGAAACGCGAGCTAATACCGGATA
GGTCCCGTGGCCGCATGGCGACGGGAGGAAAGATGGCGCGAGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGCGCAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAT
TGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTGCTAAAGCTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTACC
GGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATCATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCCTTAAGTCTGATG
TGAAATCTTGCGGCTCAACCGCAAGGGGTCAATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGGGAAGCGGAA
TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTCCTGGCCTGTA
ACTGACGCTCAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAGGTGTTGGAGGGGTTTACCCTTCAGTGCTGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTAC
GGCCGCAAGGTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCG
GACCGAAAGGAGAGCTCGCTCTCCTTTTCGGTCAGCGGCGGACGGG 5'

Appendice B

Matrice de similarité entre les espèces utilisées pour la fabrication de l'arbre phylogénétique de *Bacillus sp.* T3 et 60S1b.

Espèce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>A. contaminans</i>	ID										
<i>B. oleronius</i>	91,2% ID										
<i>B. flavothermus</i>	97,1% 90,8% ID										
<i>B. smithi</i>	92,9% 93,8% 92,7% ID										
<i>B. bataviensis</i>	92,2% 94,5% 91,5% 93,7% ID										
<i>B. clausii</i>	90,2% 93,1% 89,8% 92,0% 91,7% ID										
<i>B. gelatini</i>	90,5% 90,2% 90,0% 91,2% 91,4% 90,2% ID										
<i>B. circulans</i>	90,7% 92,9% 90,6% 91,4% 91,8% 90,4% 89,3% ID										
<i>B. niacini</i>	92,4% 94,1% 91,7% 94,2% 98,5% 91,6% 91,4% 91,6% ID										
<i>U. thermosphaericus</i>	91,3% 91,4% 90,3% 91,0% 92,6% 89,8% 91,4% 90,3% 91,9% ID										
<i>B. subtilis</i>	90,8% 94,8% 90,1% 92,8% 93,2% 92,0% 89,9% 90,9% 93,0% 90,6% ID										
<i>B. sporothermodurans</i>	91,9% 98,2% 91,5% 94,7% 95,0% 92,5% 91,2% 92,2% 94,5% 91,9% 94,8%										
<i>G. thermocloacae</i>	88,6% 89,1% 87,9% 89,5% 89,6% 87,1% 88,5% 89,2% 89,7% 88,9% 88,8%										
<i>E. oxidotolerans</i>	87,7% 88,2% 86,7% 88,0% 88,5% 87,5% 89,6% 88,2% 88,7% 88,7% 88,5%										
<i>C. rupii</i>	96,2% 92,2% 95,6% 93,2% 92,4% 90,5% 90,1% 91,4% 92,7% 91,1% 92,0%										
<i>C. quisquiliarum</i>	89,0% 92,1% 88,3% 90,9% 91,2% 89,6% 88,3% 89,2% 90,9% 88,7% 91,1%										
<i>F. milosensis</i>	88,3% 92,0% 88,4% 90,5% 90,2% 90,7% 88,7% 90,3% 90,2% 87,9% 90,3%										
<i>G. lituanicus</i>	92,8% 89,3% 92,9% 91,0% 89,5% 89,2% 87,9% 89,6% 89,8% 88,2% 89,0%										
<i>G. thermodenitrificans</i>	93,6% 89,8% 93,9% 91,6% 90,0% 89,6% 88,5% 90,3% 90,6% 88,8% 89,5%										
<i>G. thermoleovorans</i>	92,9% 89,5% 93,1% 91,1% 89,6% 89,2% 87,9% 89,7% 89,9% 88,4% 89,1%										
<i>G. disposauri</i>	88,9% 92,6% 88,6% 91,6% 90,7% 90,1% 87,9% 90,1% 90,9% 87,7% 91,1%										
<i>G. halotolerans</i>	89,0% 92,6% 88,8% 91,9% 91,0% 90,5% 88,3% 90,6% 91,0% 88,8% 91,4%										
<i>H. halotolerans</i>	89,5% 91,1% 89,1% 91,4% 90,9% 90,1% 88,1% 89,3% 91,3% 88,5% 90,6%										
<i>J. alimentarius</i>	91,2% 91,9% 91,0% 90,9% 92,2% 89,9% 92,6% 90,4% 92,2% 93,5% 91,7%										
<i>L. salicampi</i>	88,6% 91,1% 87,8% 90,8% 89,7% 89,3% 88,3% 88,8% 90,0% 88,3% 90,2%										
<i>M. marinus</i>	90,7% 92,4% 90,2% 90,9% 92,9% 90,6% 91,7% 90,7% 93,1% 93,0% 91,6%										
<i>O. oncorhynchi</i>	89,6% 92,4% 89,4% 91,1% 92,0% 90,6% 90,2% 90,5% 92,0% 90,0% 90,9%										
<i>P. ryukyensis</i>	90,0% 93,1% 89,5% 91,9% 91,8% 91,5% 89,0% 91,3% 91,7% 89,6% 91,9%										
<i>S. thermophilus</i>	94,2% 91,9% 93,6% 92,9% 91,7% 90,5% 90,0% 90,7% 92,1% 90,2% 91,4%										
<i>S. kushneri</i>	90,1% 91,6% 89,4% 92,8% 91,5% 90,4% 90,7% 90,5% 91,9% 90,3% 91,3%										
<i>T. multivorans</i>	88,8% 91,0% 88,5% 91,2% 90,3% 90,2% 88,9% 89,3% 90,7% 88,1% 91,3%										
<i>U. terrenus</i>	91,2% 89,1% 91,0% 90,3% 89,0% 88,0% 90,0% 89,9% 89,1% 91,9% 89,2%										
<i>V. halodenitrificans</i>	90,3% 92,7% 89,8% 92,2% 92,1% 91,1% 89,4% 90,6% 92,5% 90,2% 91,9%										
<i>B. sp. PD14</i>	90,0% 90,0% 90,1% 90,0% 89,5% 88,3% 88,5% 91,3% 89,7% 88,1% 88,3%										
<i>B. sp. PD12</i>	90,0% 89,9% 90,1% 90,0% 89,5% 88,4% 88,5% 91,2% 89,7% 88,1% 88,3%										
<i>B. sp. PD4</i>	90,0% 90,0% 90,1% 90,0% 89,5% 88,4% 88,5% 91,3% 89,7% 88,1% 88,3%										
<i>B. sp. PD13</i>	90,1% 90,2% 89,9% 89,7% 89,4% 88,2% 88,4% 91,3% 89,6% 88,0% 88,5%										
<i>B. sp. PD7</i>	91,6% 92,1% 91,3% 91,6% 91,3% 90,1% 90,2% 92,1% 91,6% 89,8% 90,6%										
<i>B. bacterium NS1-3</i>	90,3% 91,2% 90,1% 91,4% 90,0% 89,8% 88,7% 92,9% 90,4% 89,0% 89,5%										
<i>B. TAT105</i>	91,1% 92,2% 91,2% 91,4% 92,1% 90,0% 90,0% 94,3% 92,2% 90,2% 90,1%										
<i>T. multivorans</i>	88,8% 91,0% 88,5% 91,2% 90,3% 90,2% 88,9% 89,3% 90,7% 88,1% 91,3%										
<i>B. fumaliori</i>	92,4% 93,7% 92,0% 94,6% 97,4% 91,6% 90,9% 92,2% 97,7% 91,9% 93,0%										
<i>B. sp. T3</i>	90,2% 90,2% 90,3% 90,2% 89,7% 88,5% 88,7% 91,5% 89,9% 88,3% 88,5%										
<i>B. sp. 60S1b</i>	90,2% 90,2% 90,3% 90,2% 89,7% 88,5% 88,7% 91,5% 89,9% 88,3% 88,5%										
<i>S. thermophilus</i>	84,9% 86,2% 85,0% 85,0% 85,4% 84,0% 85,1% 85,4% 85,4% 84,5% 84,1%										

