

Université du Québec
INRS-Eau

Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes
à partir de boues d'épuration municipales

par
Nathalie Meunier
B. Sc. Biochimie

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

Jury d'évaluation

Examineur Externe

Monsieur Marc C. Lavoie
Département de biochimie
Université Laval

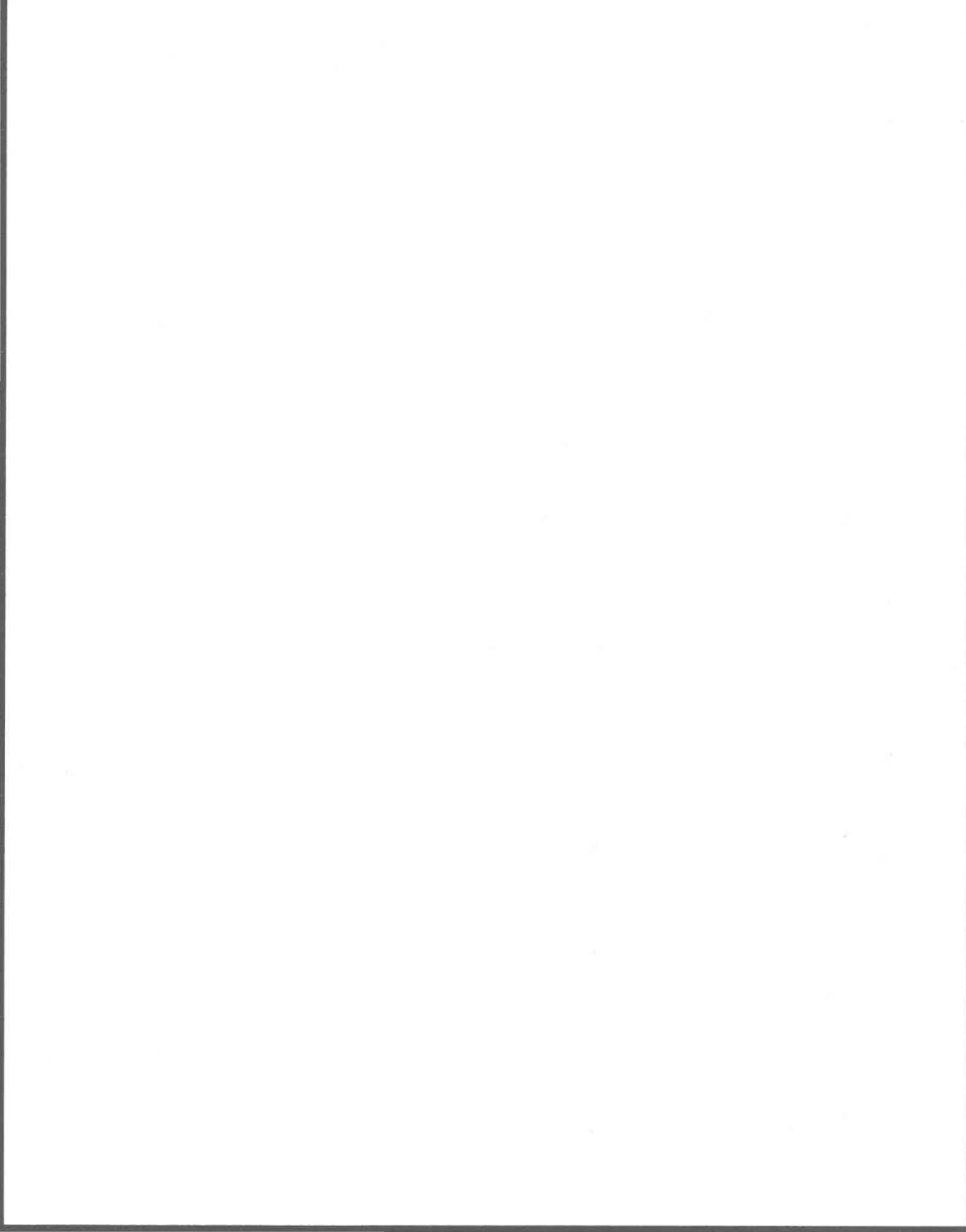
Examineur Interne

Monsieur José Valéro
Centre de Foresterie des
Laurentides
Ressources Naturelles Canada

