

**Université du Québec
INRS - Eau, Terre et Environnement**

**Production d'enzymes protéolytiques par des bactéries non conventionnelles isolées de
boues d'épuration municipales**

**par
Jean Philippe Chenel**

**Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences de l'eau**

Jury d'évaluation

Examineur externe

**Monsieur Denis Groleau
IRB - CNRC**

Examineur interne

**Monsieur Patrice Couture
INRS-ETE
Université du Québec**

Directeur de recherche

**Monsieur Rajeshwar D. Tyagi
INRS-ETE
Université du Québec**

Août 2005

© Droits réservés de Jean Philippe Chenel

À des fins de citation :

Chenel, J.P. 2004. Production d'enzymes protéolytiques par des bactéries non conventionnelles isolées de boues d'épuration municipales. Mémoire de Maîtrise présenté pour l'obtention du grade Maître ès sciences (M. Sc.) en sciences de l'eau. Institut National de la Recherche Scientifique – Eau, Terre et Environnement. Québec. 59 pages.

RÉSUMÉ

Puisque la plupart des nouvelles technologies sont axées vers des considérations de plus en plus écologiques et environnementales, les divers organismes et industries doivent savoir s'adapter en ce sens. Le présent projet s'inscrit dans cette optique puisqu'il vise la production de protéases, la caractérisation de nouvelles bactéries non conventionnelles productrices de ces protéases et la détermination des meilleures conditions de fermentation des substrats synthétiques et résiduels (eaux usées, boues d'épuration). Ces protéases peuvent être utilisées dans l'industrie des détergents comme enzymes de lavage pour la machinerie, pour la vente commerciale ou dans les pâtes et papiers afin de remplacer les produits chimiques néfastes pour l'environnement. Les nouvelles méthodes de production de ces enzymes se doivent aussi d'être utilisables à plus faibles coûts que les méthodes conventionnelles. Un des défis de ce projet se situe à ce niveau. Normalement, la production de protéases à partir de souches bactériennes conventionnelles a un coût plus élevé que la production d'un produit chimique qui a la même efficacité. Puisque l'industrie n'est pas intéressée à un produit plus coûteux, il faut développer de nouvelles méthodes de production. Il est possible de produire les mêmes enzymes bactériennes mais à l'aide de souches non conventionnelles plus performantes. Il est aussi possible d'utiliser des milieux de culture alternatifs peu coûteux comme les boues d'épuration et les eaux usées de diverses sources.


Le projet se divise en deux parties. Dans la première, il s'agit d'isoler des bactéries thermophiles (+ de 45°C) d'un mélange de trois boues d'épuration municipales et de déterminer la force des protéases thermostables produites par ces bactéries dans un milieu synthétique à base de farine de soya en fermenteurs de 15l. Différents paramètres ont été testés afin d'optimiser la croissance bactérienne ainsi que la stabilité des enzymes. Dans un premier temps, des températures de fermentation de 40°C à 60°C ont été utilisées pour déterminer la température optimale de croissance des différentes souches. Dans ce cas, c'est une température de 50°C qui semble être l'optimum pour les trois souches productrices d'enzymes trouvées. Par la suite, des températures de stabilité des enzymes ont été testées. Dans la gamme de températures de 40°C à 70°C, 60°C semble être la température de stabilité optimale des différentes enzymes produites par les trois souches. Des mesures d'activités protéolytiques dans une solution de caséine ont été produites et

ces activités, exprimées en Unités Internationales par millilitres (UI/ml), ont donné des valeurs de 2.40 UI/ml, 1.43 UI/ml et 5.25 UI/ml, respectivement, pour les trois souches nommées AC, B et D. Ces souches semblent appartenir aux genres *Bordetella*, *Aeromonas* et *Enterobacter*, des bactéries Gram-négatives non-sporulantes exclusivement. Ce projet trouvera suite dans l'utilisation de divers milieux alternatifs comme les boues d'épuration, ce qui devrait grandement augmenter la quantité de protéases produites par les bactéries.

La deuxième partie de ce projet consiste à isoler des bactéries mésophiles (25°C – 35°C) de boues d'épuration municipales et de leur faire produire des enzymes dans différents milieux comme le milieu synthétique à base de farine de soya, les eaux usées de l'industrie d'amidon et les boues d'épuration de la Ville de Québec. Une température de culture de 30°C en fioles Erlenmeyers a permis de sélectionner deux souches bactériennes Gram-positives qui possédaient le meilleur potentiel pour la production de protéases. Ces bactéries sont du genre *Bacillus*; des expériences plus approfondies seraient nécessaires afin d'en déterminer l'espèce. Les expériences ont permis de découvrir que les différentes souches produisaient les enzymes différemment dépendant du type de milieu utilisé pour leur culture. En effet, les niveaux atteints diffèrent et les graphiques tendent à montrer que les bactéries produisent plusieurs types d'enzymes durant une même fermentation dans le même milieu. Les courbes sont sous forme de vagues, ce qui donne différents optimums de quantité d'enzymes produites durant toute la durée de la fermentation. La souche S1 semble pouvoir produire deux enzymes durant une fermentation de 72 heures et les niveaux peuvent atteindre jusqu'à 0.6 UI/ml dans le milieu d'amidon. La souche S5, quant à elle, produit jusqu'à trois enzymes pendant les 72 heures de fermentation et les niveaux peuvent atteindre 1.4 UI/ml dans le milieu d'amidon. L'optimisation des paramètres de culture pourrait améliorer la puissance de ces enzymes.

La production d'enzymes à des niveaux satisfaisants pour l'industrie pourrait mener à une révolution complète des méthodes industrielles pour la production et l'utilisation de ces enzymes. L'utilisation de milieux alternatifs et de souches non conventionnelles à plus fort potentiel protéolytique permettrait de faire des économies importantes en plus de préserver l'équilibre écologique précaire de la planète. En effet, l'utilisation d'eaux usées et de boues d'épuration comme milieu de culture constitue un coût plus faible pour l'industrie puisque les stations

d'épuration municipales ou industrielles paient pour se débarrasser de ces rejets. De plus, l'utilisation d'enzymes microbiennes permet le remplacement des produits chimiques utilisés dans les industries (blanchiment du papier) ou à la maison (solutions nettoyantes à base de produits chimiques) ce qui empêche le rejet dans l'environnement de substances chimiques néfastes.



Jean Philippe Chenel

(Étudiant)



Rajeshwar D. Tyagi

(Directeur de recherche)

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ÉQUATIONS	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 ENZYMES.....	3
2.1 Historique, définition, fonctionnement.....	3
2.2 Sortes et sources d'enzymes	5
2.3 Mesure de la force enzymatique	6
CHAPITRE 3 INDUSTRIE ENZYMATIQUE.....	7
3.1 Les protéases.....	7
3.2 Utilisation des enzymes	8
3.2.1 Ingénierie enzymatique.....	8
3.2.2 Techniques de production	9
3.2.3 Récupération des enzymes.....	10
CHAPITRE 4 ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASES PRODUCED BY PROTEOLYTIC STRAINS.....	12
4.1 Résumé	13
4.2 Abstract.....	13
4.3 Introduction	14
4.4 Materials and methods.....	15
4.4.1 Microbial growth media	15
4.4.2 Experimental Methods.....	15
4.4.2.1 Collection of sludge samples.....	15
4.4.2.2 Isolation of new bacterial strains	15
4.4.2.3 Screening and identification of proteolytic strains.....	16
4.4.2.4 Determination of optimal temperature for bacterial growth, enzyme production and stability.....	16
4.4.2.5 Total Cell Count (TC).....	16
4.4.2.6 Bacterial growth and enzyme production in fermentor	17
4.4.2.7 Proteolytic assay	18
4.5 Results and discussion.....	19
4.5.1 Isolation of proteolytic strains.....	19
4.5.2 Shake flask studies	19
4.5.3 Proteolytic activities in shake flasks	21
4.5.4 Protease activity and optimum temperature	21
4.5.5 Bench scale study.....	21
4.6 Conclusion.....	23
CHAPITRE 5 PROTEASE PRODUCTION BY ROD-SHAPED GRAM-POSITIVE BACTERIA IN NEW ALTERNATE MEDIUM	28
5.1 Résumé	29
5.2 Abstract.....	29

5.3	Introduction	30
5.4	Materials and methods.....	31
5.4.1	Materials	31
5.4.1.1	Culture media	31
5.4.1.2	Gelatine medium	31
5.4.1.3	Enzymatic assay solutions	32
5.4.2	Methods	32
5.4.2.1	Isolation of bacterial strains	32
5.4.2.2	Growth conditions	32
5.4.2.3	Protease activity assay	33
5.4.2.4	Total Cell (TC) Count	33
5.5	Results and discussion.....	34
5.5.1	Bacterial strains.....	34
5.5.2	Gelatine test	34
5.5.3	Growth results	34
5.5.4	Protease activity.....	35
5.6	Conclusion.....	38
CHAPITRE 6	DISCUSSION	43
CHAPITRE 7	CONCLUSION.....	51
RÉFÉRENCES	53

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Comparaison entre l'énergie d'activation d'une réaction métabolique avec et sans catalyseur (enzyme) (Biologie, Cégep Ste-Foy, 2004).....	4
Figure 2: Growth profile for various strains (AC, B and D) at different temperatures (40, 50 and 60 °C) in 500 ml shake flask (working volume of 100 ml S.M.). a) AC, b) B and c) D. Note: pH profile was only measured during fermentation at 50 °C.	25
Figure 3: Proteolytic activities (PA) (IU/ml) of various strains (AC, B and D) during 500 ml shake flasks experiments (working volume of 100 ml S.M.) at an optimal stability temperature of 60 °C	26
Figure 4: Proteolytic activities (PA) (IU/ml) of various strains (AC, B and D) during 500 ml shake flasks experiments (working volume of 100 ml S.M.) at different temperatures (40, 50, 60 and 70 °C).....	26
Figure 5: a) Growth and DO profiles for various strains (AC, B and D) in 15 l fermentor (working volume of 10 l S.M.) at an optimal growth temperature of 50 °C. b) Proteolytic activities (PA) (IU/ml) of various strains (AC, B and D) measured with modified Kunitz method at an optimal stability temperature of 60 °C.....	27
Figure 6: Standard curve of tyrosine absorbance	41
Figure 7: Growth and proteolytic activity (PA) profiles of S1 strain in shake flasks experiments at 30 ± 1 °C for 72 hours in three media: soy, starch wastewater and CUQ sludge.....	41
Figure 8: Growth and proteolytic activity (PA) profiles of S5 strain in shake flasks experiments at 30 ± 1 °C for 72 hours in three media: soy, starch wastewater and CUQ sludge.....	42
Figure 9: Profils de l'oxygène dissous (DO) pour les souches AC et D lors d'une fermentation de 48 heures à 40 °C en fermenteur de 15 l (volume de travail de 10 l) dans un milieu synthétique.....	52
Figure 10: Activités enzymatiques des souches AC et D lors d'une fermentation de 48 heures à 40°C en fermenteur de 15 l (volume de travail de 10 l) dans un milieu synthétique.	52

LISTE DES TABLEAUX

Table 1: CUQ wastewater mixed sludge composition (Sikati-Foko et al., 2001).....	39
Table 2: Starch wastewater composition (Lab Data).....	40

LISTE DES ÉQUATIONS

Equation 1	18
------------------	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

%	Pourcentage
°C	Degrés Celsius (Celsius Degree)
\$CDN/kg	Dollars Canadien / kilogramme
BLK	Black Lake
CFU/ml	Colony Formative Unit / millilitre
CUQ	Communauté Urbaine de Québec
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DO	Dissolved Oxygen (Oxygène dissous)
g	Gravitational Acceleration
IU/ml	International Unit / millilitre
kDa	kilo Dalton
l	litre
M	Molaire
mg / kg	milligramme / kilogramme (milligram / kilogram)
ml	millilitre
nm	nanomètre (nanometre)
PA	proteolytic activity
PPG	Polypropylène Glycol (Polypropylene Glycol)
rpm	rotation par minute (rotation per minute)
S.M.	Synthetic Medium
TC	Total Cell Count
TCA	Trichloroacetic Acid
µg	microgramme
UI/ml	Unité Internationale / millilitre
µl	microlitre
µmole	micromole
USD	United States Dollars
VAL	Valcartier
v/v	volume / volume
w/v	weight / volume

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

La vie des espèces vivant sur Terre est régie par des réactions métaboliques qui, la plupart du temps, arrivent par l'entremise d'enzymes. Il en existe dans tous les corps vivants et elles sont indispensables pour la survie de ces espèces. Les réactions métaboliques impliquant les enzymes permettent aux différentes cellules d'effectuer les fonctions pour lesquelles elles existent et ceci s'applique parfaitement bien aux bactéries et aux champignons. En effet, certains organismes, à l'aide d'enzymes, peuvent dégrader des composés se trouvant dans leur environnement et ce caractère peut être utilisé par certaines industries de différents domaines.

Il existe d'innombrables voies d'utilisation des enzymes. En effet, les enzymes fongiques ou bactériennes peuvent être utilisées de bien des façons afin d'atteindre des buts souvent très différents les uns des autres. Elles sont utilisées dans l'industrie des pâtes et papiers, dans les textiles, dans les détergents, dans les tanneries, dans l'industrie alimentaire, dans celle des alcools, dans les boulangeries, dans les confiseries, dans l'industrie laitière ainsi que pharmaceutique. Il est alors possible de développer de grands marchés mondiaux de production d'enzymes. En 1998, le marché mondial des enzymes générait environ 1.5 milliard de dollars (USD) et les prédictions prévoyaient des augmentations de 2% à 25% de ce chiffre annuellement, dépendant du domaine (van Bielen and Li, 2002). Ce marché est en voie d'expansion et remplacera bientôt celui des produits chimiques qui sont, bien souvent, très polluants.

Ce projet a pour but de découvrir de nouvelles souches bactériennes mésophiles (25 °C – 35 °C) et thermophiles (+ de 45 °C) non conventionnelles, plus efficaces et qui pourront remplacer les bactéries conventionnelles. On étudiera aussi la croissance bactérienne et l'activité enzymatique des enzymes produites par ces nouvelles bactéries dans différents milieux conventionnels, et surtout alternatifs, pour voir s'il est possible de réduire les coûts de production de ces enzymes.

Ce mémoire se divise en sept chapitres qui permettent de bien comprendre les objectifs des expériences ainsi que de bien montrer les résultats obtenus. L'introduction est présentée au premier chapitre. Le deuxième chapitre se consacre aux explications relatives au fonctionnement des enzymes. Le troisième chapitre démontre l'utilité des enzymes en proposant différents

domaines d'utilisations, des applications industrielles et les avantages de les utiliser au lieu des produits chimiques. Les chapitres quatre et cinq sont constitués de deux articles, l'un sur la production d'enzymes thermostables à partir de bactéries Gram-négatives thermophiles et le deuxième sur la production d'enzymes protéolytiques à partir de bactéries Gram-positives mésophiles dans trois milieux différents, à base de soya, d'eaux usées d'usine d'amidon et de boues d'épuration de la Ville de Québec. Le chapitre 6 englobe une discussion générale sur ce mémoire ainsi qu'une brève description des expériences qui découleront des résultats obtenus avec les possibilités d'avenir. Enfin, la conclusion est présentée au chapitre sept.

CHAPITRE 2 ENZYMES

Ce chapitre traite des enzymes de façon générale, décrivant ce qu'elles sont, leurs origines, leurs rôles dans les différents endroits où il est possible de les retrouver ainsi que la façon dont leur efficacité est déterminée.

2.1 HISTORIQUE, DÉFINITION, FONCTIONNEMENT

Les enzymes ont toujours fait partie de la vie quotidienne depuis de nombreuses civilisations. En 3000 av. J.-C., les civilisations orientales étaient capables de produire de la bière et différents alcools à base de fruits et grains fermentés. C'est en 1897 que le premier article scientifique traitant de la fermentation alcoolique sans cellules de levure fut publié. Le chercheur Eduard Buchner reçut alors, en 1907, le prix Nobel de Chimie pour ses récentes découvertes (Nobel e-Museum, 2004). Mais déjà, durant le XIX^e siècle, les gens savaient que certaines réactions chimiques ne pouvaient se dérouler que dans les êtres vivants. Ce fut là le début d'une longue quête sur le savoir relié aux enzymes.

Les enzymes sont de grandes molécules, environ 10 à 1 000 kDa (Burhan et al., 2002). Ce sont d'abord et avant tout des protéines qui ont été créées par la cellule à partir du code génétique et elles sont formées par des chaînes d'acides aminés. Elles comportent des sites actifs, endroits où la réaction enzymatique se produit. La molécule ou les molécules ciblée (s) par cette enzyme s'attachent à ce site et la réaction a lieu. Les enzymes, ou **catalyseurs**, existent dans les êtres vivants afin de faciliter les réactions qui se déroulent dans les cellules. Leur fonction est souvent d'abaisser l'énergie d'activation des réactions métaboliques. Ces réactions ne se font que lorsqu'une certaine quantité d'énergie est présente et elles ne se déclencheront pas tant et aussi longtemps que ce niveau d'énergie n'est pas atteint. Comme le montre la Figure 1, le catalyseur ou l'enzyme permet d'abaisser grandement l'énergie nécessaire pour amorcer la réaction métabolique. Sans l'enzyme, l'énergie d'activation nécessaire pourrait s'avérer trop élevée pour que la réaction se produise ce qui démontre la nécessité de l'enzyme.