	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<i>B.sporothermodurans</i>	ID										
<i>G. thermocloacae</i>	89,9%	ID									
<i>E. oxidotolerans</i>	88,9%	88,3%	ID								
<i>C. rupii</i>	92,8%	88,8%	87,9%	ID							
<i>C. quisquiliarum</i>	92,3%	90,1%	87,9%	89,7%	ID						
<i>F. milosensis</i>	91,4%	88,8%	87,1%	89,5%	91,4%	ID					
<i>G. lituanicus</i>	89,8%	87,7%	85,6%	93,6%	87,5%	88,1%	ID				
<i>G.thermodenitrificans</i>	90,2%	87,9%	86,2%	94,4%	87,9%	88,4%	97,9%	ID			
<i>G.thermoleovorans</i>	89,9%	87,7%	85,5%	93,9%	87,6%	88,3%	99,4%	98,1%	ID		
<i>G disposauri</i>	92,0%	89,2%	87,4%	90,0%	92,0%	92,9%	87,7%	87,9%	87,8%	ID	
<i>G. halotolerans</i>	91,7%	89,0%	88,0%	90,1%	93,6%	92,7%	87,9%	88,4%	88,1%	95,3%	ID
<i>H halotolerans</i>	91,4%	88,8%	87,3%	89,7%	91,3%	91,2%	88,1%	88,6%	88,2%	91,6%	92,5%
<i>J. alimentarius</i>	92,1%	89,3%	88,5%	91,0%	88,8%	88,7%	88,8%	89,3%	88,9%	88,9%	89,3%
<i>L. salicampi</i>	90,7%	89,8%	88,3%	89,4%	91,7%	91,4%	87,2%	88,0%	87,3%	91,9%	92,4%
<i>M. campisalis</i>	92,6%	89,3%	88,9%	91,8%	90,0%	88,9%	88,5%	89,0%	88,7%	89,2%	90,0%
<i>O. oncorhynchi</i>	91,9%	89,5%	88,7%	90,2%	91,8%	91,2%	87,9%	88,1%	87,7%	91,5%	92,2%
<i>P. ryukyuensis</i>	92,1%	89,7%	88,7%	90,9%	92,8%	93,3%	88,9%	89,1%	89,0%	95,0%	95,2%
<i>S. thermophilus</i>	92,3%	89,1%	87,3%	95,4%	89,5%	89,6%	94,9%	95,4%	95,1%	90,0%	90,1%
<i>S. kushneri</i>	92,0%	90,5%	90,0%	91,1%	91,9%	91,5%	89,0%	89,4%	89,2%	91,4%	92,7%
<i>T. multivorans</i>	91,6%	89,6%	87,6%	90,1%	93,1%	95,2%	87,9%	88,2%	88,1%	92,8%	92,6%
<i>U terrenus</i>	89,5%	90,0%	88,1%	91,2%	87,2%	87,5%	89,6%	90,3%	89,8%	86,6%	86,7%
<i>V.halodenitrificans</i>	92,9%	90,1%	89,2%	90,8%	93,1%	92,3%	88,8%	89,5%	88,9%	92,8%	93,3%
<i>B. sp. PD14</i>	89,5%	90,7%	87,0%	90,1%	87,9%	88,5%	89,8%	90,4%	89,8%	88,2%	88,6%
<i>B. sp. PD12</i>	89,6%	90,8%	87,0%	90,0%	88,0%	88,5%	89,8%	90,5%	89,9%	88,3%	88,7%
<i>B. sp. PD4</i>	89,6%	90,7%	86,9%	90,0%	88,0%	88,6%	89,7%	90,3%	89,8%	88,3%	88,6%
<i>B. sp. PD13</i>	89,7%	91,3%	87,2%	90,2%	88,4%	88,3%	89,6%	90,2%	89,6%	88,3%	88,8%
<i>B. sp. PD7</i>	92,3%	90,8%	88,2%	92,1%	89,3%	90,0%	90,3%	90,8%	90,4%	89,9%	90,0%
<i>B. bacterium NS1-3</i>	90,7%	89,4%	88,4%	91,2%	89,5%	89,6%	89,3%	90,0%	89,5%	90,0%	90,2%
<i>B. TAT105</i>	91,5%	89,9%	88,2%	91,3%	90,0%	90,0%	89,3%	90,4%	89,4%	89,7%	90,7%
<i>T. multivorans</i>	91,6%	89,6%	87,6%	90,1%	93,1%	95,2%	87,9%	88,2%	88,1%	92,8%	92,6%
<i>B. fumaliori</i>	94,2%	90,4%	88,9%	92,7%	91,4%	90,5%	89,8%	90,5%	90,0%	91,1%	91,2%
<i>B. sp.. T3</i>	89,7%	90,9%	87,2%	90,3%	88,1%	88,7%	90,0%	90,6%	90,0%	88,4%	88,8%
<i>B. sp. 60S1b</i>	89,7%	90,9%	87,2%	90,3%	88,1%	88,7%	90,0%	90,6%	90,0%	88,4%	88,8%
<i>S. thermophilus</i>	85,9%	84,8%	84,1%	85,2%	84,1%	82,9%	83,6%	84,6%	83,7%	83,4%	83,6%