Directeur de recherche

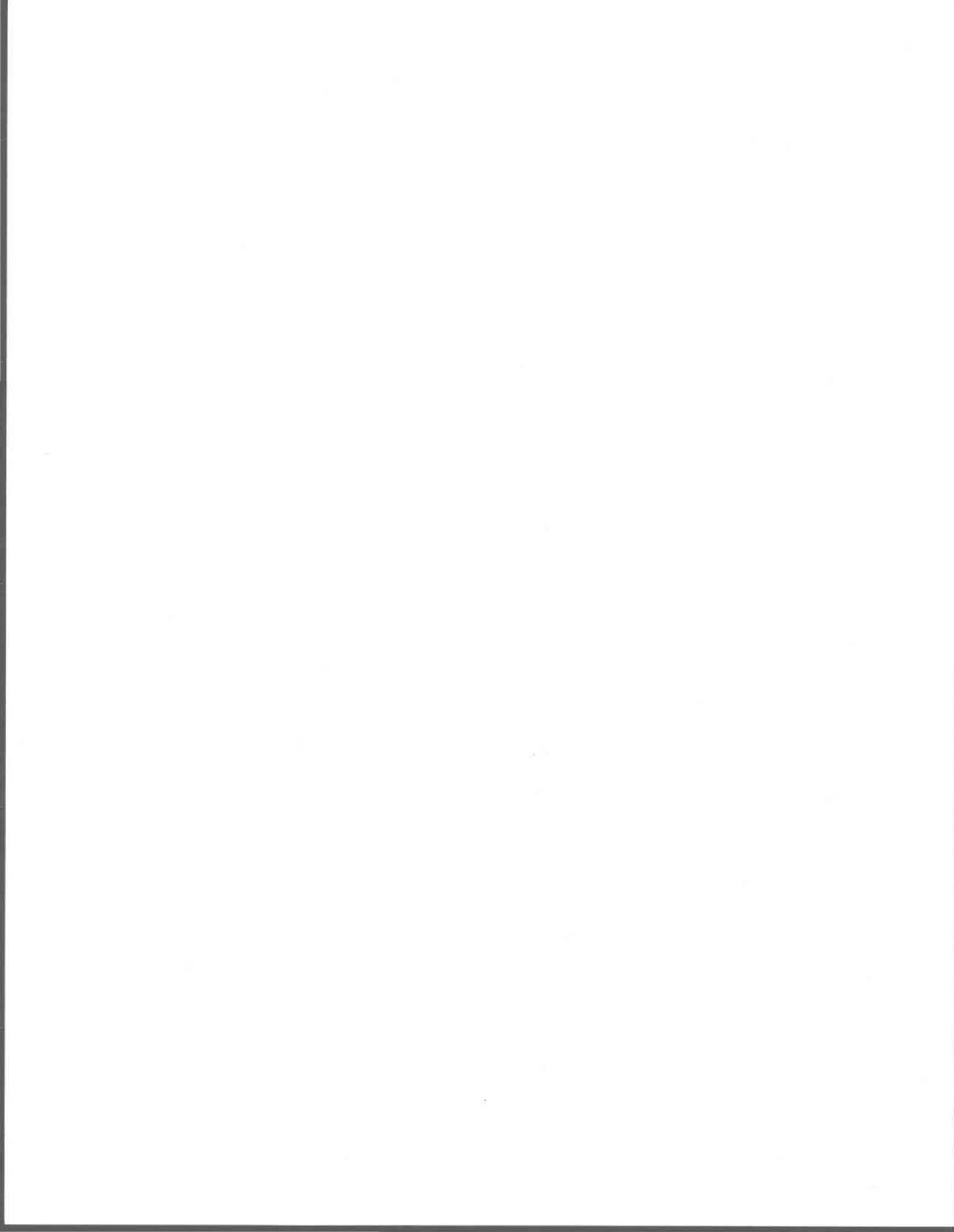
Monsieur Rajeshwar D. Tyagi
INRS-Eau
Université du Québec

mai 1999



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier spécialement le professeur R.D. Tyagi mon directeur de thèse. J'ai apprécié sa disponibilité de tout instant et l'encouragement qu'il m'a apporté tout au long de mes travaux. Je remercie également les professeurs J. Valéro et M.C. Lavoie pour leur appui, ainsi que pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire. Je voudrais également témoigner de ma gratitude envers mes collègues étudiants pour leur précieux encouragement et leur excellent esprit d'équipe. Une grande reconnaissance également au personnel de l'INRS-Eau, le dévouement à leur travail leur fait honneur. J'aimerais aussi remercier tout particulièrement mon mari, Jean-François, pour le soutien moral et l'aide qu'il m'a apporté tout au long de mes études. Finalement, je remercie l'INRS-Eau pour son soutien financier.



RÉSUMÉ

Le présent projet de recherche vise à produire des protéases à partir des boues d'épuration municipales. L'intérêt de ces travaux est double puisque, dans un premier temps, il s'agit de produire des protéases à des coûts de production moindre en misant sur les éléments nutritifs que contiennent les boues d'épuration municipales au lieu des milieux de culture synthétiques habituellement utilisés dans l'industrie des protéases. En second lieu, il vise à recycler un sous-produit issu du traitement des eaux usées et dont la disposition est généralement coûteuse.

Ce projet comporte deux étapes principales. Dans un premier temps, il s'agit de faire croître des microorganismes reconnus comme producteurs de protéases alcalines en utilisant les boues d'épuration municipales comme milieu de culture. Dès lors, une évaluation des protéases produites peut être effectuée en tenant compte du rendement de production et de l'activité protéolytique par rapport à une préparation enzymatique équivalente déjà produite et commercialisée sur une base importante. Dans un deuxième temps, un modèle informatisé est élaboré afin de déterminer les coûts de production associés à cette nouvelle approche technologique et, pour définir les critères de performance à atteindre pour une commercialisation éventuelle de ce procédé.

Les travaux de production d'enzymes protéolytiques ont démontré que la croissance des microorganismes producteurs de protéases dans les boues d'épuration est comparable à celle obtenue en milieu synthétique. De plus, les boues possèdent l'ensemble des éléments nutritifs requis pour la production de protéases. Toutefois, un apport exogène de source de carbone facilement assimilable, tels que la dextrine, le glucose ou la mélasse, permet d'augmenter les rendements de production des protéases alcalines.

Les caractéristiques des boues utilisées pour la production de protéases semblent également être un paramètre à considérer. Ainsi, les résultats obtenus suggèrent qu'il est préférable d'opter pour des boues secondaires ayant un contenu en solides élevé (environ 20 g/L de solides totaux) afin de ne pas avoir de carence en éléments nutritifs et en substrats organiques pour une croissance microbienne optimale.

Les résultats ont également fait état qu'une addition exogène d'azote ammoniacal inhibe la production des enzymes protéolytiques, alors qu'un ajout d'une source protéique (farine de soya) aux boues n'affecte pas notablement la production des protéases.

La stabilisation du pH du milieu dans les gammes optimales de production des protéases par les microorganismes constitue l'une des principales difficultés rencontrées dans cette recherche. L'addition d'un tampon fort, tel que le tampon phosphate (PBS 0,1M), a permis de résoudre en partie ce problème. L'emploi du tampon borate est déconseillé, puisque les résultats obtenus suggèrent que celui-ci affecte négativement la production des protéases.