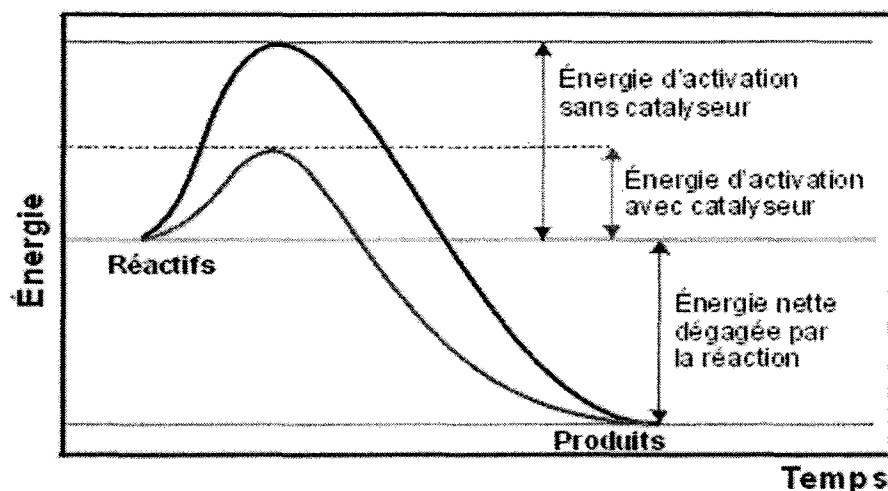


Figure 1. Comparaison entre l'énergie d'activation d'une réaction métabolique avec et sans catalyseur (enzyme) (Biologie, Cégep Ste-Foy, 2004).

Il arrive souvent que des cofacteurs ou apoenzymes soient nécessaires. Ils peuvent servir à la liaison du substrat sur l'enzyme, à transformer la morphologie de l'enzyme pour permettre cette liaison ou tout simplement à transférer un ion vers le substrat ou en capter un de celui-ci. Les cofacteurs n'ont aucune activité catalytique, ils n'existent que pour aider l'enzyme à faire la réaction.

En plus des cofacteurs, il existe aussi des inhibiteurs qui peuvent empêcher les réactions enzymatiques de se produire. Ces inhibiteurs peuvent être compétitifs ou non compétitifs. Les compétitifs sont ceux qui prennent directement la place du substrat de l'enzyme dans le site actif, là où se fait la réaction. Cela empêche la liaison du substrat sur l'enzyme et celle-ci ne peut plus effectuer la réaction avec le substrat. Les inhibiteurs non compétitifs sont des substances métaboliques qui se lient à l'enzyme mais pas au site actif. Ces liaisons entraînent la déformation du site actif, ce qui empêche le substrat de l'enzyme de s'y lier. De plus, les produits de la dégradation du substrat par l'enzyme agissent souvent comme inhibiteurs. Effectivement, la production d'enzymes par une bactérie peut être constitutive, c'est-à-dire que la bactérie produit cette enzyme continuellement sans tenir compte du milieu environnant. Cette production peut aussi être induite. Lorsqu'un élément essentiel à la croissance est entièrement consommé, la bactérie va commencer à produire une nouvelle enzyme qui pourra libérer cet élément à partir des différentes substances se trouvant dans le milieu environnant de la cellule. Lorsque l'enzyme

produite par induction crée des produits à partir du substrat de l'enzyme, de grandes quantités de ces produits peuvent inactiver la production de l'enzyme directement sur les gènes (promoteur, opérateur, site de l'inhibiteur). Si la production d'enzymes est régie par les gènes, ces derniers ne permettront pas leur production tant et aussi longtemps que l'enzyme n'est pas nécessaire pour aller chercher les éléments essentiels dans le milieu. L'activation des gènes de production d'enzymes se fera seulement lorsque les enzymes seront nécessaires.

2.2 SORTES ET SOURCES D'ENZYMES

Il est possible de retrouver les enzymes dans une gamme variée d'endroits. En fait, tous les êtres vivants contiennent des enzymes dans leurs cellules. Que ce soit chez les humains, les animaux, les insectes, les végétaux ou les organismes microscopiques comme les bactéries, les levures ou les champignons, les enzymes y sont présentes sous bien des formes et bien des types. Il y a les protéases, les amylases, les lipases, les phytases, les cellulases, les hémicellulases, les mannanases, les laccases, les lactases et bien d'autres qui ne sont pas nommées (Ole et al., 2002; Sharma et al., 2002). Les protéases sont de loin les enzymes les plus produites et utilisées dans l'industrie de nos jours. Tel que mentionné plus haut, les enzymes industrielles sont principalement produites par des microorganismes. Il est toujours possible d'en produire avec des cellules animales ou végétales mais ces techniques sont longues, difficiles, fastidieuses et variables durant l'année. En effet, la culture de cellules animales est très complexe et elle ne se fait généralement qu'en petites quantités. Les cellules animales sont longues à faire croître et les conditions de cultures sont très coûteuses. Pour ce qui est des cellules végétales, il est possible d'en produire en grandes quantités à l'aide de cultures maraîchères mais comme la majorité des pays du monde ont des saisons assez variables, les changements de température ne permettent pas une production stable durant toute l'année. C'est pourquoi la recherche sur la production d'enzymes s'effectue surtout au niveau des microorganismes. De nos jours, 50 % des enzymes de fermentation sont produites par deux souches de bactéries, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus licheniformis*, et 30 % par les moisissures *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae* (Meunier, 1999). Ces microorganismes sont faciles à faire croître, avec une vitesse de croissance très supérieure à celle des cellules animales et végétales. Leurs besoins sont faciles à combler et l'extraction des enzymes se fait plus facilement. L'un des gros avantages est que ces microorganismes sont réutilisables. Ils se

multiplient d'eux-mêmes ce qui rend la production plus efficace et moins préoccupante. Par conséquent, il est possible, puisque la croissance est si simple et si rapide, de commencer la production d'enzymes et de la laisser fonctionner quelques heures sans surveillance pour ensuite arrêter le tout et récolter les enzymes se trouvant dans le mélange.

2.3 MESURE DE LA FORCE ENZYMATIQUE

Il est possible de mesurer l'activité enzymatique d'une solution contenant une ou des enzymes. Cette mesure donne l'efficacité de l'enzyme (quantité de substrat transformé) sur un substrat donné, pour une période de temps définie. Cela est assez complexe, car il y a plusieurs facteurs à considérer mais le principe de base est simple. Une enzyme permet de transformer un substrat initial en un produit final différent de ce substrat initial. L'enzyme est mise en contact avec le substrat de départ, et ce, pendant une période définie à l'avance. À la fin de ce temps, il faut calculer la quantité de substrats transformés en mesurant le produit final. Plus une enzyme est efficace, plus elle peut transformer le substrat rapidement. Par la suite, il s'agit de comparer différentes enzymes selon les mêmes paramètres de départ pour déterminer si l'une est meilleure que l'autre

CHAPITRE 3 INDUSTRIE ENZYMATIQUE

Le chapitre 3 traite des protéases, les enzymes les plus utilisées, et dans quelles industries elles sont utilisées.

3.1 LES PROTÉASES

La première protéase fabriquée industriellement fut la Takadiastase, trouvaille du chercheur Takamine en 1890. C'est une protéase produite par *Aspergillus oryzae* sur un milieu à base de blé comparativement aux méthodes traditionnelles de l'époque qui étaient sur du riz (Sadek, 2000). Cette enzyme servait surtout dans l'industrie textile et les tanneries de l'époque.

De nos jours, les protéases sont le plus souvent utilisées dans l'industrie des détergents. La Subtilisine en est l'un des meilleurs exemples. Les protéases en général représentent 35 % du marché mondial des enzymes (Cherry et Fidantsef, 2003). Depuis le début de l'utilisation des enzymes dans les industries, l'ADN (ou l'ARN) des bactéries a été modifié par ingénierie génétique, par mutation des souches microbiennes ou tout simplement en suivant l'évolution d'une même enzyme au sein de la bactérie jusqu'à l'obtention d'une meilleure efficacité, et ainsi de suite.

Les enzymes de type protéases sont utilisées dans l'industrie des détergents comme agents nettoyants. Les taches sur les vêtements peuvent être différentes au point de vue de plusieurs caractéristiques. En effet, les taches sont souvent composées de terre, d'huile, de lipides, de particules ou de matières organiques. La majorité de ces composés peut être lessivée par le nettoyage de base, c'est-à-dire, la chaleur de l'eau, l'alcalinité, l'agitation ou bien les agents surfactants. Par contre, certaines protéines de la matière organique peuvent se lier très fortement aux fibres du tissu qui peuvent être impossibles à détacher. C'est là que les enzymes protéolytiques entrent en jeu. Elles peuvent briser les liens entre le tissu et les protéines tachantes (Meunier, 1999) ce qui permet aux matières organiques de se détacher des fibres du tissu et ainsi redonner une apparence propre.

3.2 UTILISATION DES ENZYMES

3.2.1 Ingénierie enzymatique

Avec l'avancement des sciences et l'invention de nouvelles techniques d'analyses (diffraction par Rayon-X ou par résonance magnétique nucléaire), il est possible de mieux visualiser les différentes conformations des enzymes industrielles utilisées. Jusqu'à récemment, les enzymes étaient généralement modifiées naturellement, par évolution moléculaire. Il fallait attendre qu'elles subissent des transformations d'elles-mêmes et vérifier si la nouvelle structure donnait une enzyme plus efficace ou non. À l'heure actuelle, plusieurs laboratoires de recherche travaillent sur des modifications non naturelles de ces mêmes enzymes. Il est possible de modifier une enzyme bactérienne, par exemple, en introduisant une ou des mutations dans les gènes de production des enzymes et ensuite tester la variation de l'activité enzymatique. La mutation d'autres gènes permettrait l'amélioration de l'enzyme. Modifier, dans la paroi, les protéines responsables du transport des protéases vers l'extérieur peut aussi augmenter leur efficacité non pas en termes de qualité mais en termes de quantité. Plus la cellule est apte à excréter rapidement les protéases vers l'extérieur, plus l'effet sur le milieu se fera sentir rapidement et fortement. Les substances complexes du milieu pourront être dégradées en plus grandes quantités en moins de temps. Il est aussi possible de modifier les enzymes chimiquement, en introduisant de nouveaux métaux dans leur structure ou bien en modifiant les cofacteurs qui ont bien souvent une structure beaucoup plus simple que l'enzyme elle-même. Toutes ces modifications permettent souvent de changer l'activité enzymatique d'une enzyme et même de lui donner de nouvelles propriétés (van Bielen et Li, 2002). Le but de toutes ces expériences est souvent d'améliorer l'activité enzymatique de l'enzyme. Une méthode plus naturelle pour modifier la réactivité de l'enzyme est de la faire produire dans une autre espèce. Il est possible de transférer un gène producteur d'enzyme d'une espèce bactérienne vers une autre. En effet, les plasmides sont de bons transporteurs de gènes. Le gène en question, provenant de l'espèce A, peut être introduit dans un plasmide qui pourra ensuite « infecter » l'espèce B. Ceci ne résulte pas en la transformation de l'enzyme elle-même, mais souvent l'espèce B est choisie parce qu'elle possède une meilleure machinerie métabolique, ce qui pourrait mener à une production accrue de l'enzyme dans le milieu extracellulaire. Il ne faut pas oublier non plus que sur Terre, une infime partie de la flore microbienne a été découverte et que bien d'autres

microorganismes restent encore à être découverts. Ainsi, il est possible de supposer que, pour chaque composé dégradable ou difficilement dégradable qui existe, il y a sûrement un microorganisme quelque part qui peut grandement améliorer sa dégradation.

3.2.2 Techniques de production

La production de l'enzyme en tant que telle est l'une des parties les plus importantes. Pour que le projet soit acceptable, la production doit être efficace : les enzymes doivent avoir un bon pouvoir enzymatique, la méthode de production doit être peu coûteuse et l'enzyme doit être facilement récupérable (Meunier, 1999). Il existe différentes techniques de fermentation qui peuvent être utilisées. La fermentation liquide se fait dans un milieu composé en grande partie d'eau. L'utilisation d'un milieu de culture synthétique apporte tous les éléments essentiels à la croissance des microorganismes. Ces derniers sont continuellement en mouvement grâce à des systèmes d'agitation. Pour les microorganismes aérobies, l'aération et l'agitation leur permettent d'être toujours en contact avec l'oxygène. Cette méthode de production est assez efficace puisqu'il est possible de la faire dans de très grands volumes, comme des fermenteurs de plusieurs milliers de litres. Par contre, l'utilisation de milieux synthétiques rend cette technique plutôt inutilisée car ces milieux sont très dispendieux. C'est pourquoi certains groupes de chercheurs se penchent sur la possibilité de produire des enzymes microbiennes dans un milieu alternatif très peu coûteux. Les eaux usées et les boues d'épuration municipales et industrielles en sont d'excellents exemples. Ces nouvelles technologies sont encore à l'état embryonnaire mais beaucoup de travaux y sont consacrés. Il est donc à prévoir que d'ici 10 ans, les enzymes microbiennes pourront être produites en grandes quantités dans des rejets municipaux et industriels et ce, à faible coût, tout en aidant à recycler ces rejets et à diminuer les différentes sources de pollution. Après les fermentations, les protéases sont extraites du bouillon fermenté pour être ensuite utilisées. Le bouillon restant peut être utilisé dans divers domaines. Il peut servir de fertilisant dans les champs de cultures, comme matériaux de construction ou être réutilisé dans d'autres procédés de fermentation. Ces voies de disposition sont moins polluantes, car les microorganismes ont la capacité de transformer des produits polluants contenus dans les boues en des produits de dégradations moins ou pas du tout polluants et puisque les boues d'épuration respectaient les normes avant leur utilisation, elles les respectent aussi après. Elles sont même plus biodégradables qu'auparavant grâce à l'action des microorganismes.

D'autres types de production peuvent être utilisés. La fermentation solide utilise un milieu nutritif, qui peut être à base de soya. Ces milieux doivent ressembler plus à une pâte qu'à un milieu liquide qu'il est possible d'agiter. Ils ont des concentrations en solides totaux de l'ordre de 55 % (Germano et al., 2003) et ils sont placés dans des fioles Erlenmeyers pour les réactions en petits volumes, mais ils peuvent aussi être placés dans des fermenteurs pour milieux solides. Comme le milieu synthétique est très dispendieux, il est possible d'utiliser des matières résiduelles comme les restants de cultures agricoles. Les tiges de maïs peuvent être un excellent milieu de culture pour différents microbes, que ce soit des bactéries ou bien des champignons. Il est ainsi possible d'utiliser des matières que l'on retrouve en grandes quantités dans les régions agricoles afin de produire des enzymes utilisables dans les diverses industries.

3.2.3 Récupération des enzymes

La récupération des enzymes est probablement la partie la plus complexe de tout le processus de production des enzymes. Il est difficile de les séparer du milieu de production en utilisant des filtres puisque ce sont des molécules et le processus prendrait plusieurs étapes. Par contre, il existe diverses méthodes qui peuvent être utilisées en combinaison pour améliorer la récupération sans que les coûts soient trop importants. La méthode la plus courante est celle de la centrifugation (Ferrero et al., 1996). Il s'agit de séparer les enzymes en solution du milieu de culture solide. Par la suite, il est possible de filtrer cette solution sur des filtres qui ne retiennent que les molécules ciblées. Un filtre avec des pores plus gros que la molécule ciblée retiendra les molécules plus grosses, mais laissera passer les molécules recherchées ainsi que les plus petites. Le filtrat peut ensuite subir le même traitement, mais le filtre utilisé a des pores plus petits que la molécule recherchée. Ceci permet d'isoler, sur le filtre, la molécule voulue. Tout dépendant de l'enzyme recherchée, différents formats de filtres devront être utilisés. *Bacillus stearothermophilus* peut produire des enzymes avec un poids de 48 et 59-68 kDa (Srivastava, 1987; Ben et al., 2001), *Bacillus* MO A-40-2 avec un poids de 70 kDa (Horikoshi, 1971), 101 kDa pour *Bacillus clausii* (Duedahl-Olesen et al., 2000) ou bien 159 kDa pour *Bacillus* sp IMD 370 (McTigue et al., 1995). Le poids moléculaire des enzymes recherchées déterminera le calibre du filtre à utiliser pour la séparation des enzymes. La solution ainsi filtrée devrait contenir une grande majorité d'enzymes de toutes sortes, qui ont environ le même poids

moléculaire. Durant ces différentes étapes, il est possible d'ajouter des ions comme du NaCl (Germano et al., 2003) ou bien de l'acétone (Johnvesly et Naik, 2001) afin d'aider à faire précipiter les solides pour ne conserver que les enzymes dans la solution centrifugée et filtrée. Ces méthodes sont toutefois très coûteuses lorsqu'il s'agit de produire des enzymes en grandes quantités. Par conséquent, il faut prévoir que d'ici les prochaines années, de nouvelles méthodes devront être instaurées afin de réduire ces coûts, qui nuisent à l'implantation des enzymes en industrie. Des filtres de type colonnes d'affinité pourraient ainsi voir le jour et être assez efficaces, réutilisables et peu coûteux pour être facilement utilisés en industrie.