	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
<i>H. halotolerans</i>	ID										
<i>J. alimentarius</i>	89,5%	ID									
<i>L. salicampi</i>	91,0%	88,4%	ID								
<i>M. campisalis</i>	89,8%	95,8%	88,5%	ID							
<i>O. oncorhynchi</i>	91,2%	90,5%	91,9%	90,9%	ID						
<i>P. ryukyuensis</i>	93,3%	90,7%	92,9%	90,4%	93,2%	ID					
<i>S. thermophilus</i>	90,0%	90,8%	89,5%	90,9%	89,5%	90,9%	ID				
<i>S. kushneri</i>	92,4%	91,3%	92,7%	91,6%	92,5%	92,9%	90,6%	ID			
<i>T. multivorans</i>	91,4%	89,0%	91,7%	89,0%	91,1%	92,6%	89,8%	91,7%	ID		
<i>U. terrenus</i>	86,8%	91,2%	87,3%	90,4%	87,8%	87,6%	90,7%	88,6%	87,6%	ID	
<i>V. halodenitrificans</i>	93,7%	90,4%	94,1%	90,5%	93,6%	94,5%	91,2%	94,1%	93,3%	87,8%	ID
<i>B. sp. PD14</i>	87,3%	88,4%	88,0%	88,8%	88,1%	88,6%	90,7%	88,4%	87,5%	90,7%	88,0%
<i>B. sp. PD12</i>	87,4%	88,4%	88,1%	88,8%	88,2%	88,7%	90,7%	88,5%	87,5%	90,7%	88,0%
<i>B. sp. PD4</i>	87,4%	88,4%	88,1%	88,8%	88,2%	88,8%	90,7%	88,5%	87,4%	90,5%	88,0%
<i>B. sp. PD13</i>	87,6%	88,2%	87,9%	88,8%	88,5%	88,9%	90,9%	88,4%	87,8%	90,7%	88,2%
<i>B. sp. PD7</i>	89,3%	90,3%	89,3%	91,2%	91,2%	90,6%	91,5%	90,7%	89,4%	90,5%	90,1%
<i>B. bacterium NS1-3</i>	88,2%	88,9%	89,3%	89,4%	89,7%	90,2%	91,0%	89,6%	89,3%	90,0%	89,7%
<i>B. TAT105</i>	88,9%	90,7%	88,6%	91,3%	90,7%	90,9%	90,9%	90,1%	89,5%	91,0%	90,4%
<i>T. multivorans</i>	91,4%	89,0%	91,7%	89,0%	91,1%	92,6%	89,8%	91,7%	100%	87,6%	93,3%
<i>B. fumaliori</i>	91,7%	91,4%	90,3%	92,6%	91,9%	92,2%	92,2%	92,4%	90,8%	89,4%	92,8%
<i>B. sp. T3</i>	87,6%	88,6%	88,2%	89,0%	88,3%	88,8%	90,9%	88,6%	87,7%	90,9%	88,2%
<i>B. sp. 60S1b</i>	87,6%	88,6%	88,2%	89,0%	88,3%	88,8%	90,9%	88,6%	87,7%	90,9%	88,2%
<i>S. thermophilus</i>	83,4%	85,6%	83,4%	85,5%	85,6%	84,4%	84,1%	84,9%	83,1%	84,6%	84,8%

	34	35	36	37	38	39	40	41	42	T3	60S1b	45
<i>B. sp. PD14</i>	ID											
<i>B. sp. PD12</i>	99,5%	ID										
<i>B. sp. PD4</i>	99,2%	99,3%	ID									
<i>B. sp. PD13</i>	98,7%	98,6%	98,5%	ID								
<i>B. sp. PD7</i>	94,5%	94,6%	94,6%	94,6%	ID							
<i>B. bacterium NS1-3</i>	94,3%	94,3%	94,2%	94,0%	93,1%	ID						
<i>B. TAT105</i>	93,1%	93,0%	92,9%	93,3%	93,1%	94,1%	ID					
<i>T. multivorans</i>	87,5%	87,5%	87,4%	87,8%	89,4%	89,3%	89,5%	ID				
<i>B. fumaliori</i>	89,8%	89,8%	89,8%	89,7%	91,7%	90,7%	91,7%	90,8%	ID			
<i>B. sp. T3</i>	99,7%	99,7%	99,5%	98,9%	94,7%	94,6%	93,3%	87,7%	90,0%	ID		
<i>B. sp. 60S1b</i>	99,7%	99,7%	99,5%	98,9%	94,7%	94,6%	93,3%	87,7%	90,0%	1.000	ID	
<i>S. thermophilus</i>	84,4%	84,6%	84,4%	84,6%	86,5%	84,8%	85,8%	83,1%	85,2%	84,6%	84,6%	ID

Légende: 1; *A. contaminans* 2; *B. oleronius* 3; *B. flavothermus* 4; *B. smithi* 5; *B. bataviensis* 6; *B. clausii* 7; *B. gelatini* 8; *B. circulans* 9; *B. niacini* 10; *U. thermosphaericus* 11; *B. subtilis* 12; *B. sporothermodurans* 13; *G. thermocloacae* 14; *E. oxidotolerans* 15; *C. rupii* 16; *C. quisquiliarum* 17; *F. milosensis* 18; *G. lituanicus* 19; *G. thermodenitrificans* 20; *G. thermoleovorans* 21; *G. disposauri* 22; *G. halotolerans* 23; *H. halotolerans* 24; *J. alimentarius* 25; *L. salicampi* 26; *M. marinus* 27; *O. oncorhynchi* 28; *P. ryukyuensis* 29; *S. thermophilus* 30; *S. kushneri* 31; *T. multivorans* 32; *U. terrenus* 33; *V. halodenitrificans* 34; *B. sp. PD14* 35; *B. sp. PD12* 36; *B. sp. PD4* 37; *B. sp. PD13* 38; *B. sp. PD7* 39; *B. bacterium NS1-3* 40; *B. TAT105* 41; *T. multivorans* 42; *B. fumaliori* 43; *B. sp. T3* 44; *B. sp. 60S1b* 45; *S. thermophilus*.