L'utilisation du modèle d'évaluation technico-économique conçu sur chiffrier électronique développé dans le cadre de ce projet a permis d'évaluer l'intérêt financier de produire des protéases alcalines à partir des boues d'épuration municipales (**BOUE**) en comparaison à un

procédé usuel de production utilisant un milieu synthétique (**CONV**). Les simulations effectuées considèrent, pour les deux procédés, une production maximale de 6,0 U.I./mL obtenue après 48 heures de fermentation.

Dans le cas du procédé **CONV**, les coûts globaux de production de protéases ont été évalués respectivement à 257, 162 et 108 \$Can/M.U.I. pour les capacités de production de 55 000, 165 000 et 550 000 M.U.I./an. Pour ce qui est du procédé **BOUE**, les coûts de production ont été estimés à 235, 140 et 87 \$Can/M.U.I. En terme de coûts globaux de production par masse de protéines produites, des coûts de 283, 178 et 119 \$Can/kg ont été mesurés pour le procédé **CONV**, alors que pour le procédé **BOUE**, ceux-ci ont été établis à respectivement 259, 154 et 95 \$Can/kg.

Ainsi, la comparaison des coûts de production des deux procédés, pour les capacités de production de 55 000, 165 000 et 550 000 M.U.I./an, montre que le procédé **BOUE** permettrait une économie de respectivement 7,7, 12,3 et 18,5 % par rapport au procédé **CONV**. La différence entre les deux procédés est principalement notée au niveau des coûts directs d'opération (économie en produits chimiques), pour lesquels le procédé **BOUE** présente une économie de 20,1, 29,1 et 38,3 % par rapport au procédé **CONV**.

Ces comparaisons sont toutefois basées sur les scénarios de simulation utilisés, pour lesquels des rendements de production d'enzymes identiques (6,0 unités enzymatiques par millilitre de milieu de culture après fermentation) ont été utilisés. Dans la mesure où le procédé **BOUE**, permettrait un rendement de production non semblable, les économies réalisées seraient inévitablement différentes. Ainsi, en utilisant le modèle il est possible d'évaluer le rendement de production d'unités enzymatiques minimal pour que le procédé **BOUE** soit plus économique que le procédé **CONV**.

Par exemple, pour des usines de fermentation produisant respectivement 55 000, 165 000 et 550 000 M.U.I./an, des rendements de production (activité enzymatique dans le milieu de culture après fermentation) minimaux de 5,54, 5,26 et 4,89 U.I./mL sont requis. Ces valeurs montrent que pour être plus économique que le procédé **CONV**, le procédé **BOUE** doit fournir un rendement de production supérieur ou équivalent, selon les cas, de 82 à 92 % de celui du procédé conventionnel utilisé dans l'industrie de production de protéases alcalines.


Nathalie Meunier
(étudiante)