**CHAPITRE 4 ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF
PROTEASES PRODUCED BY PROTEOLYTIC
STRAINS**

Article 1

**Présenté par
Jean Philippe Chenel**

**Mémoire présenté pour l'obtention d'un grade de
Maîtrise en Sciences de l'eau (M. Sc.)**

**Directeur de recherche
Professeur Rajeshwar D. Tyagi**

**INRS-ETE
Janvier 2005**

4.1 RÉSUMÉ

Un mélange de boues d'épuration de trois stations de traitement des eaux municipales (Black Lake, Jonquière et la Communauté Urbaine de Québec) fut utilisé pour l'isolement de souches bactériennes thermophiles productrices d'enzymes protéolytiques. Leur isolement s'est fait sur des géloses nutritives et leur incubation à une température de 50 °C pendant 24 heures. Des repiquages sur d'autres géloses nutritives ont permis d'obtenir quatre souches thermophiles pures. Leur identification s'est faite à l'aide de galeries API. L'incubation de pétris à la gélatine nutritive à 50 °C a permis de trouver que trois des quatre souches thermophiles étaient aussi protéolytiques. Plusieurs expériences en fioles Erlenmeyers de 500 ml ont permis de déterminer que les trois souches avaient une température optimale de croissance de 50 °C et une température de stabilité enzymatique optimale de 60 °C. Des cultures en fermenteurs de 15 l (volume de travail de 10 l) en milieu synthétique furent effectuées à une température de 50 °C pendant 48 heures. Des activités enzymatiques maximales de 2.40, 1.42 et 5.25 UI/ml furent trouvées pour les trois différentes souches en mesurant la tyrosine libérée.

4.2 ABSTRACT

Protease producing thermophilic bacterial strains were isolated from a mixture of wastewater sludge from three different sources (Black Lake, Jonquière and Communauté Urbaine de Québec). The strains were isolated on nutrient agar plates with an incubation period of 24 hours. To obtain pure cultures, each new different colony was subcultured on a fresh nutrient agar plate and incubated at the same conditions until pure colonies were obtained. Four pure strains were found. The identification of the isolated strains was made with API galleries test. Each type of strains was incubated on a nutrient gelatine plate at 50 °C to determine their potential for protease activity and three of the strains showed enzymatic activity. Shake flask experiments showed that the three strains had optimal growth at temperature 50 °C and enzymatic stability at 60 °C. The protease production potential of the strains was also tested in bench scale fermentor (working volume 10 l) utilising soy based synthetic media, at optimum temperature of 50 °C. The maximum protease activity obtained (measure of tyrosine released) was in the range of 1.42 – 5.25 IU/ml.

4.3 INTRODUCTION

Among the industrial enzymes, proteases constitute about 40 % of the bulk market (Sharma et al., 2001) of detergent industry, textile, paper and leather which represent about 65% of the global demand (Cherry and Fidantsef, 2003). To improve detergent performance, many kind of proteases are mixed together to obtain the best efficiency. Recently, new-engineered versions of the traditional proteases were created to serve as better substitutes to conventional detergents (Ole et al., 2002). Proteases are also employed in other industries: leather preparation, protein recovery or solubilization, meat tenderization and organic synthesis (Cowan, 1996).

Most of the industrially used enzymes are derived from bacterial sources that offer many technical advantages compared to animal cells culture, such as ease of genetic manipulation and lower production cost. Most of the enzymes producing bacteria are Gram-positive like *Bacillus sp.* and they produce a large amount of industrial important enzymes (Burhan et al., 2003). Majority of industrially used bacterial cultures for the production of enzymes are isolated from natural sources. Municipal wastewater sludge also encompasses a large spectrum of potentially useful microbial flora (Siebert and Toerien, 1968). Therefore, these sludges can provide a potential source of thermo-tolerant bacterial strains, which under optimal physiological conditions, can produce proteases with high yield and thermostability (Banerjee et al., 1999; Johnvesly and Naik, 2001). Proteases produced by these thermostable bacteria can resist high temperature and pH variations or effect of denaturing agent (Johnvesly and Naik, 2001). These bacteria can also grow in a complex medium to produce a great amount of proteases (Takami et al., 1989; Takii et al., 1990; Manachini et al., 1998; Banerjee et al., 1999; Gessesse and Gashe, 1997). It is possible to isolate Gram-positive strains like *Bacillus sp.* and Gram-negative bacteria that can produce enzymes from alternative sources. These sources could be municipal or industrial wastewater and wastewater sludge with or without different treatments like anaerobic and aerobic digestion or thickening processes.

The present studies are, therefore aimed at isolating new thermophilic strains of bacteria from wastewater sludge for production of protease, optimization of the bioprocess parameters and enzyme characterisation for thermostability.

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1 Microbial growth media

- Nutrient agar : 0.3% beef extract (Difco), 0.5% casein peptone (Difco), 1.5% bacto-agar (Fisher), deionised water, pH : 7.0 ± 0.1 and sterilized at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 minutes
- API galleries (BioMérieux) : API 20 E, identification of Gram-negative bacteria
- Nutrient gelatine (Difco) : 0.3% beef extract, 0.5% casein peptone, 1.5% gelatine, deionised water, pH : 7.0 ± 0.1 and sterilized at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 minutes
- Synthetic medium (S.M.) (Vidyarthi et al., 2002) : 1.5% Soya flour, 0.5% dextrose, 0.5% corn starch, 0.1% KH_2PO_4 , 0.1% K_2HPO_4 , 0.03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.1% CaCO_3 ; pH: 7.0 ± 0.1 and sterilized at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 minutes

4.4.2 Experimental Methods

4.4.2.1 Collection of sludge samples

Sludge samples were obtained from three different locations: municipal wastewater treatment plants of Jonquière, Black Lake and Communauté Urbaine de Québec. Sludge samples were stored in a cold chamber at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for future use (about two weeks to minimise degradation).

4.4.2.2 Isolation of new bacterial strains

The bacterial strains were isolated from three wastewater sludges: Jonquière, Black Lake and Communauté Urbaine de Québec, which are mixed in the ratio of 1:1:1. 100 μl of the mixture was used to inoculate directly on nutrient agar without dilution and incubated at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 hours to favour growth of thermophilic bacteria. There was a mixture of bacterial growth on plates, which was successively isolated in purified form by repeated subculture until the purified colonies were obtained. It was not important to know the respective source of sludge for each bacteria, this is why sludges were mixed at the beginning.

4.4.2.3 Screening and identification of proteolytic strains

Four pure cultures were inoculated on nutrient gelatine medium and incubated at 50 °C for 48 hours. Later, plates were refrigerated at 4 °C for two hours. On cooling to 4 °C from 50 °C, non-hydrolysed gelatine turned into solid but hydrolysed gelatine was remained liquid showing the presence of proteolytic enzyme. Subsequently, identification of bacterial isolates was made with API galleries method (BioMérieux, 2004).

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

To determine the optimal temperature for bacterial growth and enzyme production, the bacterial isolates were inoculated to 100 ml of culture medium in 500 ml Erlenmeyer flasks and incubated for a period of 24 hours at 40, 50 and 60 °C in an orbital incubating shaker at 200 rpm. Samples of 0.5 ml were drawn at three hours intervals to determine viable cell count and protease activity.

To determine the optimal temperature for enzyme activity, broth samples (grown at 50 °C) were drawn at the end of 24 hours and enzyme activity was determined at 40, 50, 60 and 70°C. The enzyme activity test was performed by the Kunitz method (Kunitz, 1947), but with the temperatures between 40 °C and 70 °C. Enzyme assay is explained in a subsequent section.

4.4.2.5 Total Cell Count (TC)

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

4.4.2.6 Bacterial growth and enzyme production in fermentor

Inoculum: Inoculum of the three proteases positive isolates was prepared in triplicate in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml S.M at 50°C, 250 rpm, for 16 hours in an incubator (Gallenkamp). A 200 ml of inoculum was used to inoculate 15 l fermentors (10 l working volume).

Fermentation procedure: Fermentation experiments were conducted in a 15 l bench scale bioreactor equipped with accessories and automatic control systems for dissolved oxygen, pH, antifoam, agitation speed, aeration rate and temperature. The computer program (Fix 3.5, Intellution, USA) was used to allow automatic operation of fermentor with the set-point control and monitoring of all stated parameters.

Before sterilisation, the pH probe (Mettler Toledo, USA) was calibrated with the pH 4 and 10 buffers (VWR-Canada). The oxygen probe was calibrated to zero (0%) with a N₂ degassed water bottle. The 100% calibration was done with air-saturated water bottle. These steps were done before sterilisation.

The fermentor was filled with 10 l S.M., 10 ml of polypropylene glycol (PPG) (Sigma-Canada) (0.1% v/v) solution as an anti-foam agent. The fermentor was sterilized in situ at 121 ± 1 °C for 30 minutes with all the medium ingredients except for dextrose and MgSO₄, which were sterilized separately. After sterilisation, the fermentor was cooled to 50 °C and the dextrose and MgSO₄ solution was added aseptically. Dissolved oxygen (DO) probe was recalibrated to 0% by the injection of N₂ gas and 100% saturation by air injection (3.00 l/min) and agitation rate was set at 400 rpm.

The fermentation was conducted at pH 7.0 (controlled automatically by using 2N NaOH or 2N H₂SO₄) and at a temperature of 50 °C for 48 hours. The dissolved oxygen level was kept above 20% of saturation by varying agitation speed (300-500 rpm) and airflow rate (2.0–5.0 l/min). This ensured that the DO level above critical for protease production (Avignone-Rossa et al., 1992; Abdel-Hammed, 2001; Zouari et al., 2002). Foam was controlled by addition of a small quantity of sterile PPG solution and by mechanical foam disruptor (Fundaf foam™). Ten ml

samples were drawn aseptically during fermentation at three hours interval and stored at 4 °C until analysis.

4.4.2.7 Proteolytic assay

Enzymatic assay was carried out by the modified Kunitz method (Kunitz, 1947). Each sample was centrifuged in 2ml Eppendorf tubes at 7650 g and 4 °C for 20 minutes. The supernatant fluid was diluted (1/5 or as deemed appropriate) in borate buffer (pH 8.2) depending on the fermentation time and concentration of enzyme in the sample. The enzyme solution was stored at 4 °C to avoid enzyme deterioration.

For the protease activity assay, 5 ml of casein solution (1.2% casein in borate buffer pH 8.2) was incubated in a shaker water bath for 5 minutes at 60 °C. One ml of the diluted enzyme sample was added to the casein solution and incubated for 10 minutes at 60 °C. The reaction was terminated by adding 5 ml of trichloroacetic acid (TCA) and the solution (total volume of 11 ml) was left for 30 minutes in a water bath. A blank (control) sample was also prepared by the addition of TCA prior to the enzyme addition. All samples and blanks were filtered with a vacuum pump and using 0.45 µm filter. The absorbance of the filtered samples was measured at 275 nm. The protease activity was calculated in terms of International Units per millilitres (IU/ml) of the sample as follows:

$$PA(IU / ml) = \frac{Conc. Tyr. (\mu mole / L)}{10 \text{ min.} \times 10^3 \text{ mL}} \times 11 \text{ mL} \times \text{Dilution Factor} \quad \text{Equation 1}$$

One IU of enzyme hydrolyses casein to release 1.0 µmole (0.181 µg) of tyrosine in one minute at pH 8.2.

The optimal temperature for enzyme activity was measured by conducting the enzymatic assay at different temperatures (40 to 70 °C).

4.5 RESULTS AND DISCUSSION

4.5.1 Isolation of proteolytic strains

Four new strains of bacteria were isolated from the mixture of municipal wastewater sludges. These strains were found to be thermophilic as they showed excellent growth at 50 °C and after 16 hours of incubation, nutrient agar medium showed large sized colonies. Strains were named as: AC, B, D and E.

Gelatine hydrolysis test further confirmed the production of proteolytic enzymes which helped to isolate three (AC, B and D) protease producing strains from sludge.

Preliminary experiments showed that these three strains were to be of Gram-negative bacteria (non-spore forming) in contrast to conventional enzyme producing strains that are Gram-positive bacteria (spore-forming) (Banerjee et al., 1999; Anwar and Saleemuddin, 1998; Balaban et al., 2003; Beg et al., 2002, 2003; Ben et al., 2001; Bhat, 2000; Burhan et al., 2003; Cheetham, 1998; Duedahl-Olesen et al., 2000; Ferrero et al., 1996; McTigue et al., 1995; Mehrotra et al., 1999; Priest, 1977; Sharipova et al., 2002; Srivastava, 1987; Takami et al., 1989). Further API galleries tests confirmed the three strains AC, B and D to be *Enterobacter*, *Aeromonas* and *Bordetella* species, respectively. However, detailed identification experiments (16S rRNA, fatty acids profile) to be carried out to specifically identify these strains.

4.5.2 Shake flask studies

Figure 2 a), b) and c) showed the growth profiles of the three different strains AC, B and D, respectively, at three temperatures (40, 50 and 60 °C) for 48 hours fermentation in S.M along with their pH profiles. As is evident from Figure 2 a), 50 °C was found to be the optimal growth temperature for AC strain. Indeed, there was a higher cell growth at 50 °C. The growth profile at 40 °C followed the same pattern as 50 °C, but the Total Cell Count (TC) was lower and even had a slower growth rate. Meanwhile at 60 °C, there was a longer lag phase and the total cell count was lower at 10^6 in contrast to 10^7 CFU/ml at 40 and 50 °C, respectively. Normally, thermophilic bacteria can tolerate a temperature range of 45 to 70 °C (Deacon, 2004), but the maximum for these bacteria was around 50 °C. High temperature can inactivate important enzymes in bacterial

cell division like DNA polymerase and all the enzymes used in DNA duplication (Snyder and Champness, 1997). These strains are aerobic and need a dissolved oxygen concentration (DO) superior to 20% (Beg et al., 2002). At this concentration, the growth rate was lower as there was not enough oxygen in contact with the bacteria. It is not possible to conduct shake flask experiments at single DO as environmental conditions are uncontrollable (van Suijdam et al., 1978). Supposition was made that at 60 °C, DO drops under the limit of 20% because oxygen is less soluble at higher temperatures (Zumdahl, 1998). So, lower growth of AC strain at 60 °C may be due to a lack of dissolved oxygen in the medium.

Similar growth profiles were observed for B and D strains (Figure 2 b) and c)) with optimum temperature at 50 °C. Growth rate and maximum total cell count are higher at this temperature than at 40 and 60 °C. Also, 60 °C showed the least TC of the three strains.

Another important parameter that influences the growth rate is pH (Takami et al., 1989; Ferrero et al., 1996). pH regulates metabolic reactions by affecting ionization and nutrient availability. pH also influences the solubility of many nutrients that are required for bacterial growth (Faletra, 2004). Shake flask experiments are normally run under uncontrolled pH conditions. As seen in Figure 2 a), b) and c), pH varied from initial 7 to 8.5 during 27 hours of fermentation. These variations were depended on the bacterial strain, but each curve followed the same pattern. A decrease in pH during exponential phase was attributed to production of organic acids; and pH increased in the stationary phase as organic acids were being consumed resulting in production of CO₂ and other components. Earlier experiments carried out in an effort to maintain pH at optimal level have failed and results were not conclusive (Meunier, 1999). It was showed that the use of buffers lead to a drop in proteolytic activity. Indeed, borate buffer can maintain pH at the right level (7 ± 0.2) but it reduced the proteolytic activity contrary to a phosphate buffered saline (PBS) which kept proteolytic activity at the same level but was unable to maintain pH (± 1.1). Therefore, control of pH using buffer was not adopted in these experiments and conditions of non-controlled pH were used for the three strains. However, pH was controlled in bench scale study as discussed later in section 4.5.5.

4.5.3 Proteolytic activities in shake flasks

Figure 3 shows proteolytic activity profiles of the three bacterial strains (AC, B and D) for 48 hours fermentation in 500ml shake flasks. AC strain showed highest protease activity of 3.2 IU/ml at 40 hours fermentation time. For B and D strains, maximal proteolytic activities, 2.1 and 0.3 IU/ml, were respectively reached after 32 and 48 hours respectively. Knowing that DO and pH were not controlled in shake flasks and that they are important factors for protease production, it was normal to obtain lower values in shake flasks (Ferrero et al., 1996; Takami et al., 1989; van Suijdam et al., 1978). However, shake flask experiments are very useful to establish basic process conditions and they are very easy to handle (van Suijdam et al., 1978; Calam, 1986; Büchs, 2001) making it easier to conduct further scale-up studies. Hence, the experiments were further performed in bench scale fermentor to ascertain the maximum level of protease activity obtained.