Références

- AMANN, R. I., J. StromLey & K.H. Schleifer 1995. "Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation." Microbiological Reviews **59**: 143-69.
- ATLAS, R. M. et R. Bartha 1997. Microbial Ecology: fundamentals and applications, The Benjamin/Cumming Publishing Company Inc.
- BAE, H.D., L.J. Yanke, et al. 1999. "A novel staining method for detecting phytase activity". Journal of Microbiological Methods. **39**: 17-22.
- BAJPAIL, P. 1999. "Application of enzymes in the pulp and paper industry." Biotechnological Progress **15**: 147-57.
- BANAT, F. A., S. Prechtel, et al. 2000. "Aerobic thermophilic treatment of sewage sludge contaminated with 4-nonylphenol." Chemosphere **41**: 297-302.
- BARR, T. A., J.M. Taylor & S.J.B. Duff 1996. "Effect of HRT, STR and temperature on the performance of activated sludge reactors treating bleached Kraft mill effluent." Water Research **30**: 799-810.
- BEAUDET, R., C. Gagnon, et al. 1990. "Microbiological aspects of aerobic thermophilic treatment of swine waste." Applied Environmental Microbiology **56**: 971-6.
- BEGUIN, P. et J. P. Aubert 1994. "The biological degradation of cellulose." FEMS Microbiological Reviews **13**: 25-58.
- BERGER, J. L., B. H. Lee, et al. 1995. "Identification of new enzyme activities of several strains of *Thermus* species." Applied Microbiology and Biotechnology **44**: 81-7.
- BERRIDGE, M. J. et R. F. Irvine 1989. "Inositol phosphates and cell signalling." Nature **341**: 197-205.
- BEUTLER, E. (1995). Glucosylceramide lipidoses: Gaucher disease. The metabolic and molecular basis of inherited diseases. B. A. Scriver Cr, Sly WS, Valle D. New York, McGraw-Hill: 2641-70.
- BHAT, M. K. 2000. "Cellulases and related enzymes in biotechnology." Biotechnology Advances **18**: 355-83.
- BHAT, M. K. et S. Bhat 1997. "Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications." Biotechnology Advances **15**: 583-620.
- BHATIA, Y., S. Mishra, et al. 2002. "Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications." Critical Reviews in Biotechnology **22**: 375-407.

- BHATIA, Y., S. Mishra, et al. 2005. "Purification and characterization of recombinant *Escherichia coli*-expressed *Pichia etchellsii* beta-glucosidase II with high hydrolytic activity on sophorose." Applied Microbiology and Biotechnology **66**: 527-35.
- BIELY, P., D. Kluepfel, et al. 1993. "Mode of action of three endo-beta-1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*." Biochimica Biophysica Acta **1162**: 246-54.
- BIELY, P., M. Vrsanska, et al. 1997. "Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties." Journal of Biotechnology **57**: 151-66.
- BISAILLON, J.-G., R. Beaudet, et al. 1984. "Aspects microbiologiques du lisier de porc." Sciences et Techniques de l'eau **17**: 397-400.
- BISARIA, V. S. and S. Mishra 1989. "Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion." Critical Reviews in Biotechnology **9**: 61-103.
- BLACK, G. W., G. P. Hazlewood, et al. 1995. "A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain." Biochemical Journal **307**: 191-5.
- BLACK, G. W., J. E. Rixon, et al. 1997. "Cellulose binding domains and linker sequences potentiate the activity of hemicellulases against complex substrates." Journal of Biotechnology **57**: 59-69.
- BLACK, M. I., P.V. Scarpino, C.J. O'Donnell, et al. 1982. "Survival rates of parasitic eggs in sludge during aerobic and anaerobic digestion." Applied and Environmental Microbiology **44**: 1138-1143.
- BLOUIN, M., J. G. Bisailon, et al. 1990. "Nitrification of swine waste." Canadian Journal of Microbiology **36**: 273-8.
- BOUCHARD, B., R. Beaudet, et al. 1996. "Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol." International Journal of Systematic Bacteriology **46**: 1010-5.
- BOURQUE, D., J.G. Bisailon, et al. 1987. "Microbiological degradation of malodorous substances of swine waste under aerobic conditions." Applied Environmental Microbiology **53**: 137-141.
- BRADY, R. O., J. Kanfer, et al. 1965. "The Metabolism of Glucocerebrosides. I. Purification and Properties of a Glucocerebroside-Cleaving Enzyme from Spleen Tissue." Journal of Biological Chemistry **240**: 39-43.