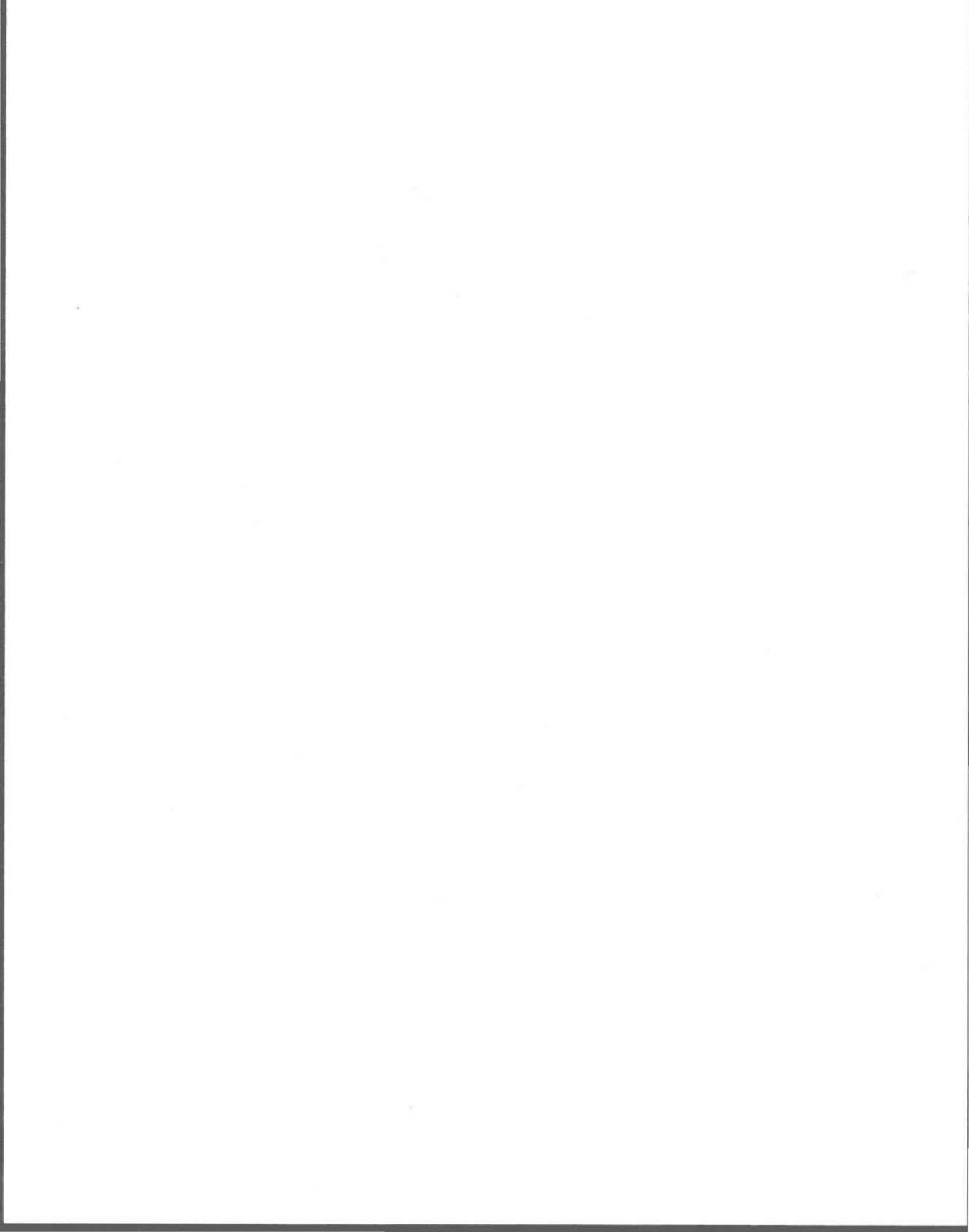

Rajeshwar D. Tyagi
(directeur de recherche)

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xv
INTRODUCTION	1
1 INDUSTRIE ENZYMATIQUE	3
1,1 Définition, rôle et action des enzymes	3
1,2 Mesure de l'activité enzymatique	7
1,3 Origine des enzymes industrielles	10
1,4 Développement de l'industrie des enzymes	11
1,5 Applications industrielles des enzymes	13
1,5,1 Alcools, bières, vins et boissons fruitées	14
1,5,2 Aliments fermentés orientaux	16
1,5,3 Glucoserie	16
1,5,4 Alimentation animale	17
1,5,5 Boulangerie et pâtisserie	17
1,5,6 Produits laitiers	18
1,5,7 Protéines	18
1,5,8 Textiles	19
1,5,9 Tannerie	19
1,5,10 Pâtes et papiers	20
1,5,11 Détergents	20
1,5,12 Graisses et huiles, hygiène corporel et autres	21
1,6 Importance économique de l'industrie enzymatique	21
2 ENZYMES PROTÉOLYTIQUES	25
2,1 Nature et provenance des protéases	25
2,2 Types de protéases microbiennes	27
2,2,1 Protéases sérines	27
2,2,1,1 Subtilisin Carlsberg	27
2,2,1,2 Subtilisin Novo	29
2,2,1,3 Protéases de <i>Bacillus alcalophilus</i>	30
2,2,2 Métallo-protéases	31
2,2,3 Protéases acides	33
2,2,3,1 Protéases d' <i>Aspergillus niger</i>	34
2,2,3,2 Protéases d' <i>Aspergillus oryzae</i>	35
2,2,3,3 Protéases de <i>Mucor</i> spp.	36
2,2,3,4 Protéases d' <i>Endopathia parasitica</i>	38
2,3 Applications industrielles des protéases	39
2,3,1 Détergents	41
2,3,2 Présures microbiennes	43
2,3,3 Tannerie	44
2,3,4 Boulangerie	47
2,3,5 Brasserie	48
2,3,6 Attendrissement des viandes	49
2,3,7 Hydrolyse des protéines	50
2,3,8 Autres applications	50

2,4 Méthodes de production des protéases	51
2,4,1 Fermentation semi-solide	51
2,4,2 Fermentation liquide	52
2,5 Milieux de culture pour la production de protéases	55
2,6 Extraction et purification des protéases	57
2,7 Standardisation et contrôle de l'activité protéolytique	60
2,8 Procédés brevetés de production de protéases alcalines	61
2,8,1 Brevet américain no. 3 838 009	61
2,8,2 Brevet américain no. 3 748 233	63
2,8,3 Brevet américain no. 3 576 719	64
2,8,4 Brevet américain no. 4 052 262	65
2,9 Hypothèse de recherche	67
2,10 Objectifs spécifiques de recherche	67
3 PROCESSUS MÉTHODOLOGIQUE	69
3,1 Microorganismes producteurs de protéases	69
3,2 Milieux de culture	69
3,2,1 Milieu pour l'entretien et la conservation des souches microbiennes	69
3,2,2 Milieu synthétique pour la production de protéases	70
3,2,3 Milieux à base de boues d'épuration pour la production de protéases	71
3,3 Essais de production de protéases	73
3,4 Dénombrement des microorganismes producteurs de protéases	75
3,5 Mesure de l'activité protéolytique	75
3,5,1 Préparation de la caséine	75
3,5,2 Préparation des solutions enzymatiques	75
3,5,3 Réaction enzymatique	76
3,5,4 Mesure de l'activité enzymatique	76
3,6 Mesures analytiques	77
4 TESTS ET VALIDATION DE LA MÉTHODE DE MESURE DES PROTÉASES	79
4,1 Courbes d'étalonnages de tyrosine	79
4,2 Solution enzymatique standard	80
4,3 Comparaison des méthodes de lecture de l'activité protéolytique	80
4,4 Tests de co-précipitation caséine-tyrosine	81
5 TESTS DE PRODUCTION DE PROTÉASES	85
5,1 Tests initiaux de production de protéases en milieu synthétique	85
5,2 Première étude comparative de la production de protéases dans le milieu synthétique et les boues d'épuration	89
5,3 Étude de l'effet de la composition du milieu	97
5,4 Étude de l'effet de la source de carbone	101
5,5 Étude de l'effet de l'apport d'azote	108
5,6 Étude de l'effet du tampon	114
6 ÉVALUATION TECHNICO-ÉCONOMIQUE DE LA PRODUCTION DE PROTÉASES	123
6,1 Description des procédés de production de protéases	124
6,1,1 Étape de fermentation	124
6,1,2 Étape de séparation de la biomasse	125
6,1,3 Étape d'extraction et de récupération des protéases	126
6,1,4 Étape de gestion de la biomasse	126
6,2 Définition des variables de simulation	127
6,3 Description des scénarios de simulation	132