4.5.4 Protease activity and optimum temperature

Figure 4 shows the variation of proteolytic activity of all strains tested at different temperatures. Proteolytic assays were done on 24 hours fermentation samples of each bacterial strain. Out of the four temperatures tested (40, 50, 60 and 70 °C), 60 °C was optimal for maximum enzyme activity of these proteases irrespective of strain. High thermostability enzymes are more viable and have a better efficiency (Banerjee et al., 1999; Burhan et al., 2003; De Azeredo et al., 2004; Ferrero et al., 1996; Gupta et al., 2002a; Manachini et al., 1998; Takami et al., 1989). Activity of these proteases decreased at a temperature of 50 °C. At higher temperature of 70 °C, the proteolytic activity was also lower. It is a well known fact that at higher temperatures, proteins change their conformations or are degraded (Durham et al., 1987; Gessesse and Gashe, 1997; Johnvesly and Naik, 2001) and hence a decrease in protease activity was observed. Thus, the optimal temperature for growth and enzyme activity was same for all the strains and probably may be due to similar characteristics of proteases produced by three different strains.

4.5.5 Bench scale study

Figure 5 a) and b) shows bench scale fermentor study profiles of different strains with respective DO, TC and PA patterns. As seen in Figure 5 a), the total cell count increased up to 10^8 for B

strain, 10^9 for AC strain and almost 10^{10} for D strain. These cell counts are much higher than in shake flask experiments (Figure 2) and this growth can be further correlated with DO patterns of different strains. As is evident from Figure 5 a), at 8 hours, DO dropped under the optimal limit of 20% when the exponential phase of all the three strains ended. Later, between 24 and 30 hours, DO levels increased up to 20% for two of the three strains, B and D. This resulted in a second exponential phase for 2 to 3 hours. Only the AC strain did not enter the second exponential phase and this reflects different characteristics of these strains. In this figure, sporadic peaks of DO were due to augmentation of agitation or aeration when the DO dropped.

There was a significant difference between shake flasks (Figure 3) and bench scale (Figure 5, b)) experiments. Strain D showed lower proteolytic activity in shake flasks experiments, however, the activity appreciably increased in fermentor. Hence, bench scale fermentor experiments were necessary to establish exact protease activity of the strains. Further, in literature, scale-up studies have shown better results due to controlled environmental conditions (Herbst et al., 1992; Hempel and Dziallas, 1999). AC and B strains had maximum proteolytic activity of 2.4 and 1.4 IU/ml respectively but in shake flasks experiments, their maxima was higher at 3.2 and 2.1 IU/ml for the same strains in shake flasks. The scale-up to stirred fermentor of the D strain showed increase in proteolytic activity from 0.3 IU/ml to 5.3 IU/ml. Thus, growth and protease production conditions were better in fermentor than in shake flasks for this strain and also DO transfer was lower in shake flasks during the exponential phase in contrast to fermentor permitting higher proteolytic activity (Hamed et al., 1999).

This study resulted in isolation of new thermophilic Gram negative bacterial strains producing proteolytic activities in significant amounts in conventional medium. Henceforth, extensive studies will be carried out by testing the growth of these strains on non-conventional, ubiquitous and cheaper substrates to reduce the production costs. This will enhance the potential of these strains yielding market savvy enzymes. The application of proteases in detergent, leather or pulp and paper industries will be a good way to replace chemical products and mitigate environmental stress. Further experiments are needed to optimize medium and culture parameters. Wastewater and wastewater sludge could be used as a raw material to support proteases production (Tyagi et al., 2002) as complex medium that may induce stronger enzyme production in quality and quantity. Further, sludges comprises of a large amount of complex and simpler substrate as well.

Hence, microbial enzyme secretion is must to break-down these complex for their growth and energy. Moreover, these strains have been isolated from sludge and they are well adapted to sludge environment and they may produce more enzyme in this medium.

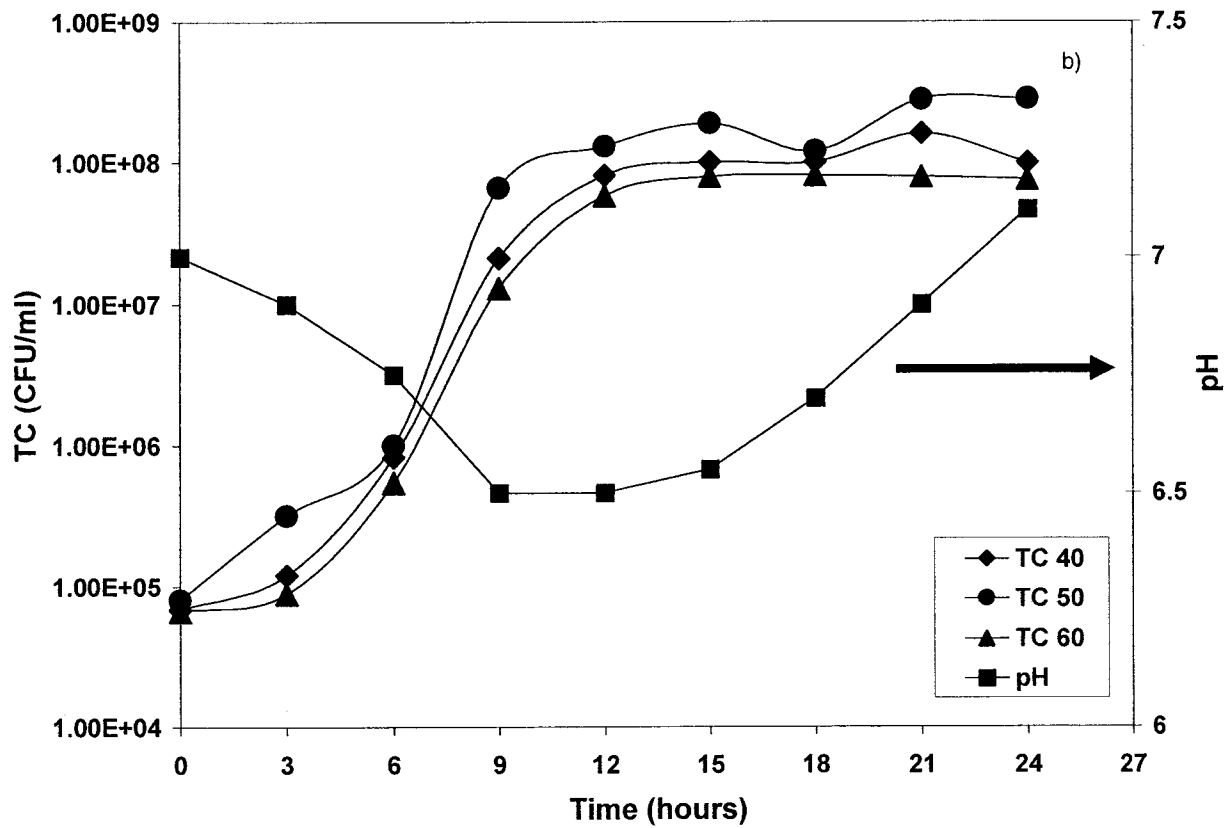
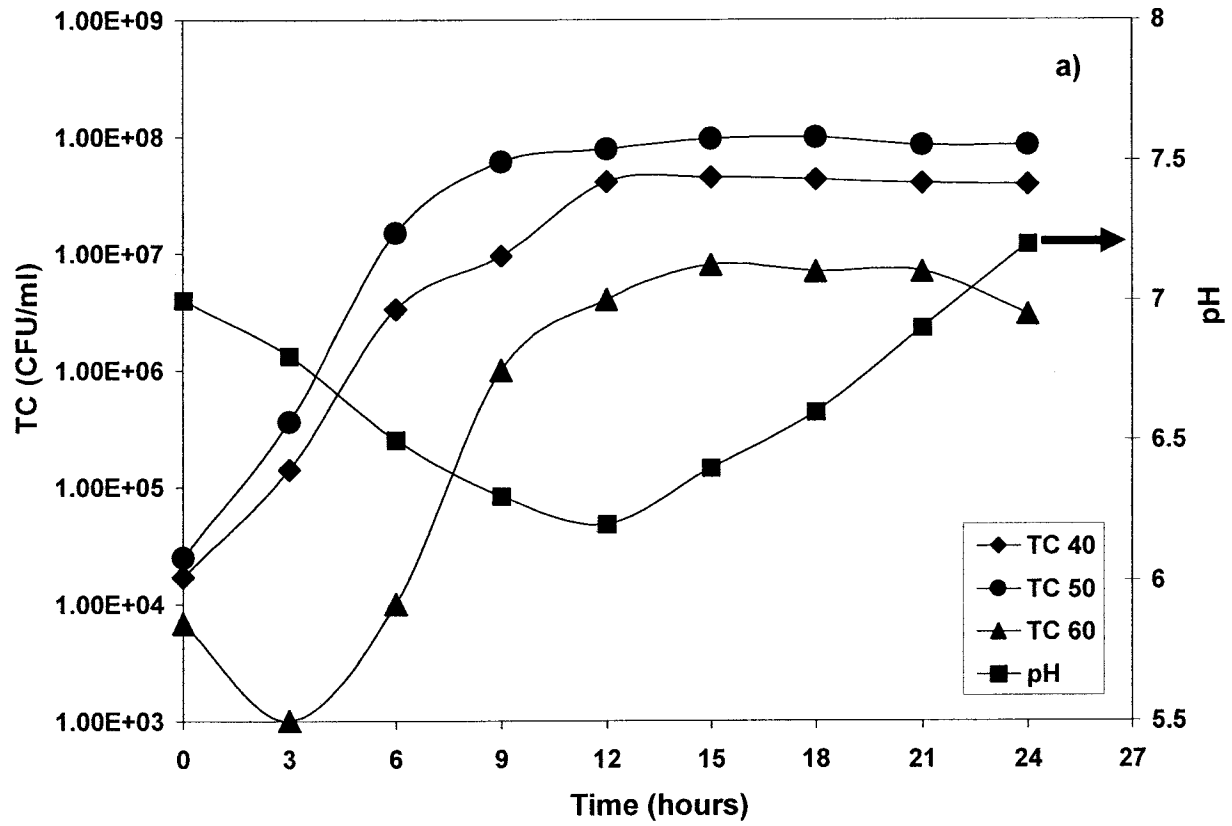
It is also necessary to point out that DO levels decreased during these experiments below the critical concentration and altered the enzyme activity profiles for the three strains. This warrants testing of growth of three strains at DO levels above critical level. Since at 60 °C, it is difficult to control DO levels due to low solubility of oxygen, it is suggested that pure oxygen should be used to maintain the DO level at a desired concentration.

4.6 CONCLUSION

In this study the following conclusions were drawn:

1. Wastewater sludge can support proliferation of diverse bacteria. These bacteria can be isolated and studied for several purposes (enzymes, biopesticides, ethanol production, etc.)
2. Novel strains were isolated from municipal wastewater sludge, which are different from commonly used strains.
3. Gram-negative thermophilic bacterial strains were isolated, which produces thermostables proteases.
4. Shake flasks experiments established the optimal growth temperature to be at 50 °C and 60 °C for optimal protease activity.
5. Bench scale studies showed that AC and B strains produce weaker protease activities in fermentor than in shake flasks, but D strain produced 26.5 times stronger protease.

Acknowledgements: The authors are thankful to the Natural Sciences and engineering research council of Canada for financial support (Grants A4984, STP 235071, Senior Canada Research Chair). The authors are also thankful to Satinder K. Brar for her English corrections.



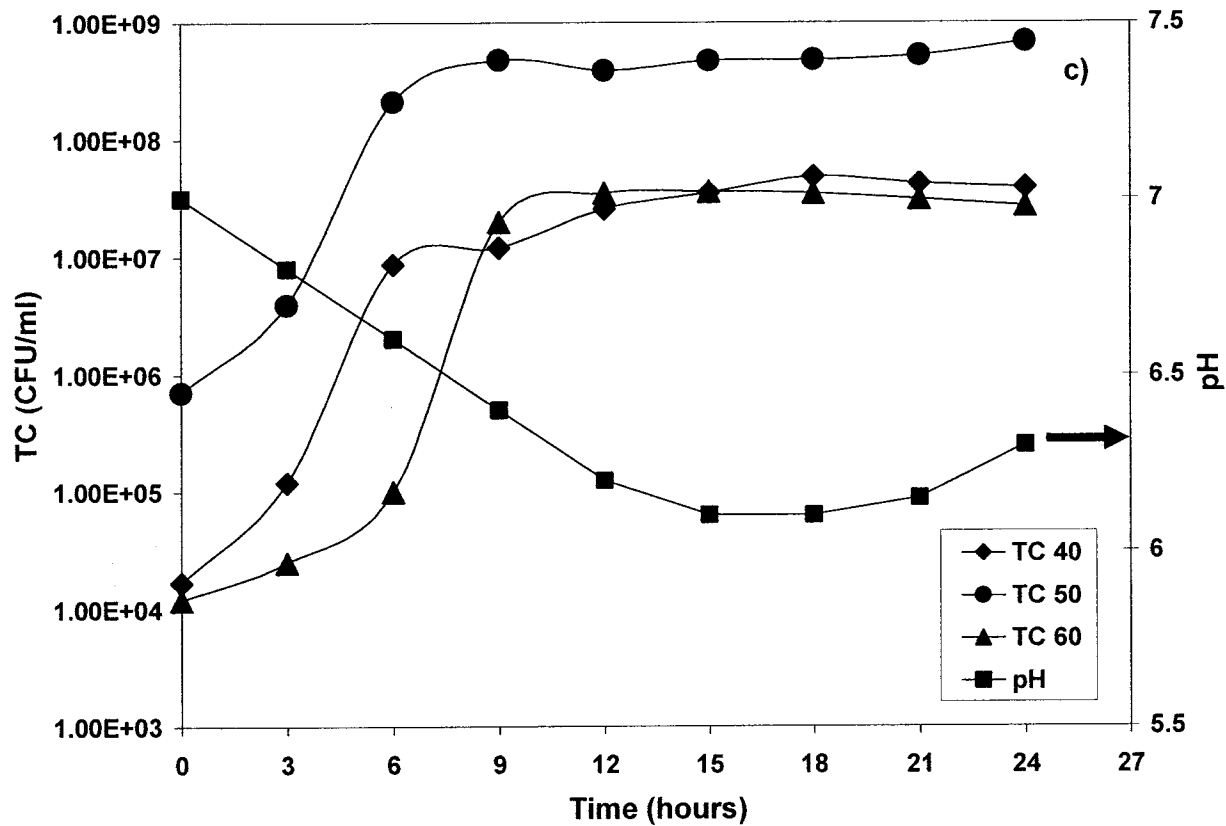


Figure 2: Growth profile for various strains (AC, B and D) at different temperatures (40, 50 and 60 °C) in 500 ml shake flask (working volume of 100 ml S.M.). a) AC, b) B and c) D. Note: pH profile was only measured during fermentation at 50 °C.

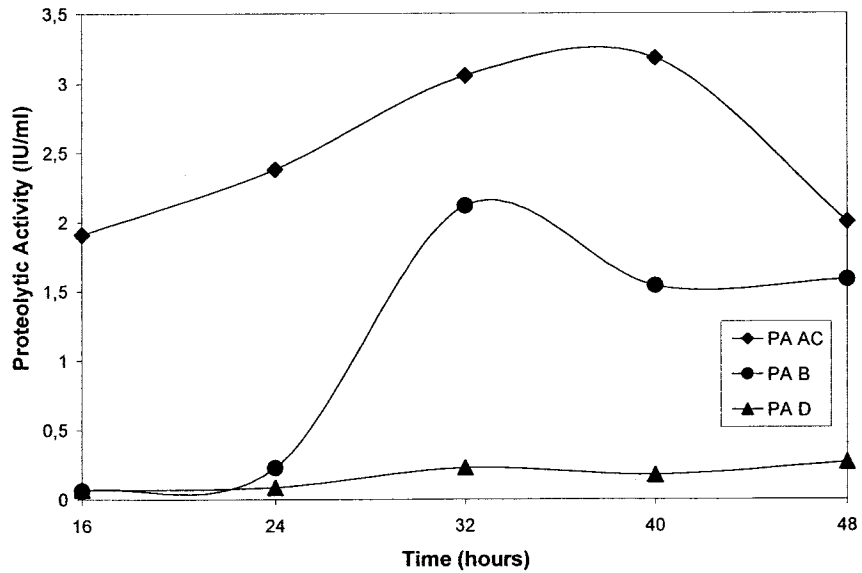


Figure 3: Proteolytic activities (PA) (IU/ml) of various strains (AC, B and D) during 500 ml shake flasks experiments (working volume of 100 ml S.M.) at an optimal stability temperature of 60 °C

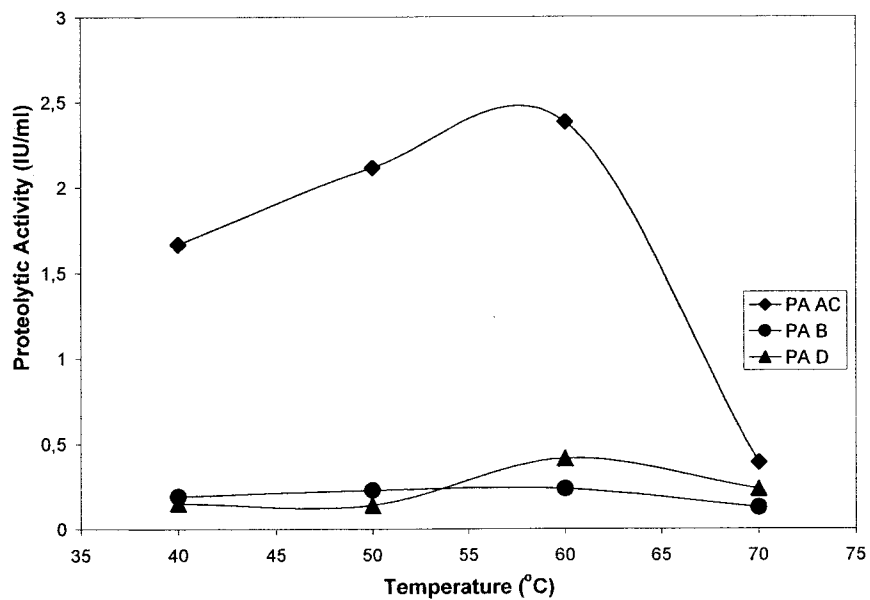


Figure 4: Proteolytic activities (PA) (IU/ml) of various strains (AC, B and D) during 500 ml shake flasks experiments (working volume of 100 ml S.M.) at different temperatures (40, 50, 60 and 70 °C).