- BRANCONNIER, J. R., B.D. Cumming, L.R. Jackman 1998. "Process for thermophilic aerobic fermentation of organic waste." American Patent 5,810.903.
- BROCK, T. D. et H. Freeze 1969. "*Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile." Journal of Bacteriology **98**: 289-97.
- BRUINS, M. E., A. E. Janssen, et al. 2001. "Thermostases and their applications: a review of recent literature and patents." Applied Biochemistry and Biotechnology **90**: 155-86.
- CARRARD, G., A. Koivula, et al. 2000. "Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose." Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 10342-7.
- CARRINGTON, E. G., R.D. Davis, et al. (1998). Review of the scientific evidence relating to the controls on the agriculture use of sewage sludge. Report DETR 4415/3 (part 1) and Report DETR 4454/4 (part 2). W. Plc. Medmenham.
- CHRISTOV, L. P., G. Szakacs, H. Balakrishnan 1999. "Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching." Process Biochemistry **34**: 511-7.
- COLLINS, T., C. Gerday, et al. 2005. "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases." FEMS Microbiology Reviews **29**: 3-23.
- COMBET-BLANC, Y., B. Ollivier, et al. 1995. "*Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a moderately thermophilic and amylolytic bacterium." International Journal of Systematic Bacteriology **45**: 9-16.
- COUGHLAN, M. P. 1985. "Cellulases: production, properties and applications." 611th Meeting, Colloquium: 405-6.
- de la NOÛE J., J. S. R., C. Mariojous, et al. 1994. "Biotreatment of swine manure by intensive lagooning during winter." Bioresource Technology **50**: 213-9.
- de VRIES, R. P. et J. Visser 2001. "*Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides." Microbiology and Molecular Biology Reviews **65**: 497-522.
- DEES, P. M. et W. C. Ghiorse 2001. "Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA." FEMS Microbiology Ecology **35**: 207-16.
- DEMHARTER, W. et R. Hensel 1989. "*Bacillus thermocloaceae* sp. nov., a new thermophilic species from sewage sludge." Systemic and Applied Microbiology **11**: 272-6.

- DOYLE, Y., R. Guay, J. de la Noüe & J. Asselin 1986. "Traitement aérobie du lisier de porc: aspects microbiens." Canadian Journal of Microbiology **32**: 679-86.
- EZEJI, T. C., A. Wolf, et al. 2005. "Isolation, characterization, and identification of *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10, an α -amylase and α -glucosidase producing thermophile." Canadian Journal of Microbiology **51**: 685-93.
- FERREIRA, F. L., J. de Lucas, et al. 2003. "Partial characterization of the polluting load of swine wastewater treated with an integrated biodigestion system." Bioresource Technology **90**: 101-8.
- FISCHER, L., R. Bromann, et al. 1996. "Catalytical potency of beta-glucosidase from the extremophile *Pyrococcus furiosus* in glucoconjugate synthesis." Biotechnology (N Y) **14**: 88-91.
- FISKE, C. H., Y. Subbarow 1925. "The colorimetric determination of phosphorus." The Journal of Biological Chemistry **116**: 375-400.
- FORTINA, M. G., R. Pukall, et al. 2001. "*Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson et al. 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov." International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology **51**: 447-55.
- FPPQ, Fédération des producteurs de porcs du Québec. (2002). Réglementation environnementale et la production porcine, Fiche technique 7. Longueuil, FPPQ.
- FRIGON, J. C., R. Cimpola, et al. 2003. "Sequential anaerobic/aerobic biotreatment of bark leachate." Water Science Technology **48**: 203-9.
- GAGNE, A., M. Chicoine, et al. 2001. "Phenotypic and genotypic characterization of esterase-producing *Ureibacillus thermosphaericus* isolated from an aerobic digester of swine waste." Canadian Journal of Microbiology **47**: 908-15.
- GALANTE, Y. M., C. Formantici 1998. "Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries." Current Organic Chemistry **7**: 1399-422.
- GARCIA, T., Beirith, B. 1996. "Quantificação da contaminação dos rios pela biomassa da suinocultura em Santa Catarina (região oeste): estudo e comprovção da poluição dos mananciais de abastecimento publicos." Monografia, Chapeco : Universidade de Oeste de Santa Catarina.
- GARDNER, K. H. et J. Blackwell 1974. "The hydrogen bonding in native cellulose." Biochimica Biophysica Acta **343**: 232-7.

- GEERLINGS, A., M. M. Ibanez, et al. 2000. "Molecular cloning and analysis of strictosidine beta-D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*." Journal of Biological Chemistry **275**: 3051-6.
- GILKES, N. R., B. Henrissat, et al. 1991. "Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families." Microbiological Review **55**: 303-15.
- GODFREY, T., West S, editors (1996). Industrial Enzymology. London, Macmillan Press.
- GONZALEZ-BLASCO, G., J. Sanz-Aparicio, et al. 2000. "Directed evolution of beta - glucosidase A from *Paenibacillus polymyxa* to thermal resistance." Journal of Biological Chemistry **275**: 13708-12.
- GRASSIN, C. P. F. (1996). Fruit Juices. Industrial Enzymology. W. S. Godfrey T, editors, UK: Macmillan Press: 374-83.
- GUEGUEN, Y., P. Chermardin, et al. 1997. "Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized B-glucosidase." Journal of Biotechnology **55**: 151-6.
- HAN, Y. W. et V. R. Srinivasan 1969. "Purification and characterization of beta-glucosidase of *Alcaligenes faecalis*." Journal of Bacteriology **100**: 1355-63.
- HAWUMBA, J. F., J. Theron, et al. 2002. "Thermophilic protease-producing *Geobacillus* from Buranga hot springs in Western Uganda." Current Microbiology **45**: 144-50.
- HENRISSAT, B. 1991. "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." Biochemical Journal **280**: 309-16.
- HENRISSAT, B. et A. Bairoch 1993. "New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." Biochemical Journal **293**: 781-8.
- HENRISSAT, B. et A. Bairoch 1996. "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases." Biochemical Journal **316**: 695-6.
- HUBER, H., S. Burggraf, et al. 2000. "*Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp. nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov." International Journal of Systemic Evolutionary Microbiology **50**: 2093-100.
- HUMPF, H. U., P. Schreier 1991. "Bound aroma compounds from the fruit and the leaves of blackberry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **39**: 1830-2.