6,4 Bilans massiques et volumiques	133
6,4,1 Étape de fermentation	134
6,4,2 Séparation de la biomasse	134
6,5 Dimensionnement des équipements	134
6,6 Coûts en capitaux	135
6,6,1 Coûts directs	135
6,6,1,1 Fermentation	136
6,6,1,2 Séparation de la biomasse	136
6,6,1,3 Extraction et récupération	137
6,6,2 Coûts indirects	141
6,6,3 Frais de gestion de construction et frais contingents	141
6,7 Coûts de production	142
6,7,1 Coûts directs	142
6,7,1,1 Matériaux bruts (produits chimiques)	145
6,7,1,2 Main-d'œuvre d'opération	145
6,7,1,3 Supervision et main-d'œuvre de bureau	146
6,7,1,4 Utilités	146
6,7,1,5 Entretien et réparation	148
6,7,1,6 Matériaux courants	148
6,7,1,7 Frais de laboratoire	148
6,7,2 Coûts indirects	149
6,7,2,1 Taxes et assurances	149
6,7,2,2 Dépenses générales	149
6,7,3 Coûts généraux	149
6,7,3,1 Administration	150
6,7,3,2 Distribution et ventes	150
6,7,3,3 Recherche et développement	150
6,7,4 Autres coûts de production	150
6,7,4,1 Financement	150
6,7,4,2 Amortissement	151
6,7,4,3 Royautés	151
6,8 Flux monétaire	151
6,8,1 Production et durée d'opération	151
6,8,2 Revenus d'opération	151
6,8,3 Coûts de production	152
6,8,4 Revenu net avant imposition	152
6,8,5 Imposition	152
6,8,6 Revenu net total	153
6,8,7 Coûts en capitaux	153
6,8,7,1 Investissement total	153
6,8,7,2 Valeur résiduelle des équipements	153
6,8,7,3 Dotation à l'amortissement	153
6,8,7,4 Gestion de l'inventaire	154
6,8,7,5 Fonds de roulement	154
6,8,8 Flux monétaire net et rendement interne sur l'investissement	154
6,9 Comparaison technico-économique des procédés de production de protéases alcalines	157
CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	159
BIBLIOGRAPHIE	163