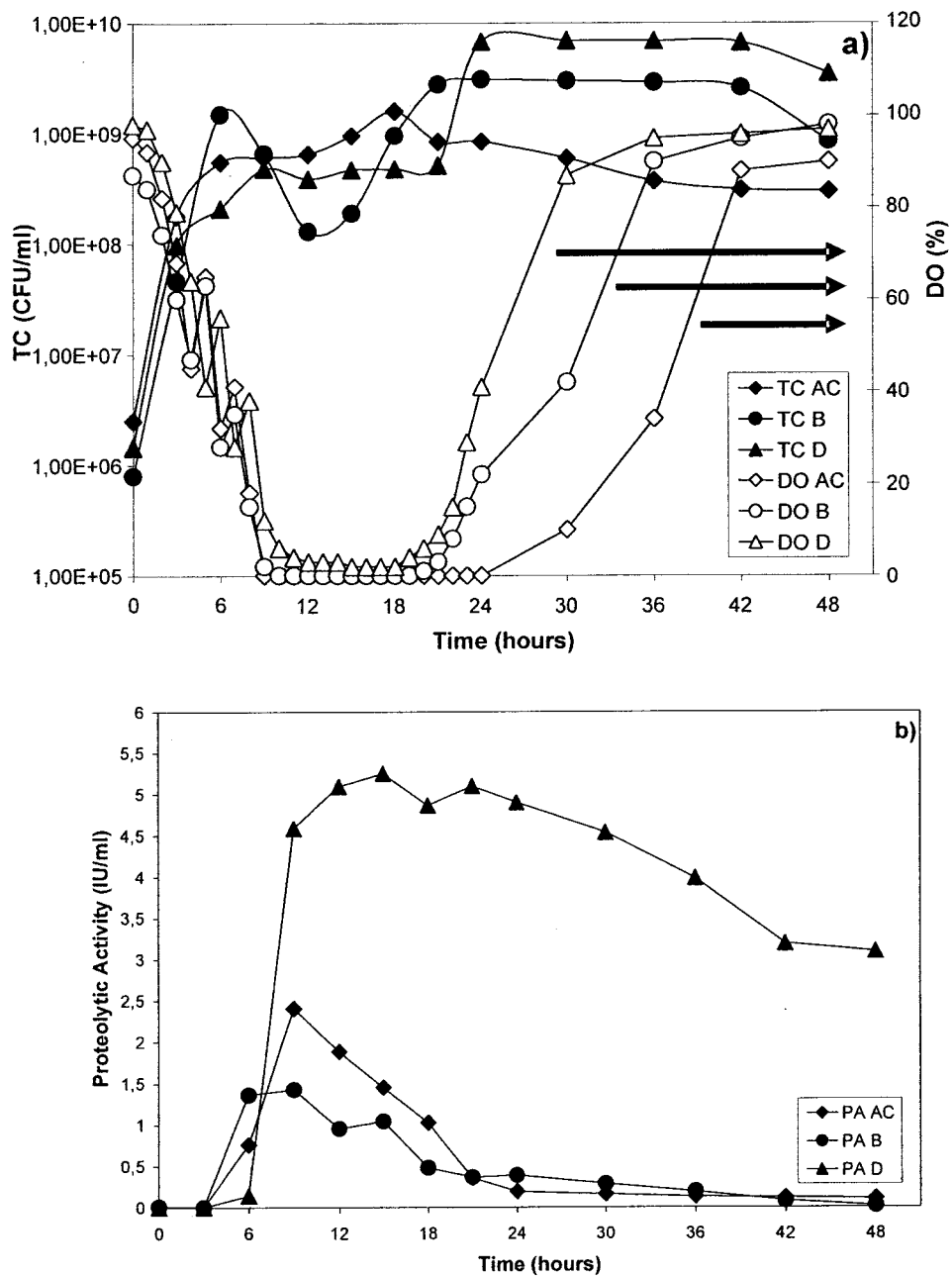


Figure 5: a) Growth and DO profiles for various strains (AC, B and D) in 15 l fermentor (working volume of 10 l S.M.) at an optimal growth temperature of 50 °C. b) Proteolytic activities (PA) (IU/ml) of various strains (AC, B and D) measured with modified Kunitz method at an optimal stability temperature of 60 °C

**CHAPITRE 5 PROTEASE PRODUCTION BY ROD-SHAPED
GRAM-POSITIVE BACTERIA IN NEW ALTERNATE
MEDIUM**

Article 2

**Présenté par
Jean Philippe Chenel**

**Mémoire présenté pour l'obtention d'un grade de
Maîtrise en Sciences de l'eau (M. Sc.)**

**Directeur de recherche
Professeur Rajeshwar D. Tyagi**

**INRS-ETE
Janvier 2005**

5.1 RÉSUMÉ

Huit souches productrices de protéases ont été isolées à partir de boues d'épuration de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ), de Valcartier (VAL) et Black Lake (BLK). Deux de ces souches ont montré un bon potentiel pour la production d'enzymes et elles furent testées sur différents milieux en fioles Erlenmeyers (500 ml avec volume de travail de 100 ml). La force des enzymes a été calculée en unités internationales par millilitres (UI/ml). Les deux meilleures souches, nommées S1 et S5, ont montré des maximums d'activités enzymatiques en divers endroits ce qui signifie que ces bactéries produisent plusieurs enzymes différentes durant les différents temps de leur phase de croissance. Les différents milieux pour la production d'enzymes, le milieu synthétique à base de soya, les eaux usées d'usine d'amidon et les boues d'épuration de la CUQ ont permis la production de différentes enzymes à différents moments ce qui est dû à la complexité du milieu ainsi qu'aux conditions de fermentation.

5.2 ABSTRACT

Eight protease producing bacterial strains were isolated from different wastewater or wastewater sludges collected from three different wastewater treatment plants: Communauté Urbaine de Québec (CUQ), Valcartier (VAL) and Black Lake (BLK). Two isolated strains were chosen for further study due to their higher capacity to produce protease and were named S1 and S5. Enzyme production was carried out in 500 ml Erlenmeyers flasks with a working volume of 100 ml using different media such as soy medium, starch production industry wastewater and CUQ sludge. Two strains were cultivated in three different media and they produced enzymes at different times of fermentation due to the complexity of raw materials used. The enzyme production was influenced by the type of media and culture conditions.

5.3 INTRODUCTION

During the last fifty years, people thought that rivers and lakes had self-cleansing properties for the pollutants added by human activities. But investigations in last 20 years have shown that the amount of waste discharged in rivers and lakes exceeded their regeneration capacity. Consequently, many efficient treatment methods were developed to deal with the problem of waste disposal (Barnabé et al., 2003; Dale, 1999; NRC, 1999). The cost to treat waste depends on the energy used and on the easiness of the treatment. This drive industries to clean their wastes in the easiest and cheapest possible way i.e. dumping the wastes into the rivers and lakes. This forced the scientists to find alternate, ecofriendly, efficient and cost effective approach to clean these large quantities of wastes.

According to Verstraete (2002), "All wastes can be treated" but the methods are not always easy. On the other hand, wastewater with high content of organic carbon, nitrogen and other nutrients can be considered as raw material for the production of value added products. Recently, Barnabé and co-workers (2003) have reviewed the possibility of producing such value-added products using wastewater and wastewater sludge as raw materials through bioconversion. For example, *Bacillus spp.* can produce value-added products like toxins (biopesticides), industrial enzymes, antibiotics or bioplastics. These substances can be produced simultaneously with a reduction of pollution load in the waste. Thus, by selection of appropriate microorganisms and cultivating under the optimal growth conditions, it is possible to recycle wastewater and wastewater sludge with concomitant production of value added products which have commercial value. There are also fungi that can produce enzymes (Outtrup et al., 1997; Szekeres et al., 2004).

Bacteria are known to produce more enzymes which are having industrial importance. Many of *Bacillus* species are spore former during their growth and they produce high concentrations of extracellular enzymes which can be used in many different ways (Tyagi et al., 2002; Zouari and Jaoua, 1999). Moreover, microorganisms isolated from wastewater or wastewater sludge are likely to produce higher quantity of products as they are well acclimatised to the prevailing conditions in that particular environment.

Therefore, the aim of this research was to isolate protease producing mesophilic bacteria from wastewater sludge and to find their potential for protease enzyme production. The objective of this research also included to demonstrate that different media could produce different enzymes and that wastes could be used to sustain growth and enzyme production. This approach involves many advantages: enzymes could be produced for replacing synthetic medium with wastes, reduce the pollution in environment and recycling of carbon to minimise impact on climate change.

5.4 MATERIALS AND METHODS

5.4.1 Materials

5.4.1.1 Culture media

Three different media were used to test the enzyme production by various isolated strains.

- Synthetic soy medium composition (w/v): 5% soy flour, 3% glucose, 1% ammonium phosphate, 0.03% KCl, and 0.02% MgSO₄, 7H₂O, pH 7.6 (Meunier, 1999)
- CUQ wastewater sludge with 2% (w/v) total solids concentration. The composition of the sludge is presented in Table 1
- Starch industry wastewater with 2% total solids concentration. The composition of this medium is presented in Table 2.

5.4.1.2 Gelatine medium

This medium was used to screen the capabilities of isolated strains for proteolytic enzymes production. This medium stays in solid form at a temperature below 55 °C and support the bacterial growth. After inoculation of bacterial strains on gelatine tubes, they were incubated in an incubator (Gallenkamp) at 21 ± 1 °C for 24 hours followed by storage in a refrigerator at 4 ± 1 °C for 2 hours. On cooling to 4 °C from 24 °C, non-hydrolysed gelatine turned solid in contrast to hydrolysed gelatine which remained liquid showing the presence of proteolytic enzymes.

5.4.1.3 Enzymatic assay solutions

The following solutions were used to test the protease activity of each bacterial strain.

- Casein solution : 1.2% casein in borate buffer (pH 8.2)
- Borate buffer : 0.2 M borate; 0.05 M NaCl and 0.05 M sodium borate
- Trichloroacetic acid solution (TCA) : 36 ml of 50% trichloroacetic acid solution, 220 ml of 1 M sodium acetate solution, 330 ml of 1 M acetic acid solution, dispense the volume to 1000 ml with deionised water.
- Tyrosine solution : 50% borate buffer and 50% TCA solution ; tyrosine concentration (μM) : 0, 200, 400, 600, 800 and 1000

5.4.2 Methods

5.4.2.1 Isolation of bacterial strains

Wastewater sludge was used as a non-conventional bacterial strains source. One ml sample of each sludge was applied to a nutrient agar plate and incubated at 30 ± 1 °C for 24 hours. Each different colony that appeared on the plate was split and inoculated on a new plate. The subculture was continued until pure colonies were obtained. The new isolated bacterial strains were stored at 4 °C for further use.

5.4.2.2 Growth conditions

The inoculum (pre-culture) was produced in 250 ml Erlenmeyer flasks each containing 50 ml of the same medium as the production medium. As explained earlier, three different media were tested for bacterial growth and enzyme production: synthetic medium, starch wastewater and CUQ wastewater sludge. One pure colony from a nutrient agar plate was inoculated in the 50 ml sterilized (121 ± 1 °C for 30 minutes) medium. For all the strains and three types of media, culture conditions were similar: 30 ± 1 °C at 250 rpm, incubation time six hours (in this time the culture reached exponential growth phase, pre-determined). The inoculum (3% v/v) was transferred (after 6 h) to the production flask.

Enzyme production was also carried out in 500 ml Erlenmeyers flasks containing 100 ml of the medium adjusted to pH 7.0. The flasks with the medium were sterilized at 121 ± 1 °C for 30 minutes and inoculated with respective inoculum (3% v/v) after cooling. The flasks were incubated in a shaker at 30 ± 1 °C and 250 rpm for 72 hours. Two ml samples were drawn at regular intervals (each 12 hours) to determine the biomass concentration and protease enzyme activity. The samples were stored in a refrigerator until use for analysis. During fermentation, pH was controlled between 7 and 8 (previous experiments showed that this is the optimal growth pH for these bacterial strains) by addition of sterile NaOH until it reached optimal pH and verification was done with pH indicating paper.

5.4.2.3 Protease activity assay

After sampling, samples were rapidly cooled to 4 °C in ice bath. Subsequently, all samples were centrifuged at 7650 g for 20 minutes and stored at 4 °C in a refrigerator for later analysis. One ml of the supernatant fluid was diluted (1/5 or to appropriate dilution) in borate buffer. The proteolytic activity was assayed in the supernatant obtained.

Five ml of casein solution was kept for five minutes at 30 ± 1 °C to equilibrate in an orbital-shaking bath followed by addition of 1 ml of the appropriately diluted enzyme solution. The mixture was incubated for 10 minutes and the reaction was stopped by addition of 5 ml TCA solution and the mixture was left for 30 minutes in a water bath. A blank was simultaneously made for each sample, but casein was precipitated with TCA solution before addition of the enzyme solution. The samples after incubation (total volume of 11 ml) were filtered on 0.45 µm filter and absorbance of the supernatant fluid was measured at 275 nm in a spectrophotometer. Also, a standard curve was made with known tyrosine concentration in deionised water (Figure 6). The absorbance was measured at five different concentrations of tyrosine: 0, 200, 400, 600, 800 and 1000 µM.

5.4.2.4 Total Cell (TC) Count

To measure cell count the samples were appropriately diluted with saline solution (0.85% NaCl). Diluted sample (100 µl) was applied to nutrient agar plate and incubated at 30 °C for 24 hours.

The colonies were counted after 24 hours and the results were reported as colony forming units (CFU/ml). The dilution of samples (10^7 to 10^9) was made to obtain 30 to 300 colonies per plate. The samples were plated in triplicate with a percent error of 5%.

5.5 RESULTS AND DISCUSSION

5.5.1 Bacterial strains

Wastewater and sludge are good media to support bacterial growth and thus microorganisms proliferate in them. In this work, eight new strains were isolated on nutrient agar plates and were named S1 to S8. Two strains were isolated from CUQ wastewater sludge, two from Black Lake sludge and four from Valcartier sludge. All strains were Gram positive, rod shaped and had a sub-terminal spore that suggested *Bacillus* species but this could not be confirmed positively and specific identification (API gallery test or selective medium) was further needed.

5.5.2 Gelatine test

All eight bacterial strains produced proteolytic enzymes but only two of them, S1 and S5, seem to hydrolyse more gelatine than all the other strains and were chosen for further study. These bacterial strains were found in CUQ and Black Lake sludge respectively and produced appreciable quantity of enzymes. This was probably due to the fact that carbon and nitrogen sources in these sludges were more complex and bacteria needed to produce more enzymes to capture essential nutrients required to sustain growth.

5.5.3 Growth results

Figure 7 and Figure 8 show the growth results for the two studied strains, S1 and S5, respectively in different growth media. It is clear that Strain S1 gave highest cell count ($4.00E+09$ CFU/ml at 24 hours) in starch industry wastewater sludge followed by the soy medium ($1.30E+09$ CFU/ml at 36 hours) and the CUQ sludge ($4.90E+08$ CFU/ml at 24 hours). The starch industry wastewater was mainly composed of a high amount of carbon, primarily solubilized starch (total solids concentration 17.3 g/l), that could be easily assimilated by the bacterial strain. Furthermore, CUQ sludge was composed of different types of complex carbon sources that have

been classified as easily biodegradable, biodegradable and difficult to biodegrade (Tirado-Montiel et al., 2003). Consequently, comparatively lower cell count was observed in CUQ sludge.

Similarly, strain S5 gave lowest cell count ($1.00\text{E}+09$ CFU/ml at 36 hours) while growing in CUQ sludge. However, unlike strain S1, a better cell count ($3.00\text{E}+10$ CFU/ml at 24 hours) was observed in soy medium than that observed in the starch industry wastewater ($7.90\text{E}+09$ CFU/ml at 24 hours). This trend could be due to several reasons: variable media composition, different growth mechanisms and profiles of various microbial strains (Bulla et al., 1980; McKane and Kandel, 1996).