- HUTCHISON, M. L., L. D. Walters, et al. 2004. "Levels of zoonotic agents in British livestock manures." Letters of Applied Microbiology **39**: 207-14.
- HUTCHISON, M. L., L. D. Walters, et al. 2004. "Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil." Applied Environmental Microbiology **70**: 5111-8.
- IRWIN, D., E. D. Jung, et al. 1994. "Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase." Applied Environmental Microbiology **60**: 763-70.
- ISHII, K., M. Fukui, et al. 2000. "Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis." Journal of Applied Microbiology **89**: 768-77.
- ITO, S. 1997. "Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus*: enzymatic properties, genetics, and application to detergents." Extremophiles **1**: 61-6.
- JAEGER, K. E. et T. Eggert 2002. "Lipases for biotechnology." Current Opinions in Biotechnology **13**: 390-7.
- JUTEAU, P., D. Tremblay, et al. 2004. "Swine waste treatment by self-heating aerobic thermophilic bioreactors." Water Resources **38**: 539-46.
- JUTEAU, P., D. Tremblay, et al. 2005. "Analysis of the bacterial community inhabiting an aerobic thermophilic sequencing batch reactor (AT-SBR) treating swine waste." Applied Microbiology and Biotechnology **66**: 115-22.
- KALYUZHNYI, S., M. Gladchenko, et al. 2003. "Combined anaerobic-aerobic treatment of landfill leachates under mesophilic, submesophilic and psychrophilic conditions." Water Science Technology **48**: 311-8.
- KEROVUO, J., I. Lappalainen, et al. 2000. "The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase." Biochemical Biophysical Research Communications **268**: 365-9.
- KEROVUO, J., M. Lauraeus, et al. 1998. "Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*." Applied Environmental Microbiology **64**: 2079-85.
- KEROVUO, J., J. Rouvinen, et al. 2000. "Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism." Biochemical Journal **352**: 623-8.
- KIM, J. H., D. Irwin, et al. 2004. "Purification and characterization of *Thermobifida fusca* xylanase 10B." Canadian Journal of Microbiology **50**: 835-43.

- KIM, K. W. et S. B. Lee 2003. "Inhibitory effect of Maillard reaction products on growth of the aerobic marine hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*." Applied Environmental Microbiology **69**: 4325-8.
- KIM, Y. O., H.K. Kim, et al. 1998. "Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11." Enzyme and Microbial Technology **22**: 2-7.
- KIM, Y. O., J. K. Lee, et al. 1998. "Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Letters **162**: 185-91.
- KIRK, O., T. V. Borchert, et al. 2002. "Industrial enzyme applications." Current Opinions in Biotechnology **13**: 345-51.
- KIRK, T. K. et R. L. Farrell 1987. "Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin." Annual Reviews in Microbiology **41**: 465-505.
- KOSTREWA, D., M. Wyss, et al. 1999. "Crystal structure of *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase at 2.4 Å resolution." Journal of Molecular Biology **288**: 965-74.
- KRAMMER, G., P. Winterhalter, et al. 1991. "Glycosidically bound aroma compounds in the fruit of *Prunus* species: apricot (*P. armeniaca* L.), peach (*P. persica* L.), yellow plum (*P. domestica* L. ssp. *Syraca*)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **39**: 778-81.
- KUISIENE, N., J. Raugalas, et al. 2004. "*Geobacillus lituanicus* sp. nov." International Journal of Systemic Evolutionary Microbiology **54**: 1991-5.
- LAEMMLI, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-5.
- LAPARA, T. M., A. Konopka, et al. 2000. "Effects of elevated temperature on bacterial community structure and function in bioreactors treating a synthetic wastewater." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **24**: 140-5.
- LAPARA, T. M., C.H. Nakatsu, et al. 2000. "Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater." Applied Environmental Microbiology **66**: 3951-9.
- LAPARA, T. M., C.H. Nakatsu, et al. 2002. "Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE." Water Research **36**: 638-46.
- LAPARA, T. M., J.E. Alleman 1999. "Thermophilic aerobic biological wastewater treatment." Water Resource **33**: 895-908.

- LEE, J., K. S. Kwon, et al. 1996. "Regulation of beta-glucosidase biosynthesis in *Aspergillus nidulans*." FEMS Microbiological Letters **135**: 79-84.
- LEI, X., P. K. Ku, et al. 1993. "Supplemental microbial phytase improves bioavailability of dietary zinc to weanling pigs." Journal of Nutrition **123**: 1117-23.
- LEI, X. G. et J. M. Porres 2003. "Phytase enzymology, applications, and biotechnology." Biotechnology Letters **25**: 1787-94.
- LEI, X. G. et C. H. Stahl 2001. "Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection." Applied Microbiology and Biotechnology **57**: 474-81.
- LEVER, M., T. A. Walmsley, et al. 1984. "Optimal conditions for 4-hydroxybenzoyl- and 2-furoylhydrazine as reagents for the determination of carbohydrates, including ketosamines." Analytic Biochemistry **139**: 205-11.
- LEWIS, G. E., C. W. Hunt, et al. 1996. "Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers." Journal of Animal Science **74**: 3020-8.
- LI, W. F., X. X. Zhou, et al. 2005. "Structural features of thermozymes." Biotechnology Advances **23**: 271-81.
- LI, Y. K., J. Chir, et al. 2001. "Catalytic mechanism of a family 3 beta-glucosidase and mutagenesis study on residue Asp-247." Biochemical Journal **355**: 835-40.
- LINDER, M., T.T. Teeri 1997. "The roles and function of cellulose-binding domains." Journal of Biotechnology **57**: 15-28.
- LJUNGDAHL, L. G. K. E. E. 1985. "Ecology of microbial cellulose degradation." Advances in Microbiology and Ecology **8**: 237-99.
- MAIR, N. S., M. E. Sharpe, J. G. Holt. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. A. Sneath. **2**: Section 13.
- MANACHINI, P. L., D. Mora, et al. 2000. "*Bacillus thermodenitrificans* sp. nov., nom. rev." International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology **50**: 1331-7.
- MARCHANT, R., I. M. Banat, et al. 2002. "The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments." Environmental Microbiology **4**: 595-602.