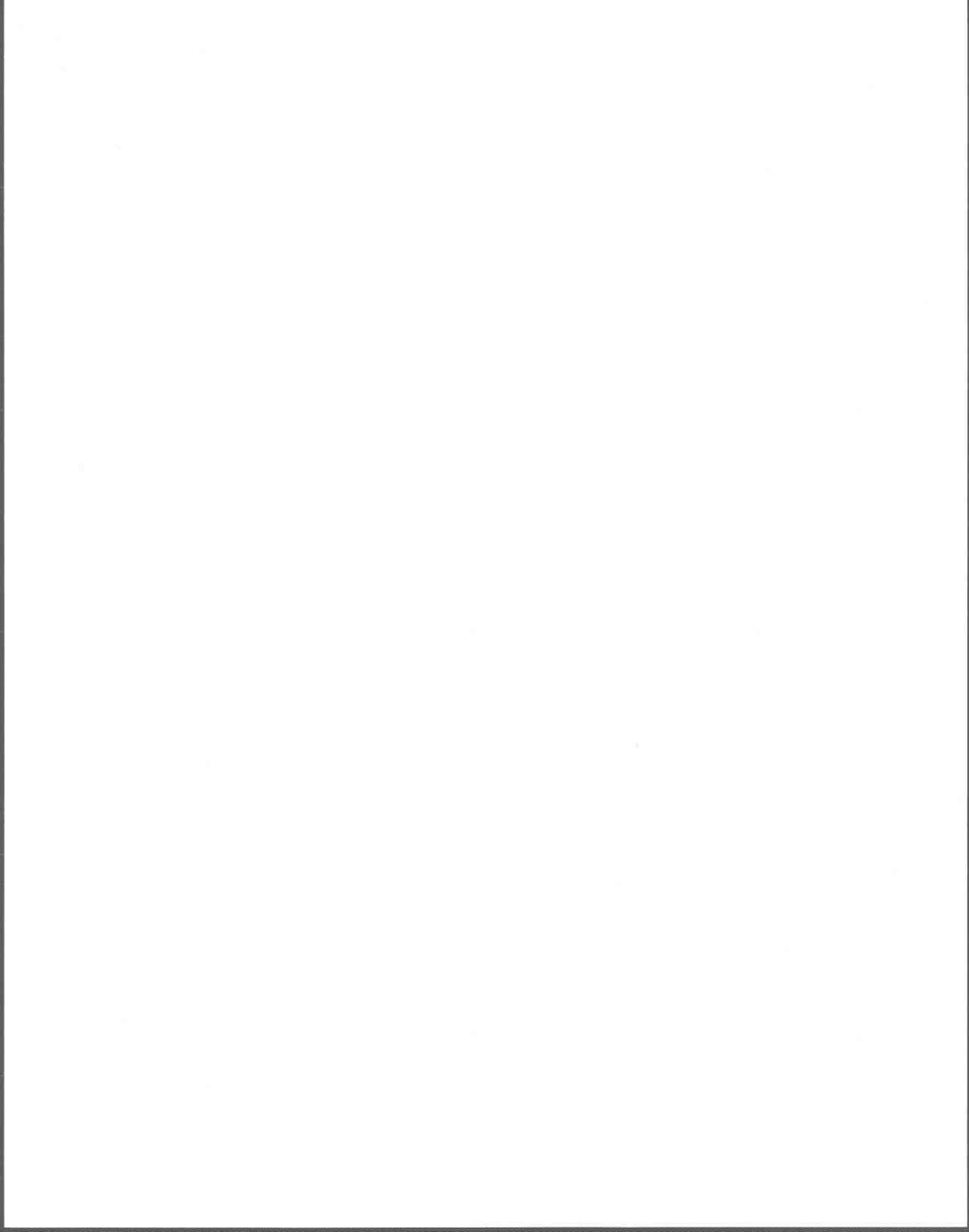


LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1</i>	<i>Enzymes présentes chez <i>Aspergillus oryzae</i> (Simon et Meunier, 1970)</i>	5
<i>Tableau 2</i>	<i>Principales classes d'enzymes</i>	6
<i>Tableau 3</i>	<i>Exemples d'enzymes industrielles et de microorganismes producteurs</i>	14
<i>Tableau 4</i>	<i>Préparation d'aliments orientaux selon le produit ensemencé et les moisissures utilisés</i>	16
<i>Tableau 5</i>	<i>Marché mondial des enzymes industrielles en 1996</i>	22
<i>Tableau 6</i>	<i>Production d'enzymes industrielles (Aunstrup et al., 1979)</i>	23
<i>Tableau 7</i>	<i>Utilisation des protéases d'origine végétale et animale</i>	26
<i>Tableau 8</i>	<i>Métabolites d'intérêt commercial produits par <i>Bacillus licheniformis</i></i>	28
<i>Tableau 9</i>	<i>Propriétés physiques de Subtilisin Carlsberg et Subtilisin Novo</i>	30
<i>Tableau 10</i>	<i>Propriétés des métallo-protéases de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> et <i>Bacillus thermoproteolyticus</i></i>	33
<i>Tableau 11</i>	<i>Protéases utilisées commercialement selon leur nom commercial, leur source microbienne et leur fabricant (Aunstrup et al., 1980)</i>	40
<i>Tableau 12</i>	<i>Milieux de culture utilisés à l'échelle industrielle pour la production de protéases (composition en g/L)</i>	56
<i>Tableau 13</i>	<i>Différentes méthodes d'extraction des enzymes (Aviron-Violet et al., 1982)</i>	58
<i>Tableau 14</i>	<i>Résumé des résultats obtenus par Fukumoto et al. (1974)</i>	62
<i>Tableau 15</i>	<i>Résumé des résultats obtenus par Viccaro (1973)</i>	64
<i>Tableau 16</i>	<i>Résumé des résultats obtenus par Murao (1971)</i>	65
<i>Tableau 17</i>	<i>Résumé des résultats obtenus par Horikoshi et Ikeda (1977)</i>	66
<i>Tableau 18</i>	<i>Caractéristiques physico-chimiques du milieu synthétique avec tampon PBS 0,1M</i>	70
<i>Tableau 19</i>	<i>Teneurs en métaux et autres éléments dans le milieu synthétique avec tampon PBS 0,1M</i>	71
<i>Tableau 20</i>	<i>Caractéristiques physico-chimiques des boues d'épuration de Valcartier et de la CUQ</i>	72
<i>Tableau 21</i>	<i>Teneurs en métaux et autres éléments dans les boues d'épuration de Valcartier et de la CUQ</i>	72
<i>Tableau 22</i>	<i>Conditions opératoires des groupes d'essais de production de protéases</i>	74
<i>Tableau 23</i>	<i>Absorbance mesurée à 275 nm selon les concentrations en tyrosine</i>	79
<i>Tableau 24</i>	<i>Synthèse des principaux résultats de la littérature portant sur la production de protéases alcalines</i>	86
<i>Tableau 25</i>	<i>Activité enzymatique maximale de protéases lors des tests initiaux en milieu synthétique</i>	87
<i>Tableau 26</i>	<i>Production maximale de protéases lors des premiers tests comparatifs en milieu synthétique et dans les boues secondaires de Valcartier</i>	91
<i>Tableau 27</i>	<i>Production maximale de protéases lors des premiers tests comparatifs en milieu synthétique et dans les boues de la CUQ</i>	94