Moreover, a higher cell concentration (cell count) was obtained for S5 strain in soy synthetic medium than strain S1. Further, S1 and S5 strains showed maximum cell counts in starch industry wastewater and synthetic medium, respectively. Maximum cell count was obtained for two strains in 12 hours except growth of S5 in CUQ sludge, which took almost 36 hours to reach maximum value. Growth of S5 strains in CUQ sludge was slower than that of S1 strain. Under similar growth conditions, if all the media were compared, S5 strain gave a higher maximum cell count than the S1 strain. However, optimal growth conditions (pH and temperature) for two strains may be different and remains to be explored.

5.5.4 Protease activity

A calibration curve was drawn to obtain a standard relation between absorbance and tyrosine concentration in a standard tyrosine solution, which is presented in Figure 6. A best-fit straight line was drawn; the slope of the line was determined and was used to estimate the tyrosine concentration in test samples.

The protease activity assay was based on the fact that when mixed with 1 ml of appropriately diluted enzymatic solution, casein will release tyrosine. The tyrosine thus released was measured by determining absorbance in a spectrophotometer. One international unit (IU/ml) of enzyme was defined as that hydrolysed casein to release 1.0 μ mole of tyrosine per minute at pH 8.2 and 37 °C. International Unit of the enzyme was determined by the Equation 1 (Article I).

The profiles of protease production by strains S1 and S5 are presented in Figure 7 and Figure 8, respectively with total cell count profile. As the culture conditions were similar throughout the experiments, variable maximum values obtained in protease activity curves could be due to different enzymes produced by the same strain.

As stated above, the degradable organic compounds present in wastewater and wastewater sludge are in different forms (easily biodegradable, biodegradable and difficult to biodegrade) (Tirado et al., 2001). Firstly, easily degradable matter was consumed and a comparatively lower activity of enzyme was produced. When strains switched over from easily degradable to biodegradable or from biodegradable to difficult to biodegrade material, they synthesise different types of enzyme in different quantities to obtain nutrients for their growth. Consequently, different types of enzymes were synthesised at different times giving different maxima in the activity curve (Figure 7 and Figure 8). In fact, it is known that enzymes need special molecular arrangements to bind to different compounds (Karp, 1998). So, when one type of substrate is exhausted, bacteria slow down producing the useless enzyme and start production of a new enzyme that can hydrolyse this substrate in the medium. More complex material in the medium will result in synthesis of higher enzyme activity and different types of enzymes (Braun 2000; Chu and Li, 1992).

Figure 7 and Figure 8 show that enzymes are secreted in lower quantity (activity) and slowly in synthetic medium compared to other complex media (starch industry wastewater and CUQ sludge). This was due to the fact that soy based synthetic medium was an easily biodegradable substrate for the isolates. All the required elements were in easily available form (solubilized soy flour, dextrose and cornstarch and all other simple components like $MgSO_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 and others). However, in sludge and wastewater, most of the nutrients were present in solid

phase and to extract these nutrients, the strains required to synthesise higher concentration of different enzymes.

The enzyme production time also depends on the composition of the medium. In contrast to starch industry wastewater and municipal sludge, enzyme production in synthetic medium was faster as easily degradable compounds were easily assimilated by the bacteria. Moreover, higher secretion of enzymes in complex media (starch wastewater and municipal sludge) could be due to poor accessibility of various nutrients, which would otherwise be easily assimilated. Further, these enzymes could break the big complex molecules to simpler ones and release them in the medium (from sludge solid phase to liquid phase) enhancing accessibility. Hence, a more complex medium stimulates the bacteria to produce high enzyme activity and also different types of enzymes, as is clear from different maxima in activity curves (Figure 7 and Figure 8). Conclusively, the enzyme activity produced by both strains in wastewater and sludge medium was higher than the synthetic medium.

Since three media used were different in composition, it was probable that the enzymes needed to hydrolyse these different compounds were much different; because enzymes are normally very selective and attack only molecules for what they were created (Karp, 1998). Therefore, it was also possible that the two different strains produced different enzymes in different media, which remains to be verified.

Further, certain enzymes are produced by the bacteria to support cellular growth but there are some other enzymes that are produced to support sporulation of the bacteria (Balaban et al., 2003; Salamitou et al., 1996; Tan and Donovan, 2000). During sporulation process, some of the intracellular enzymes are released into the medium and thus extracellular enzyme activity increases. Effectively, the enzymatic activity that appeared after 24 hours was mostly due to the sporulation of bacteria; as there was no growth of two strains after 24 hours in all media used except S5 in CUQ sludge (Figure 7 and Figure 8). However, the spore concentration was not measured in this research, but it was observed that the isolated strains were spore formers. When the medium constituents depleted, bacteria entered the sporulation phase to survive. They need enzymes to produce all the elements that form the cortex and the constituents within it (Royal

Veterinary and Agricultural University, 2000). These elements could be captured from the medium with the help of new enzymes that are formed by bacteria during this stage (sporulation).

This may be the reason for certain enzyme activity maximum to appear around 60 hours fermentation time (Figure 7 and Figure 8). At this time, medium was almost completely depleted and bacteria required to secrete some enzymes which could hydrolyse the different remaining more complex compounds. This also included the dead cells, which could also serve as a source of nutrients for the living cells. Now, it is imperative to point out that the sporulation does not happen in all bacterial strains, as some strains remain in the form of vegetative cells (non-spore formers) and continue to multiply (Karp, 1998; Pelmont, 1993; Snyder and Champness, 1997). These bacterial strains will produce many types of enzymes to pursue their growth and survive.

5.6 CONCLUSION

Eight different types of protease producing bacteria were isolated and two strains were found as potential protease producers. These Gram-positive rod shaped bacteria showed a good growth in a soy based synthetic medium as well as new non-conventional media like CUQ wastewater sludge and starch industry wastewater. The enzyme activity was low; however, it is possible to increase the enzyme activity by fortifying the wastewater and sludge medium with carbon and nitrogen source and/or optimising the synthetic medium composition. Isolation of bacteria from different wastewater and wastewater sludge is a good way to find new unknown bacterial strains which can be very useful to combat pollution. Detailed systematic research is required to exploit the full capacity of these strains to produce maximum enzyme activity. Moreover, strains isolated from the same waste may possess higher capacity to produce enzymes, as they are already adapted to the conditions prevailing in their natural medium. Well-adapted bacterial strains in wastewater or wastewater sludge can also help in value-addition of these media and their further utility.

Acknowledgements : The authors are thankful to the Natural Sciences and engineering research council of Canada for financial support (Grants A4984, STP 235071, Senior Canada Research Chair). The authors are also thankful to Satinder K. Brar for her English corrections.

Table 1: CUQ wastewater mixed sludge composition (Sikati-Foko et al., 2001)

Parameters	Concentration (mg/kg; unless otherwise, stated)
Physical (g/l)	
Total solids	38.0
Total volatile solids	25.8
Suspended solids	26.3
Suspended volatile solids	16.8
Chemical (mg/kg)	
Carbon	444 505
Nitrogen	63 883
Ammoniacal nitrogen	1 200
C/N	6.9
Orthophosphates	14 620
Metals (mg/kg)	
Al	13 411
Ca	14 259
Cd	1.3
Cr	138.5
Cu	199
Fe	13 670
K	3 764
Mg	2 119
Mn	149
Na	7 778
Ni	11
P	14 982
Pb	18.5
S	4 303
Zn	215.3

Table 2: Starch wastewater composition (Lab Data)

Parameter	Concentration (mg/kg; unless otherwise stated)
Total solids (g/l)	17.3
Total volatile solids (g/l)	14.2
Suspended solids (g/l)	2.4
Suspended volatile solids (g/l)	2.4
Viscosity (cP)	3.4
Total carbon	366000.0
Total nitrogen	54000.0
Total phosphorus	812.3
N-NH ₃	618.8
N-NO ₂ , N-NO ₃ ⁻	36.6
P-PO ₄ ³⁻	11559.5
Al	210.5
Ca	24728.9
Cd	1.3
Cr	13.5
Cu	96.5
Ni	22.5
Fe	4454.7
K	1528.6
Pb	35.8
Mn	46.7
S	800.0
Zn	522.6
Na	5308.0

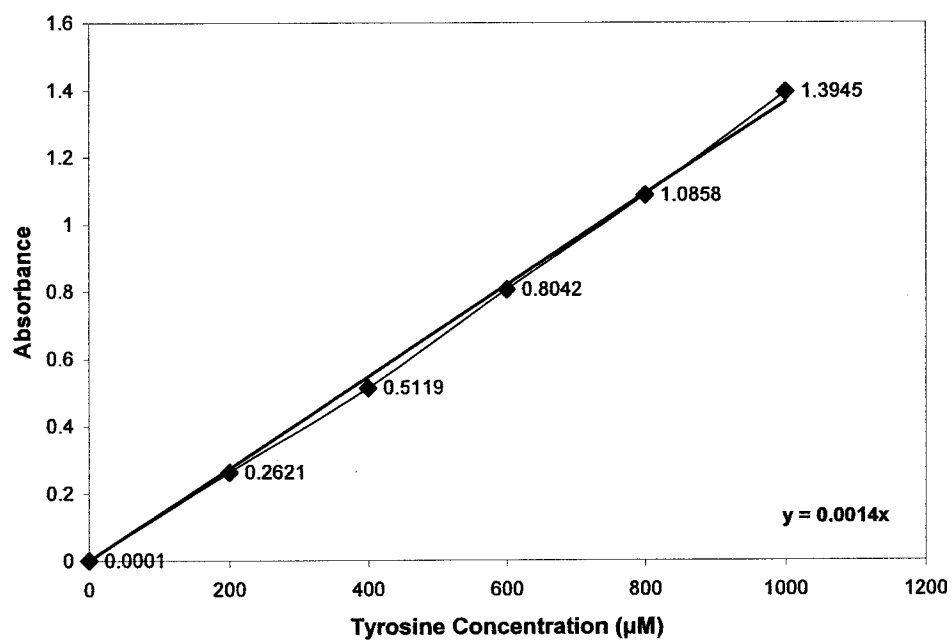


Figure 6: Standard curve of tyrosine absorbance

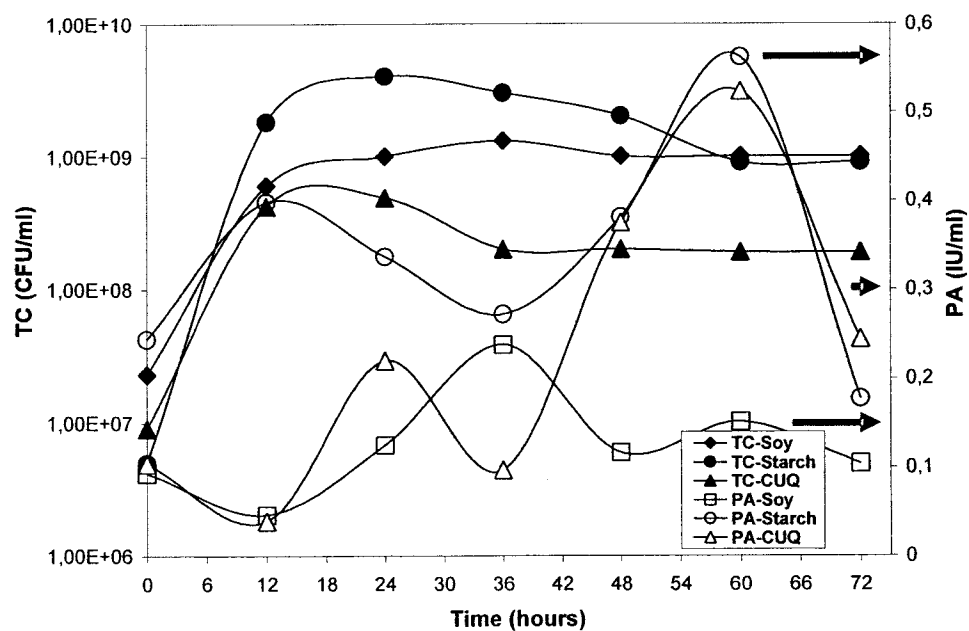


Figure 7: Growth and proteolytic activity (PA) profiles of S1 strain in shake flasks experiments at 30 ± 1 °C for 72 hours in three media: soy, starch wastewater and CUQ sludge

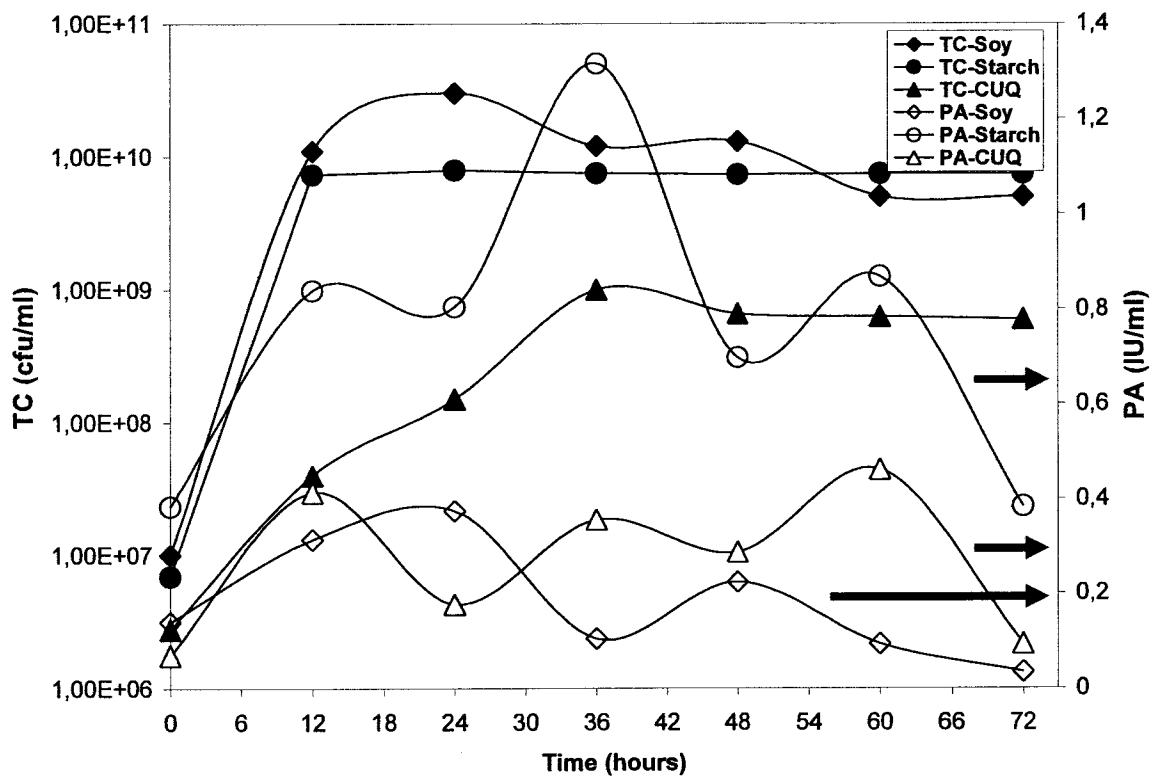


Figure 8: Growth and proteolytic activity (PA) profiles of S5 strain in shake flasks experiments at 30 ± 1 °C for 72 hours in three media: soy, starch wastewater and CUQ sludge

CHAPITRE 6 DISCUSSION

Ces expériences ont tout d'abord permis de démontrer que les bactéries isolées ont le pouvoir de produire des enzymes capables de dégrader différents composés. En effet, sur Terre et ailleurs possiblement, il existe des composés difficilement dégradables sans l'aide essentielle des microorganismes. Que ce soit des sucres, des protéines, des lipides, des hydrocarbures ou autres, toutes ces molécules sont, à la base, composées de parties plus petites et dissociables les unes des autres. Elles sont toutes composées de carbone, d'oxygène, d'azote, d'hydrogène ou de l'un des 103 et plus éléments figurant dans le Tableau Périodique; ce qui explique que ces molécules peuvent retourner à ce stade de décomposition chimique. Par contre, ce sont les liens qui unissent ces éléments qui rendent ces molécules difficilement dégradables. C'est directement à ce niveau que les bactéries interviennent.

En industrie, les bactéries Gram-positives sont les plus utilisées pour la production d'enzymes. La plupart se transforment en spores à un certain moment de leur croissance ce qui, selon certaines sources, pourrait engendrer la production accrue d'enzymes (Beg et al., 2002; Priest, 1977; Stauch et Hoch, 1993) nécessaires à la création de la paroi de la spore ou de sa libération. Lorsque les éléments nutritifs du milieu deviennent rares, les bactéries Gram-positives des genres *Bacillus* chez les aérobies et *Clostridium* chez les anaérobies vont se transformer en spores pour résister aux différentes perturbations du milieu jusqu'à ce que ce dernier redevienne propice à la croissance de ces bactéries. Lors de la formation de la spore, la bactérie va excréter dans le milieu environnant des protéases qui vont dégrader les matériaux complexes en oligopeptides et en acides aminés qui seront ensuite absorbés par la cellule (Balaban et al., 2003; Salamiou et al., 1996; Tan et Donovan, 2000). Par la suite, lorsque la spore est formée dans la cellule, cette dernière va produire des protéases pour dégrader la paroi cellulaire et laisser échapper la spore dans le milieu (Balaban et al., 2002; Sharipova et al., 2002).