- MARGOLLES-CLARK, E., M. Ilmén, M. Penttilä 1997. "Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources." Journal of Biotechnology **57**: 167-79.
- MASSÉ, D. I., N.K. Patni, R.L. et al. 1996. "Operation strategies for psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors." Canadian Journal of Civil Engineering **23**: 1285-94.
- MCMULLAN, G., J. M. Christie, et al. 2004. "Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*." Biochemical Society Transactions **32**: 214-7.
- MINER, J. R. 1999. "Alternatives to minimize the environmental impact of large swine production units." Journal of Animal Science **77**: 440-4.
- MOHAIBES, M. et H. Heinonen-Tanski 2004. "Aerobic thermophilic treatment of farm slurry and food wastes." Bioresource Technology **95**: 245-54.
- MOLLER, H. B., S. G. Sommer, et al. 2004. "Biological degradation and greenhouse gas emissions during pre-storage of liquid animal manure." Journal of Environmental Quality **33**: 27-36.
- MONTANARI, G., A. Borsari, et al. 2004. "Morphological and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans*." Journal of Applied Microbiology **97**: 802-9.
- MULDER, R., T. L. Vereijken, et al. 2001. "Future perspectives in bioreactor development." Water Science Technology **44**: 27-32.
- MULLANEY, E. J., C. B. Daly, et al. 2000. "Advances in phytase research." Advances in Applied Microbiology **47**: 157-99.
- MULLANEY, E. J. et A. H. Ullah 2003. "The term phytase comprises several different classes of enzymes." Biochemical Biophysical Research Communications **312**: 179-84.
- NAGATOMO, H., Y. Matsushita, et al. 2005. "Preparation and properties of gelatin-immobilized beta-glucosidase from *Pyrococcus furiosus*." Bioscience and Biotechnology Biochemistry **69**: 128-36.
- NAZINA, T. N., T. P. Tourova, et al. 2001. "Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*,

- G. kaustophilus*, *G. thermodenitrificans*." International Journal of Systemic Evolutionary Microbiology **51**: 433-46.
- NDEGWA, P. M., J. Zhu, et al. 2003. "Effects of bioreactor temperature and time on odor-related parameters in aerated swine manure slurries." Environmental Technology **24**: 1007-16.
- NG, W. J. 1989. "A sequencing batch anaerobic reactor for treating piggery wastewater." Biological Wastes **28**: 39-51.
- NIKOLAY, A. S., D.B. Wilson 1999. "A *celR* Mutation Affecting Transcription of Cellulase Genes in *Thermobifida fusca* ." Journal of Bacteriology **182**: 252-55.
- O'DELL, B. L. J. E. S. 1960. "Effects of phytic acid on zinc bioavailability." Proceedings Society Experimental Biology Medecine **103**: 30.
- OH, B. C., B. S. Chang, et al. 2001. "Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11." Biochemistry **40**: 9669-76.
- PANDEY, A., G. Szakacs, et al. 2001. "Production, purification and properties of microbial phytases." Bioresource Technology **77**: 203-14.
- PANTAZAKI, A. A., A. A. Pritsa, et al. 2002. "Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*." Applied Microbiology and Biotechnology **58**: 1-12.
- PARK, C. B., & S.B. Lee 2000. "Effect of exogenous compatible solutes on growth of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*." Journal of Bioscience and Bioengineering **89**: 318-22.
- PELL, A. N. 1997. "Manure and microbes: public and animal health problem?" Journal of Dairy Science **80**: 2673-81.
- POLIZELI, M. L., A. C. Rizzatti, et al. 2005. "Xylanases from fungi: properties and industrial applications." Applied Microbiology and Biotechnology **67**: 577-91.
- PONTI, C., B. Sonnleitner, A. Fiechter 1995. "Aerobic thermophilic treatment of sewage sludge at pilot plant scale. 1. Operating conditions." Journal of Biotechnology **38**: 173-82.
- RABINOVICH, M. L., M. S. Melnick, et al. 2002. "The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes." Biochemistry (Mosc) **67**: 850-71.
- RAHMAN, A. K. M. S., Naoyasu Sugitani, et al. 2003. "A role of xylanase, -L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation." Canadian Journal of Microbiology **49**: 58-64.

- RAO, M. B., A. M. Tanksale, et al. 1998. "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**: 597-635.
- REINHARDT, D. P., R. N. Ono, et al. 1997. "Calcium stabilizes fibrillin-1 against proteolytic degradation." Journal of Biological Chemistry **272**: 1231-6.
- RHEE, S. K., C. O. Jeon, et al. 2002. "Characterization of *Symbiobacterium toebii*, an obligate commensal thermophile isolated from compost." Extremophiles **6**: 57-64.
- ROUVINEN, J., T. Bergfors, et al. 1990. "Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*." Science **249**: 380-6.
- SANCHEZ, M. M., F. I. Pastor, et al. 2003. "Exo-mode of action of cellobiohydrolase Cel48C from *Paenibacillus* sp. BP-23. A unique type of cellulase among *Bacillales*." European Journal of Biochemistry **270**: 2913-9.
- SCHAFFER, C., W. L. Franck, et al. 2004. "Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov." International Journal of Systemic Evolutionary Microbiology **54**: 2361-8.
- SCHALLMEY, M., A. Singh, et O.P. Ward. 2004. "Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production." Canadian Journal of Microbiology **50**: 1-17.
- SCHWARZENBECK, N., J. M. Borges, et al. 2005. "Treatment of dairy effluents in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor." Applied Microbiology and Biotechnology **66**: 711-8.
- SEBASTIAN, S., S. P. Touchburn, et al. 1996. "Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens." Poultry Science **75**: 1516-23.
- SEIDLE, H. F. et R. E. Huber 2005. "Transglucosidic reactions of the *Aspergillus niger* family 3 beta-glucosidase: qualitative and quantitative analyses and evidence that the transglucosidic rate is independent of pH." Archives of Biochemistry and Biophysics **436**: 254-64.
- SHALLOM, D. et Y. Shoham 2003. "Microbial hemicellulases." Current Opinions in Microbiology **6**: 219-28.
- SHIBUYA, H., S. Kaneko, et al. 2000. "Enhancement of the thermostability and hydrolytic activity of xylanase by random gene shuffling." Biochemical Journal **349**: 651-6.
- SONNLEITNER, B. et M. Bomio 1990. "Physiology and performance of thermophilic microorganisms in sewage sludge treatment processes." Biodegradation **1**: 133-46.