Les expériences sur les bactéries mésophiles ont été produites dans des fioles Erlenmeyers. Cette technique permet de définir les paramètres de base pour la croissance des bactéries. Il est ainsi facile de tester plusieurs souches bactériennes, diverses températures de croissance et vitesses d'agitation en plus de donner la possibilité d'essayer différents milieux de culture. Par

contre, la culture en fioles Erlenmeyers ne permet pas un bon contrôle des paramètres de fermentation. Le transfert d'oxygène, ou oxygène dissous, ne peut être mesuré ni contrôlé tandis que le pH peut être mesuré en prélevant un petit échantillon mais ne peut pas plus être contrôlé (Meunier, 1999). Il est possible d'utiliser un tampon pour maintenir le pH correctement, mais peu d'entre eux se sont montrés efficaces lors de fermentation en milieux synthétiques ou en milieux alternatifs qui sont souvent très complexes. De plus, toutes les manipulations du milieu de culture lors de la fermentation peuvent entraîner des contaminations. L'ajout de tampon, d'acide ou de base et le prélèvement d'échantillons sont toutes des façons possibles pour causer la contamination du bouillon de fermentation et ainsi fausser les résultats (Meunier, 1999).

Les expériences sur les enzymes thermostables qui furent réalisées ont permis d'isoler des bactéries Gram-négatives thermophiles qui peuvent produire ces enzymes thermostables. Celles-ci ont été très peu étudiées. Effectivement, la majorité des études qui se font présentement dans le Monde porte en grande partie sur la production d'enzymes à partir de bactéries Gram-positives et *Bacillus* est la plus importante. Les industries n'utilisent que ces bactéries car elles ont un grand pouvoir protéolytique. Une partie du mémoire a donc consisté à trouver des bactéries non conventionnelles, productrices d'enzymes résistantes à la température. Un mélange de diverses boues d'épuration fut utilisé pour l'isolation de souches indigènes résistantes à de hautes températures, car l'hypothèse de départ était que des bactéries thermophiles avaient plus de chances de produire des enzymes thermostables, résistantes aux hautes températures. La surprise fut de découvrir que les seules bactéries thermophiles ayant un pouvoir protéolytique intéressant étaient des Gram-négatives, bactéries rarement étudiées dans ce but et jamais utilisées pour la production d'enzymes thermostables. Voici donc ce qui rend cette recherche si innovatrice et intéressante pour la résolution des problèmes de pollution par des méthodes alternatives.

Ces bactéries sont non sporulantes mais l'activité enzymatique des protéases qu'elles produisent est encourageante. Les expériences produites ne comportaient aucune optimisation des paramètres de cultures ou du milieu; il y a donc place à de l'amélioration. Il faut pousser de plus en plus la recherche sur les bactéries Gram-négatives pouvant produire des enzymes. Ceci permettrait probablement de découvrir d'autres types de bactéries qui pourraient être très utiles à

l'homme. Les enzymes sont la clé dans la résolution des problèmes de pollution qui détériorent l'environnement et les écosystèmes.

Les enzymes produites par les bactéries ne peuvent être utiles que si elles sont excrétées hors de la bactérie. C'est pourquoi les expériences qui forment ce mémoire sont fondées sur les enzymes extracellulaires, excrétées hors des cellules. Les protéases sont les enzymes les plus utilisées dans les industries. Elles peuvent servir pour nettoyer les instruments, la machinerie ou bien directement dans les procédés, pour modifier une matière première en un produit final commercialisable. La première partie du projet de maîtrise visait à découvrir des bactéries résistantes à des températures de plus de 45 °C et à démontrer que ces bactéries avaient la possibilité de produire des enzymes qui elles aussi, seraient résistantes à des températures élevées. En effet, les procédés industriels utilisent souvent de hautes températures et la transformation du produit initial en produit final génère de l'énergie dégagée sous forme de chaleur. C'est pourquoi il était intéressant de trouver des enzymes qui pourraient conserver leur efficacité même à ces températures. Ces expériences ont été réalisées avec succès. Il a été démontré que des bactéries thermophiles pouvaient effectivement produire des enzymes protéolytiques résistantes à des températures pouvant atteindre 60 °C. L'activité enzymatique, ou force enzymatique, a pu atteindre une valeur très encourageante de 5.25 UI/ml. C'est un bon départ pour la recherche dans ce domaine et il reste beaucoup d'expériences à faire pour l'optimisation du procédé.

Par contre, on ne peut passer sous silence les problèmes que peut occasionner la production d'enzymes thermostables par des bactéries thermophiles. Premièrement, la production d'enzymes se fait par fermentation d'un quelconque milieu dans un fermenteur. La capacité du fermenteur dépend du besoin en enzymes; plus la demande est élevée, plus un fermenteur volumineux sera exigé et plus le rendement sera efficace. Le problème se situe au niveau des coûts de la matière première pour la production. En effet, conventionnellement les bactéries produisent des enzymes dans un milieu synthétique comprenant tous les éléments essentiels pour la croissance bactérienne. Ce milieu synthétique coûte cher (60.26 \$ CDN/kg = 1 à 2 \$/litre de bouillon de fermentation) comparativement au fait que la production de produits chimiques est moins dispendieuse. Le fait de remplacer ce milieu coûteux par un produit offrant un coût plus

faible, c'est-à-dire, qui ne coûte rien à acheter et même ceux qui doivent se débarrasser de ces rejets sont prêts à payer pour le faire, permettrait de produire ces enzymes à des coûts vraiment compétitifs sur le marché. Le milieu synthétique est composé de farine de soya, de mélasse, de phosphate d'ammonium, de sulfate de magnésium, de polymères, de chlorure de potassium et d'antimousse. Cette production est dispendieuse. Ce que l'équipe de recherche en production de produits à valeur ajoutée de l'INRS-ETE de Québec propose est d'utiliser des rejets municipaux ou industriels pour remplacer en grande partie le milieu synthétique. L'utilisation d'eaux usées ou de boues d'épuration permettrait de faire des économies de 30.29 \$ CDN/kg sur les coûts du milieu de culture; environ la moitié du coût total du milieu de culture vient de la farine de soya, du phosphate d'ammonium, du sulfate de magnésium, des polymères et du chlorure de potassium (Meunier, 1999). L'utilisation de ces milieux alternatifs ne comporte que des frais dus à quelques appareils spécialisés dont l'industrie devrait se munir comme des décanteurs, des hydrolyseurs, des bassins ou citernes pour l'entreposage; sinon ces rejets ont un coût nul puisque la plupart des municipalités et industries paient pour s'en débarrasser. Les seuls coûts qui demeurent sont ceux de la mélasse (0.60 \$ CDN/kg) et l'antimousse (29.77 \$ CDN/kg) nécessaire à toutes les fermentations. En général, l'utilisation de milieux alternatifs peu coûteux permettrait de faire des économies de 20 % à 38 % (ce qui revient à moins de 0.50 \$/litre de bouillon de fermentation) dépendant du volume d'opération et en considérant les appareils spécialisés nécessaires (Meunier, 1999).

L'autre problème à surmonter est relié directement à la fermentation elle-même. En effet, lors de la production d'enzymes par des bactéries thermophiles, la température du fermenteur doit être maintenue à la température optimale de croissance de la bactérie, c'est-à-dire 50 °C dans le cas présent. Le fait d'utiliser cette haute température provoque plusieurs problèmes. Tout d'abord, il est difficile de maintenir l'oxygène dissous dans le milieu supérieur à 20 % qui est la concentration minimale pour avoir une bonne croissance de bactéries aérobies (Avignone-Rossa et al., 1992; Beg et al., 2002). En effet, la solubilité d'un gaz diminue toujours avec l'augmentation de la température (Zumdaahl, 1998). Cela signifie que plus la température est élevée, moins il peut y avoir de gaz dans le milieu liquide. En plus de la croissance bactérienne, la sporulation et la production de protéases sont aussi dépendantes du transfert d'oxygène du milieu vers la bactérie (Abdel-Hammed, 2001; Avignone-Rossa et al., 1992; Zouari et al., 2002).

La Figure 5 (voir Article I) montre que la DO (oxygène dissous) se retrouve sous la barre du 20 % pendant quelques heures, ce qui va provoquer la fin de la phase exponentielle de croissance des bactéries. Le fait d'avoir une carence en oxygène réduit le taux de croissance ainsi que la biomasse maximale que peut supporter le milieu. Plus il y a de bactéries dans le milieu de culture, plus l'oxygène sera rapidement consommé, ce qui entraîne la baisse rapide de l'oxygène dissous dans le milieu. Il faut compenser cette consommation à l'aide des diverses possibilités qu'offre le fermenteur sinon il sera impossible d'utiliser le plein potentiel du milieu par la bactérie. Il est possible d'augmenter l'agitation pour introduire plus d'oxygène dans le milieu conséquemment à l'aération. Pour une certaine période de temps, ces solutions réussissent à maintenir la DO supérieure à 20 %. Par contre, il arrive un moment, vers la fin de la phase exponentielle de croissance, que cela ne suffit plus et la DO tombe inévitablement sous le seuil de 20 %. Entre temps, le fait d'augmenter l'aération a engendré un nouveau problème, probablement le plus important de tous, la production de mousse. En effet, la mousse occasionne différents inconvénients. Elle peut fausser les résultats sur l'activité enzymatique car les enzymes peuvent se retrouver collées aux parois. La mousse est un vecteur de molécules, c'est-à-dire que lorsque la mousse augmente dans le fermenteur, elle entraîne avec elle diverses molécules dont les enzymes et ces dernières restent collées à la paroi lorsque la mousse redescend. Si ce cycle se reproduit plusieurs fois, une quantité importante d'enzymes est perdue, ce qui fausse les résultats. La mousse peut aussi provoquer des problèmes de contamination. Effectivement, il faut impérativement empêcher la mousse d'atteindre le couvercle du fermenteur, car cela peut contaminer le milieu de culture et détruire complètement la flore bactérienne à l'étude par le remplacement de cette souche par une autre plus compétitive. Le couvercle étant composé de divers trous et d'entrées pour les sondes, les risques de contamination sont élevés. Bien que tout le fermenteur soit stérilisé préalablement avec le milieu de culture à l'intérieur, il reste toujours des risques de contaminations venant du couvercle.

Plusieurs options sont disponibles pour contrer l'augmentation de la mousse. L'utilisation d'un brise mousse (exemple : Fundafoam™) situé dans le couvercle du fermenteur est un moyen facile pour abaisser la quantité de mousse. En effet, le brise mousse est constitué d'un moteur qui fait tourner des pales à l'intérieur du fermenteur. Ces pales brisent les bulles de la mousse qui se retransforme en liquide et coule sur les parois pour retourner dans le milieu. Il est aussi possible

d'utiliser un antimousse (exemple : le Poly(propylène)glycol) qui peut être très efficace mais seulement pour une courte durée. En effet, il n'est pas recommandé d'utiliser de l'antimousse en grandes quantités puisque ce produit inhibe la croissance bactérienne.

L'agitation aussi peut causer certains problèmes. Pour maintenir la DO au-dessus du seuil de 20 %, il faut grandement augmenter l'agitation. Cela permet de conserver la DO élevée plus longtemps, mais pourrait aussi provoquer la dénaturation des enzymes si l'on considère tous les paramètres de fermentations (agitation élevée, aération élevée, température élevée en plus de la durée de l'expérience : 48 heures). Lors de la phase exponentielle de croissance des bactéries, l'oxygène contenu dans le milieu est rapidement assimilé et la DO diminue rapidement. Pour compenser cette baisse, l'agitation est augmentée. Vers le milieu de la phase exponentielle de croissance, il est possible que la DO tombe à zéro (0 %), ce qui signifie que les bactéries utilisent la totalité de l'oxygène disponible dans le milieu. Ce dernier contient de l'oxygène, mais il est pratiquement assimilé aussitôt qu'il est injecté dans le milieu. Il faut donc, à certains moments, augmenter l'agitation et risquer d'atteindre une vitesse qui serait dommageable pour les enzymes. Les remous que provoquent les pales de l'agitateur engendrent des tourbillons de matières qui entrent en collisions les uns avec les autres, provoquant de grandes pressions sur les molécules du milieu ainsi que sur les bactéries qui s'y trouvent. Les enzymes sont des molécules, des protéines de 10 kDa à 1 000 kDa et peuvent donc être brisées lors d'agitations trop élevées de même que les bactéries. Ceci peut alors engendrer une perte d'activité enzymatique qu'il est possible de voir lors de la mesure.

Pour pallier à ces problèmes, il faut essayer de les régler à la source. Le principal inconvénient de la fermentation à haute température est qu'il est difficile de conserver l'oxygène dissous au-dessus du seuil de 20 %. C'est le fait de contrer cette baisse d'oxygène dissous par l'augmentation de l'agitation et de l'aération qui cause plusieurs complications. Il faut donc trouver des moyens pour éviter la chute de la DO ou au moins de la conserver élevée le plus longtemps possible.

Pour augmenter la quantité d'oxygène dissous dans le milieu liquide, la température de croissance fut diminuée à 40 °C bien que la température optimale de croissance soit de 50 °C.

Cette méthode a permis de maintenir la DO au-dessus du seuil pour toute la durée de la fermentation (Figure 9) mais les mesures d'activités enzymatiques ont montré une baisse (Figure 10) comparativement à la fermentation à 50 °C (voir Article I, Figure 4). En effet, les bactéries ont produit des protéases moins efficaces, en termes de qualité ou de quantité, que lors de la fermentation faite à 50 °C. Les niveaux d'activités protéolytiques étaient plus élevés à la température optimale (Note : la souche B ne fut pas testée à cette nouvelle température de 40 °C car la décision fut prise de n'essayer que les deux meilleures souches; AC et D). La fermentation doit donc s'effectuer à l'optimum de température qui est de 50 °C. En sachant que l'oxygène dissous est un facteur important pour la production de protéases (Abdel-Hammed, 2001; Avignone-Rossa et al., 1992; Zouari et al., 2002), il est intéressant ici de remarquer que la température de fermentation optimale, 50 °C, est plus importante dans la production de protéases qu'une DO élevée. En effet, les valeurs d'activité protéolytique sont plus élevées lorsque la température est à l'optimum, mais que la DO est à zéro (0 %) que lorsque la température est plus faible (40 °C) mais que la DO est supérieure à 20 %. Les enzymes produites par ces bactéries sont plus limitées par la température de fermentation que par le pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu.

Une autre solution envisagée pour maintenir la DO au-dessus de 20 % serait d'injecter directement de l'oxygène à haute concentration au lieu de l'air ambiant stérile. Puisque l'air ambiant contient environ 19 % d'oxygène, l'injection d'air à presque 100 % permettrait sûrement de maintenir la DO à un niveau très haut sans avoir à augmenter l'agitation ou l'aération. Bien que cette méthode sera prochainement testée en laboratoire, ce n'est que dans le but de savoir si un intense apport en oxygène dans le milieu, occasionnant une DO très élevée, donnera une meilleure activité protéolytique qu'avec de l'air ambiant. Cette méthode est difficilement applicable à plus vaste échelle à cause des coûts occasionnés par l'achat d'immenses quantités d'oxygène (30 \$ pour 9.42 m³ (0.00318 \$/l); pour une fermentation de 48 heures à une aération moyenne de 4.00 l/min. (11 520 l) cela coûte 36.63 \$ pour seulement 10 l de milieu). Même au niveau du laboratoire les coûts seraient insoutenables pour une longue période de temps. D'autres processus seront à l'étude afin de minimiser les effets de la température et pour améliorer la production d'enzymes. La modification de l'injecteur d'air pourrait améliorer sa diffusion en injectant beaucoup de petites bulles au lieu du présent système qui laisse échapper de

grosses bulles qui se répartissent mal dans tout le milieu. L'ajout de plusieurs injecteurs d'air pourrait aussi améliorer la quantité d'oxygène dissous.

CHAPITRE 7 CONCLUSION

Bien que la production d'enzymes thermostables par des bactéries thermophiles engendre certains problèmes, il faut remarquer que cette production est aussi efficace sinon supérieure à la production d'enzymes par des bactéries mésophiles. Les bactéries thermophiles produisent des enzymes d'une force atteignant 5.25 UI/ml après 12 heures en fermenteurs de 15 l et les bactéries mésophiles produisent des enzymes d'une force atteignant 1.35 UI/ml après 36 heures de fermentation en fioles Erlenmeyers de 500 ml. Malheureusement, il est impossible de comparer des bactéries différentes surtout lorsque les conditions de cultures sont différentes. Il a aussi été démontré que les fermentations pour produire des enzymes sont aussi efficaces et même supérieures dans des milieux alternatifs que dans les milieux synthétiques conventionnels. Des économies substantielles peuvent être obtenues si le milieu de culture est changé pour un milieu à base de boues d'épuration ou d'eaux usées de différentes sources. Le futur « projet enzyme » portera justement sur la production des enzymes thermostables par des bactéries thermophiles dans divers types de milieux alternatifs. Il existe bien des sortes de rejets industriels ou municipaux qui pourraient facilement supporter la croissance de bactéries et ainsi produire des enzymes à faibles coûts. Ceci permettrait aux industries de passer d'un processus chimique polluant vers un processus biologique et écologique permettant d'éliminer les rejets et ainsi, de préserver les écosystèmes planétaires.

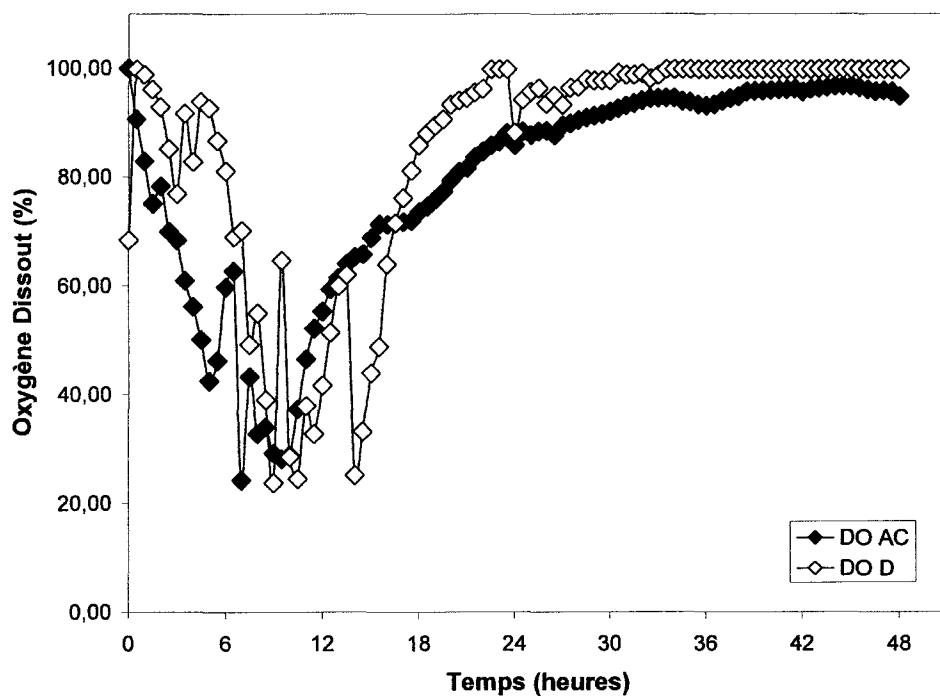


Figure 9: Profils de l'oxygène dissout (DO) pour les souches AC et D lors d'une fermentation de 48 heures à 40 °C en fermenteur de 15 l (volume de travail de 10 l) dans un milieu synthétique.

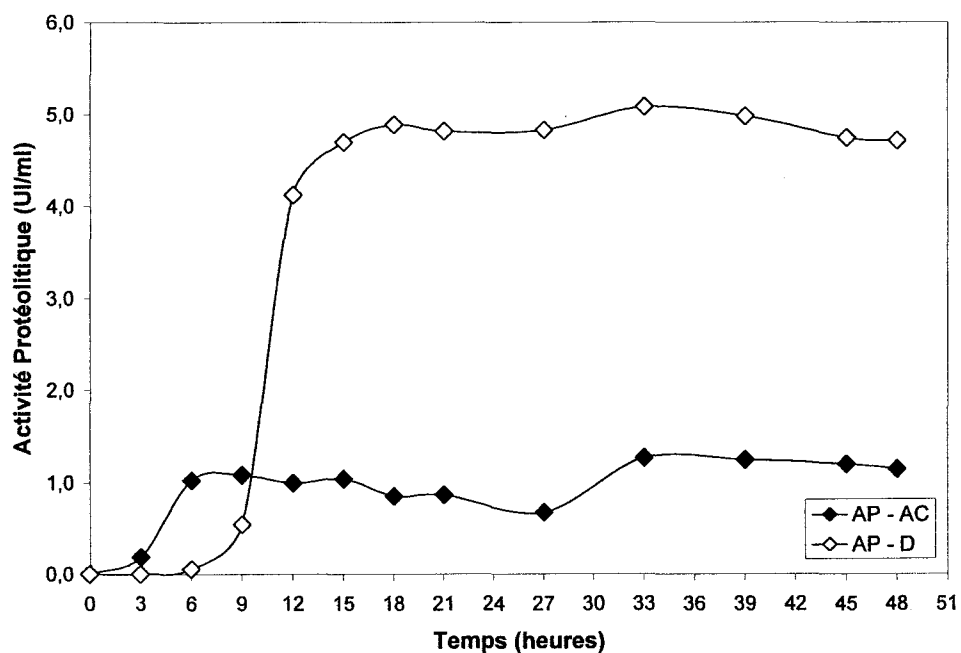


Figure 10: Activités enzymatiques des souches AC et D lors d'une fermentation de 48 heures à 40°C en fermenteur de 15 l (volume de travail de 10 l) dans un milieu synthétique.

RÉFÉRENCES

- Abdel-Hammed A. 2001. Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ -endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 17: 857-861
- Anwar, A. and M. Saleemuddin. 1998. Alkaline proteases : a review. *Bioresource Technology*. 64 :175-183.
- Avignone-Rossa C, Arcas J, and Mignone C. 1992. *Bacillus thuringiensis*, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8:301-304
- Balaban, NP, Sharipova MR, Gabdrakhmanova LA, Mardanova AM, Tokmakova YS, Sokolova EA, Rudenskaya GN, and Leshchinskaya IB. 2003. Synthesis and Secretion of Proteinases by *Bacillus intermedius* in the Late Stages of Sporulation. *Microbiology*. 72:295–299
- Banerjee U.C., R.K. Sani, W. Azmi and R. Soni. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*. 35:231-219.
- Barnabé, S., J.-L. Sasseville, R.D. Tyagi and J.R. Valéro. 2003. Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières? *Vecteur Environnement*. 36-2:50-62
- Beg, Q. K., R. K. Saxena and R. Gupta. 2002. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. *Process Biochemistry*. 37:1103–1109.
- Beg, Q. K., V. Sahai and R. Gupta. 2003. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 39:203-209.
- Ben MA, Mhiri S, Mezghani M, Bejar S. 2001. Purification and sequence analysis of the atypical altohexaose-forming α -amylase of the *B. stearothermophilus* US100. *Enzyme Microb Technol*. 28:537-542.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18:355–383.
- Biologie, Cégep Ste-Foy. 2004.
<http://ici.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/sf901/index901.htm>
- BioMérieux. 2004. API 20E. BioMérieux Inc. USA.
- Büchs, J., 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem. Eng. J.* 7(6):91-98.

- Bulla L. A., D.B. Bechtel, K.J. Kramer, Y.I. Shethna, A.I. Aronson, and P.C. Fitz-James. 1980. Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Microbiol.* 8:147-204.
- Braun S. 2000. Bioassays of *Bacillus thuringiensis*, 1D. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental uses. 2000. In: Navon A., Ascher K.R.S (Eds.), Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. *CAB International*. 49-72
- Burhan, A., U. Nisa, C. Gökhan, C. Ömer, A. Ashabil and G. Osman. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6. *Process Biochemistry*. 38:1397-1403.
- Calam, C.T., 1986. Shake-Flasks Fermentations. Manual of Industrial Microbiology. *American Society of Microbiology*. Washington, DC, 59-63.
- Cheetham, P. S. J. 1998. What makes a good biocatalyst?. *Journal of Biotechnology*. 66:3-10.
- Cherry, J. R. and A. L. Fidantsef. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*. 14:438-443.
- Chu IM, Lee C, and Li TS. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. 1992. *Enzyme Microbiol. Technol.* 14:755-761.
- Cowan D. 1996. Industrial enzyme technology. *Trends Biotechnol*; 14(6):177-8.
- Dale, B.E. 1999. Biobased industrial products : bioprocess engineering when cost really counts. *Biotechnol. Prog.* 15:775-776.
- Deacon, J. The Microbial World: Thermophilic microorganisms. 2004. Institute of Cell and Molecular Biology. The University of Edinburgh.
<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/thermo.htm>
- De Azeredo, L. A. I., D. M. G. Freire, R. M. A. Soares, S. G. F. Leite and R. R. R. Coelho. 2004. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces sp.* isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*. 34:354-358.
- Demain, A.L. 2000. Small bugs, big business : The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances*. 18:499-514.
- Duedahl-Olesen L, Kragh KM, Zimmermann W. 2000. Purification and characterisation of a altooligosaccharide-forming amylase activity at high pH from *Bacillus clausii* BT-21. *Carbohydr Res.* 329(1):97-107.
- Durham DR, Stewart DB, Stellwag EJ. 1987. Novel alkaline and heat stable serine proteases from alkaliphilic *Bacillus sp.* strain EX6638. *J Bacteriol.* 169:2762-8.

Elibol, M. and A. R. Moreira. 2003. Production of extracellular alkaline protease by immobilization of the marine bacterium *Teredinobacter turnirae*. *Process Biochemistry*. 38:1445-1450.

Faletra, P., 2004. Molecular Biology Archives. Department of Energy. USA. <http://www.newton.dep.anl.gov/askasci/mole00/mole00150.htm>

Ferrero, M. A., G. R. Castro, C. M. Abate, M. D. Baigori and F. Siñeriz. 1996. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 45:327-332.

Germano, S., A. Pandey, C. A. Osaku, S. N. Rocha and C. R. Soccol. 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 32:246-251.

Gessesse A, Gashe BA. 1997. Production of alkaline protease by an alkalophilic bacteria isolated from an alkaline soda lake. *Biotechnol Lett*. 19(5):479-81.

Gonçalves, A. R., E. Esposito and P. Benar. 1998. Evaluation of *Panus tigrinus* in the delignification of sugarcane bagasse by FTIR-PCA and pulp properties. *Journal of Biotechnology*. 66:177-185.

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

Gupta, R., Q. K. Beg, S. Khan and B. Chauhan. 2002b. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60 :381-395.

Hameed A, Keshavarz T, Evans CS. 1999. Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *J Chem Technol Biotechnol* 74:5-8

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

Herbst, H., Schumpe, A., Deckwer, W., 1992. Xanthan production in stirred tank fermentors: oxygen transfer and scale-up. *Chem. Eng. Technol*. 15, 425_ 434.

Horikoshi K. 1971. Production of alkaline amylases by alkaliphilic microorganisms. II. Alkaline mylase produced by *Bacillus* No. A-40_ 2. *Agric Biol Chem*; 35:1783_ 91.

Hunter-Cevera, J. C. 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, 1 :278-285.

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

Kalisz, M.M. 1988. Microbial proteinases. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 36 :1-65.

Karp, G. 1998. *Biologie cellulaire et moléculaire*. DeBoeck Université. Bruxelles. 773 pp.

Kirk, O., T. V. Borchert and C. C.Fuglsang. 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 :345–351.

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

Manachini PL, Fortina MS, Parini C. 1998. Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermorubber*: a new species of *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 28(4–5):409–13

McKane, L et Kandel, J. 1996. *Microbiology : essentials and applications*. McGraw-Hill, New York, USA, p.843.

McTigue MA, Kelly CT, Doyle EM, Fogarty WM. 1995. The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus sp.* IMD 370. *Enzyme Microb Technol*; 17:570_ 3.

Mehrotra, S., P. K. Pandey, R. Gaur and N.S. Darmwal.1999. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. *Bioresource Technology*, 67 :201-203.

Meunier, N. 1999. Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences, maîtrise en Sciences de l'eau. INRS-EAU. Québec. 168 pp.

Miller, J. A. Jr and V. Nagarajan. 2000. The impact of biotechnology on the chemical industry in the 21st century. *TIBTECH*, 18:190-191.

Nobel e-Museum. 2004. Nobel Prize. Eduard Buchner
<http://nobelprize.org/chemistry/laureates/1907/>

NRC. 1999. *Biobased industrial products: priorities for research and commercialization*. United States National Research Council, National Academy Press, Washington, United States of America, 144 p.

Ole, K., T.V. Borchert and C.C. Fuglsang. 2002. Industrial enzymes applications. *Current opinion in Biotechnology*. 13:345-351.

Outtrup, H., D.A. Aaslyng, C. Dambmann and S. Patkar. 1997. Detergent enzymes. *Biotechnology Advances*. 15:200-200

- Pelmont, J. 1993. Bactéries et Environnement: Adaptation Physiologiques. Presses Universitaires de Grenoble. 899p.
- Priest, F. G., 1977, Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.*, 41,711-753
- Reyes, C., C. Peña, E. Galindo. 2003. Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biotechnology*, 105 :189-198.
- Royal Veterinary and Agricultural University. 2000. Department of Ecology. Section of Genetics and Microbiology. Copenhagen, Denmark. <http://www.ecol.kvl.dk/~sto/stress/Projects3.html>
- Rubingh, D. N. 1997. Protein engineering from a bioindustrial point of view. *Current Opinion in Biotechnology*, 8 :417-422.
- Sadek, M. 2000. Études des protéases bactériennes dans les boues d'eaux usées. Travail dirigé I. INRS-ETE. 1-32
- Salamitou S, Marchal M, and Lereclus D. 1996. *Bacillus thuringiensis* : un pathogène facultatif. *Annales de l'institut pasteur/actualité*, 7, 285-296
- Sampath P, Subramanian C, Chandrakasan G. 1997. Extracellular proteases from *Streptomyces* spp. G157: purification and characterization. *Biotechnol Appl Biochem* ;26:85-90.
- Sharipova MR, Balaban NP, Gabdrakhmanova LA, Shilova MA, Kadyrova YM, Rudenskaya GN, and Leshchinskaya IB. 2002. Hydrolytic Enzymes and Sporulation in *Bacillus intermedius*. *Microbiology*, 71, 420-424
- Sharma, R., Y.Chisti and U. C. Banerjee. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19 :627-662.
- Siebert, M.L. and D.F. Toerien. 1968. The proteolytic bacteria present in the anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Research*. Pergamon Press. 3:241-250
- Sikati-Foko, V., A.S.Vidyarthi, R.D. Tyagi et J.R. Valéro. 2001. Synthèse des protéases extracellulaires à partir des boues d'épuration par quelques espèces de *Bacillus*. INRS-ETE, 22 p.
- Snyder, L. and W. Champness. 1997. Molecular genetics of bacteria. American Society for Microbiology. Massachusetts. 504 pp.
- Srivastava RAK. 1987. Purification and chemical characterization of thermostable amylases produced by *Bacillus stearothermophilus* . *Enzyme Microb Technol*;9:749_ 54.
- Strauch MA, and Hoch JA. 1993. Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential phase gene expression. *Molecular Microbiology*, 7, 337-342

- Szekeres, A., L. Kredics, Z. Antal, F. Kevei and L. Manczinger. 2004. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiology Letters. 233:215-222
- Takami H, Akiba T, Horikishi K. 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. Appl Microbiol Biotechnol; 30:120-4.
- Takii Y, Kurivama N, Suzuki Y. 1990. Alkaline serine protease produced from citric acid by *Bacillus alcalophilus* sub sp. *halodurans* KP-1239. Appl Microbiol Biotechnol; 34:157-62.
- Tan Y, and Donovan WP. 2000. Deletion of *aprA* and *nprA* genes for alkaline protease A and neutral protease A from *Bacillus thuringiensis*: effect on insecticidal crystal proteins. *Journal of Biotechnology*, 84, 67-72
- Tirado-Montiel ML, Tyagi RD and Valero JR. 2001. Wastewater treatment sludge as raw material for *Bacillus thuringiensis* production. Water Res. 31 (16), 3807-3816
- Tirado-Montiel ML, Tyagi RD, Valero JR, and Surampalli RY. 2003. Production biopesticides using wastewater sludge as a raw material – Effect of process parameters. *Water Science and technology*, 48, 239-246
- Tyagi RD, Sikati Foko V, Barnabé S, Vidyarthi A, and Valéro JR. 2002. Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using wastewater as a raw material. *Water Science and Technology*, 46, 247-254
- van Beilen, J. B. and Z. Li. 2002. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 :338-344.
- van Suijdam, J.C., Kossen, N.W.F., Joha, A.C., 1978. Model for oxygen transfer in a shake flask. *Biotechnol. Bioeng.* 20, 1695-1709.
- Vardar-Sukan, F. 1998. Foaming: consequences, prevention and destruction. *Biotechnology Advances*, 16 (516) :913-948.
- Verstraete, W. 2002. Environmental biotechnology for sustainability. *Journal of Biotechnology*. 94:93-100
- Vidyarthi, A.S., R.D. Tyagi, J.R. Valéro, R.Y. Surampalli. 2002. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research*. 36:4850-4860
- Zouari N, and Jaoua S. Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain on gruel-based media. *Enzyme and Microbial Technology* 1999, 25, 364-371

Zouari N, Ben Sik Ali S, and Jaoua S. 2002. Production of delta-endotoxins by *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various insecticidal activities towards lepidoptera and diptera in gruel and fish meal media. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 411-418

Zumdahl, S. S., 1998. Chimie des solutions, 2^{ème} édition. Les Éditions CEC inc. Anjou. 442 pp.
[Authors]. 1997. The Use of Nug Meal as a Low-Cost Substrate for the Production of Alkaline Protease by the alkaliphilic *Bacillus sp.* AR-009 and some Properties of the Enzyme. *Bioresource Technology*, 62 :59-61.