- SPANNO, G. A. R., M. Ugliano, et al. 2005. "A *B*-Glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses." Journal of Applied Microbiology **98**: 855-61.
- SPURWAY, T. D., C. Morland, et al. 1997. "Calcium protects a mesophilic xylanase from proteinase inactivation and thermal unfolding." Journal of Biological Chemistry **272**: 17523-30.
- ST-ARNAUD, S., J.G. Bisailon et R. Beaudet 1991. "Microbiological aspects of ammonia oxidation of swine waste." Canadian Journal of Microbiology **37**: 918-23.
- SUNG, M. H., H. Kim, et al. 2002. "*Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost." International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology **52**: 2251-5.
- SÜRÜCÜ, G. 1999. "Growth requirements of thermophilic aerobic microorganisms in mixed cultures for the treatment of strong wastes." Water Science Technology **41**: 53-60.
- SUZUKI, K., Y. Tanaka, et al. 2002. "Removal of phosphate, magnesium and calcium from swine wastewater through crystallization enhanced by aeration." Water Research **36**: 2991-8.
- TAKAO, M., K. Akiyama, et al. 2002. "Purification and characterization of thermostable endo-1,5- α -L-arabinase from a strain of *Bacillus thermodenitrificans*." Applied Environmental Microbiology **68**: 1639-46.
- TEERI, T. T. 1997. "Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases." Tibtech **15**.
- TIAGO, I., I. Teixeira, et al. 2004. "Metabolic and genetic diversity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from composted municipal sludge on poly-epsilon-caprolactones." Current Microbiology **49**: 407-14.
- TOUZEL, J. P., M. O'Donohue, et al. 2000. "*Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil." International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology **50**: 315-20.
- TREMBLAY, D. 2003. "Caractérisation de la flore microbienne d'un bioprocédé aérobie thermophile pour le traitement du lisier de porc." INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 151 pages.
- TWOMEY, L. N., J.R. Pluske, et al. 2003. "The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility." Animal Feed Science Technology **108**: 71-82.

- TYE, A. J., F. K. Siu, et al. 2002. "Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*." Applied Microbiology and Biotechnology **59**: 190-7.
- ULLAH, A. H. et B. J. Cummins 1987. "Purification, N-terminal amino acid sequence and characterization of pH 2.5 optimum acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*." Preparative Biochemistry **17**: 397-422.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1990. "Autothermal thermophilic aerobic digestion of municipal wastewater sludge". Dans: Environmental Regulation and Technology. Washington DC.
- VAN PEJI, N. N. M. E., J. Brinkmann, et al 1997. " β -Xylosidase activity, encoded by xlnDxlnD, is essential for complete hydrolysis of xylan by *Aspergillus niger* but not for induction of the xylanolytic enzymes spectrum." European Journal of Biochemistry **245**: 164-73.
- VAN PETEGEM, F., T. Collins, et al. 2003. "The structure of a cold-adapted family 8 xylanase at 1.3 Å resolution. Structural adaptations to cold and investigation of the active site." Journal of Biological Chemistry **278**: 7531-9.
- VARGHESE, J. N., M. Hrmova, et al. 1999. "Three-dimensional structure of a barley beta-D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase." Structure Fold Des **7**: 179-90.
- VIIKARI, L., A. Kantelinen, et al. 1994. "Xylanases in bleaching, from an idea to the industry." FEMS Microbiological Reviews **13**: 335-50.
- VOHRA, A. et T. Satyanarayana 2003. "Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications." Critical Reviews in Biotechnology **23**: 29-60.
- VROEMEN, S., J. Heldens, et al. 1995. "Cloning and characterization of the bgxA gene from *Erwinia chrysanthemi* D1 which encodes a beta-glucosidase/xylosidase enzyme." Molecular and General Genetics **246**: 465-77.
- WAGNER, M., R. Amann, et al. 1993. "Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure." Applied Environmental Microbiology **59**: 1520-5.
- WARREN, R. A. 1996. "Microbial hydrolysis of polysaccharides." Annual Reviews in Microbiology **50**: 183-212.

- WENSTRUP, R. J., M. Roca-Espiau, et al. 2002. "Skeletal aspects of Gaucher disease: a review." British Journal of Radiology **75**: A2-12.
- WESTERMAN, P. W., J.R. Bicudo, A. Kantardjieff 2000. "Upflow biological aerated filters for the treatment of flushed swine manure." Bioresource Technology **74**: 181-90.
- WIEGEL, J. (1998). Ecology and diversity of anaerobic alkali-thermophiles. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Halifax, Nova-Scotia, Canada.
- WIEGEL, J. et V. V. Kevbrin 2003. "Alkalithermophiles." Biochemical Society Transactions **32**: 193-8.
- WILDERER, P. A. et B. S. McSwain 2004. "The SBR and its biofilm application potentials." Water Science Technology **50**: 1-10.
- WILSON, D. B. 2004. "Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes." Chemistry Record **4**: 72-82.
- WITHERS, S. G. 2001. "Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases." Carbohydrate Polymers **44**: 325-37.
- WITHERS, S. G., K. Rupitz, et al. 1988. "2-Deoxy-2-fluoro-D-glycosyl fluorides. A new class of specific mechanism-based glycosidase inhibitors." Journal of Biological Chemistry **263**: 7929-32.
- WONG, K. K., L. U. Tan, et al. 1988. "Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications." Microbiological Reviews **52**: 305-17.
- WYSS, M., R. Brugger, et al. 1999. "Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties." Applied Environmental Microbiology **65**: 367-73.
- YAZAKI, T., M. Ohnishi, et al. 1997. "Subsite structure of the beta-glucosidase from *Aspergillus niger*, evaluated by steady-state kinetics with cello-oligosaccharides as substrates." Carbohydrate Resources **298**: 51-7.
- ZEIKUS, J. G., C. Vieille, et al. 1998. "Thermozymes: biotechnology and structure-function relationships." Extremophiles **2**: 179-83.
- ZHANG, Y. H. et L. R. Lynd 2004. "Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems." Biotechnology Bioengineering **88**: 797-824.

ZHU, J. 2000. "A review of microbiology in swine manure odor control." Agriculture Ecosystems and Environment **78**: 93-106.