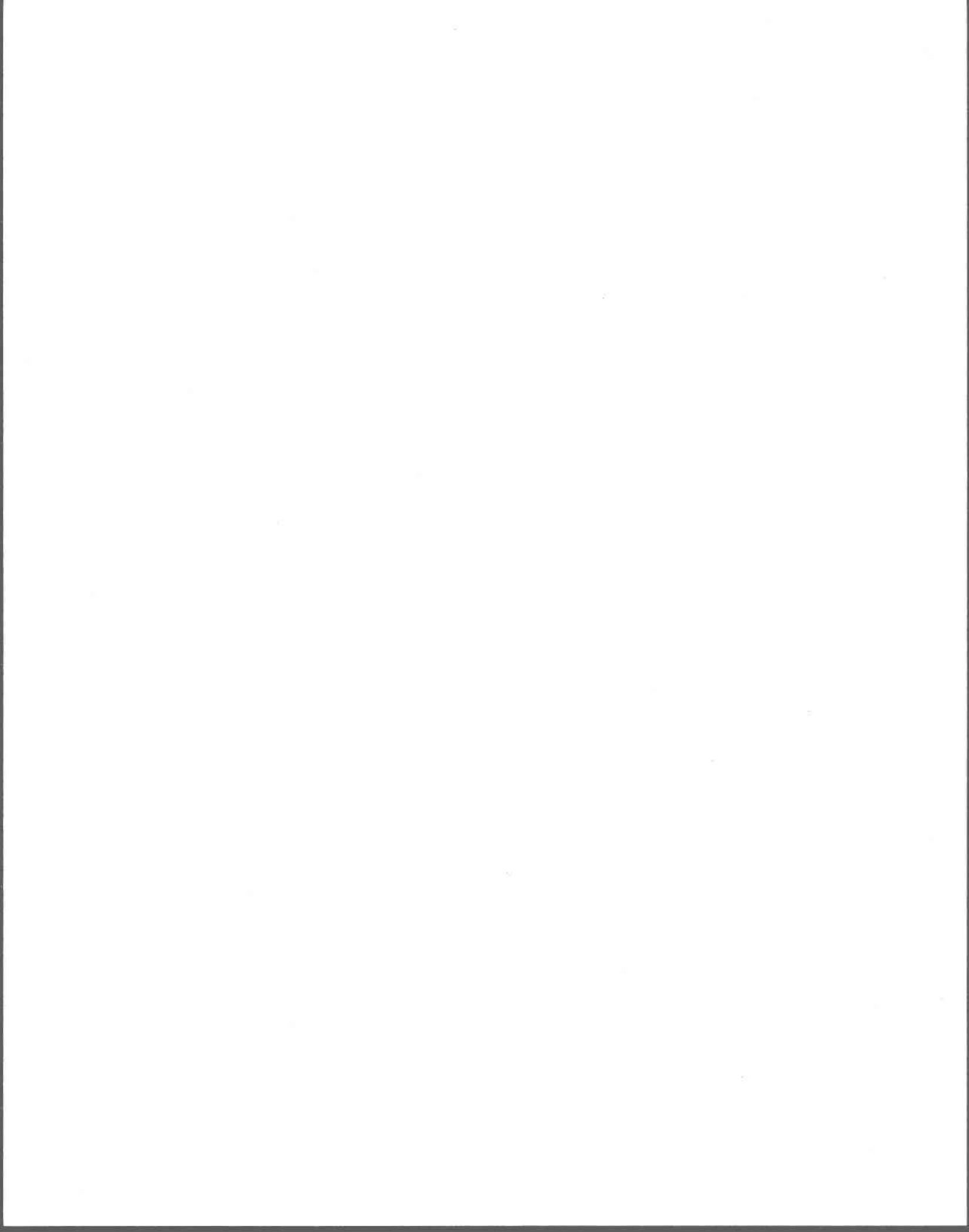
Tableau 28	<i>Production maximale de protéases en milieu synthétique et en milieux composés de 25 à 50% de boues secondaires de Valcartier</i>	98
Tableau 29	<i>Production maximale de protéases en milieu synthétique, de boues secondaires de Valcartier ou de boues de la CUQ avec ou sans suppléments carbonés et protéiniques</i>	100
Tableau 30	<i>Production maximale de protéases avec des sources de carbone différentes</i>	102
Tableau 31	<i>Composition finale des milieux de culture avec diverses sources de carbone lors des essais avec Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	106
Tableau 32	<i>Teneurs finales en métaux solubles avec diverses sources de carbone pour Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	107
Tableau 33	<i>Variation finale des teneurs en métaux totaux avec diverses sources de carbone pour Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	108
Tableau 34	<i>Effet de l'addition d'ions NH₄ sur la production enzymatique de Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	109
Tableau 35	<i>Variation de la composition nutritionnelle lors d'ajout d'ions NH₄⁺ pour Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	112
Tableau 36	<i>Variation des teneurs en métaux solubles lors d'ajout d'ions NH₄⁺ pour Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	113
Tableau 37	<i>Variation des teneurs en métaux totaux lors d'ajout d'ions NH₄⁺ pour Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	114
Tableau 38	<i>Production maximale de protéases lors d'utilisation de divers tampons avec Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	116
Tableau 39	<i>Variation de la composition du milieu lors de l'utilisation de divers tampons avec Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	119
Tableau 40	<i>Variation de la composition du milieu lors de l'utilisation de divers tampons avec Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	120
Tableau 41	<i>Variation des teneurs en métaux solubles lors d'utilisation de divers tampons avec Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	121
Tableau 42	<i>Variation des teneurs en métaux solubles lors d'utilisation de divers tampons avec Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	121
Tableau 43	<i>Variation des teneurs en métaux lors d'utilisation de divers tampons avec Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	122
Tableau 44	<i>Variation des teneurs en métaux lors d'utilisation de divers tampons avec Bacillus licheniformis ATCC 21424</i>	122
Tableau 45	<i>Paramètres d'exploitation de base</i>	128
Tableau 46	<i>Paramètres de marché</i>	128
Tableau 47	<i>Paramètres de capitalisation</i>	129

Tableau 48	<i>Paramètres d'opération</i>	130
Tableau 49	<i>Consommation de matériaux bruts (produits chimiques)</i>	131
Tableau 50	<i>Coût unitaire des matériaux bruts (produits chimiques)</i>	131
Tableau 51	<i>Critères de design pour les diverses étapes de production</i>	132
Tableau 52	<i>Description des scénarios de simulation employés pour l'analyse technico-économique de la production de protéases</i>	133
Tableau 53	<i>Bilan massique et volumique des diverses étapes pour le scénario de référence de production de protéases</i>	133
Tableau 54	<i>Dimensionnement des principaux équipements pour le scénario de référence de production de protéases</i>	135
Tableau 55	<i>Coût d'acquisition des principaux équipements associés au scénario de référence (CONV-B) de production de protéases</i>	138
Tableau 56	<i>Répartition des facteurs de Lang pour une usine à procédé liquide</i>	138
Tableau 57	<i>Coûts en capitaux (\$Can) pour les scénarios d'exploitation des procédés CONV et BOUE</i>	140
Tableau 58	<i>Coûts de production (\$Can/an) pour les scénarios d'exploitation du procédé CONV</i>	143
Tableau 59	<i>Coûts de production (\$Can/an) pour les scénarios d'exploitation du procédé BOUE</i>	144
Tableau 60	<i>Consommation et coûts des produits chimiques pour le scénario de référence (CONV-B) de production de protéases</i>	145
Tableau 61	<i>Besoins et coûts de la main-d'œuvre d'opération pour le scénario de référence (CONV-B) de production de protéases</i>	146
Tableau 62	<i>Description des coûts des utilités pour le scénario de référence (CONV-B) de production de protéases</i>	148
Tableau 63	<i>Bilan de flux monétaire sur une période de 10 années pour les scénarios d'exploitation du procédé CONV</i>	155
Tableau 64	<i>Bilan de flux monétaire sur une période de 10 années pour les scénarios d'exploitation du procédé BOUE</i>	156



LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1</i>	<i>Corrélation entre les mesures d'activité enzymatique effectuées avec la méthode à 275 nm et celle à 660 nm</i>	81
<i>Figure 2</i>	<i>Comparaison des mesures d'adsorbance entre les deux méthodes de préparation du blanc</i>	82
<i>Figure 3</i>	<i>Vérification de la stabilité entre la préparation du blanc et la mesure de l'activité enzymatique</i>	83
<i>Figure 4</i>	<i>Exemple de production enzymatique par mesure de l'activité enzymatique en milieu synthétique sur une période de 96 heures</i>	88
<i>Figure 5</i>	<i>Production de protéases en milieu synthétique et en milieu de boues secondaires de Valcartier avec glucose et tampon PBS 0,1M</i>	92
<i>Figure 6</i>	<i>Variation du pH lors de la production de protéases en milieu synthétique et en milieu de boues secondaires de Valcartier avec glucose et tampon PBS 0,1M</i>	93
<i>Figure 7</i>	<i>Variation du pH lors de la production de protéases en milieu synthétique et en milieu de boues de la CUQ avec dextrine et tampon PBS 0,1M</i>	95
<i>Figure 8</i>	<i>Croissance des microorganismes lors de la production de protéases en milieu synthétique et en milieu de boues de la CUQ avec dextrine et tampon PBS 0,1M</i>	96
<i>Figure 9</i>	<i>Variation du pH avec des sources de carbone différentes</i>	103
<i>Figure 10</i>	<i>Croissance des microorganismes avec des sources de carbone différentes</i>	104
<i>Figure 11</i>	<i>Variation du pH lors d'ajout d'ions NH_4^+ pour <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21424</i>	110
<i>Figure 12</i>	<i>Croissance des microorganismes lors d'ajout d'ions NH_4^+ pour <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21424</i>	111
<i>Figure 13</i>	<i>Variation du pH lors d'utilisation de divers tampons avec <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21424</i>	117
<i>Figure 14</i>	<i>Croissance des microorganismes lors d'utilisation de divers tampons avec <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21424</i>	118
<i>Figure 15</i>	<i>Schéma simplifié des diverses étapes de production de protéases alcaline de type <i>Subtilisin Carlsberg</i></i>	127



INTRODUCTION

Jusqu'aux années 1960, l'emploi d'enzymes industrielles reste un créneau très étroit. De nouvelles applications ont permis les plus récents développements, en particulier l'utilisation de protéases dans les détergents, d'enzymes coagulantes substituantes de la présure animale, de glucose isomérase et d'amyloglucosidase en glucoserie. Grâce aux progrès importants qui ont jalonné les trente dernières années de son existence, l'industrie des enzymes est en pleine progression puisque son chiffre d'affaires global a connu une importante augmentation depuis le début des années 80.

La plus grande partie de ce marché est liée aux enzymes de type hydrolytique comme les protéases, les cellulases et les lipases. Ces enzymes hydrolytiques sont utilisées par l'industrie des détergents (80 %) et l'industrie alimentaire et textile. D'ailleurs, les protéases issues principalement de *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*, et utilisées principalement dans les détergents, sont les enzymes occupant la plus grande part du marché mondial. Actuellement, la compétition est très forte dans le monde des enzymes industrielles et les prix de ces produits de hautes technologies sont à la baisse entraînant des réductions majeures dans les coûts de production. La capacité de l'industrie de produire des enzymes à un faible coût est donc essentielle pour maintenir sa compétitivité.

Le présent projet de recherche vise donc à explorer une nouvelle technologie économique pour la production de protéases bactériennes. Cette nouvelle approche consiste à utiliser des rejets urbains, les boues d'épuration, comme milieux de culture de substitution aux milieux synthétiques usuels, pour la production en biofermenteur de protéases microbiennes alcalines.

Le contenu de ce mémoire se subdivise en six chapitres. Le premier chapitre traite essentiellement des enzymes (définition, action, type, origine, etc.) et de l'industrie enzymatique en général (développement, applications, importance économique, etc.). Le second chapitre traite de manière approfondie des enzymes protéolytiques, soit des différents types de protéases, les méthodes de production, les applications industrielles, les milieux de cultures, etc. De plus, ce deuxième chapitre regroupe l'hypothèse de base soutenant la présente étude, ainsi

que les objectifs de recherche. Le troisième chapitre présente la démarche méthodologique. Le quatrième chapitre évalue la précision de la méthode de mesure de l'activité enzymatique choisie alors que le cinquième chapitre regroupe l'ensemble des résultats expérimentaux portant sur la production de protéases à partir de boues d'épuration. Le sixième chapitre présente une analyse technico-économique examinant la pertinence financière de la technologie de production de protéases étudiée dans le cadre de cette recherche. Par la suite, une section est consacrée à la présentation de la conclusion et des recommandations, alors que les références bibliographiques terminent ce document.

1 INDUSTRIE ENZYMATIQUE

Ce premier chapitre trace un portrait succinct de l'industrie des enzymes. La première partie du chapitre décrit la nature et le rôle des enzymes, alors que la seconde partie traite de la mesure de l'activité enzymatique. Par la suite, les troisième et quatrième parties de ce chapitre discutent respectivement de l'origine des enzymes et du développement de l'industrie de la production des enzymes. Finalement, les cinquième et sixième parties présentent les diverses applications commerciales de ces molécules, ainsi que les retombées économiques inhérentes à ce secteur industriel moderne.

1,1 Définition, rôle et action des enzymes

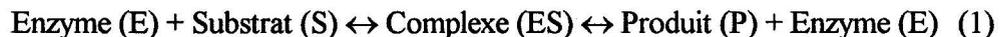
Les enzymes sont des protéines de très hauts poids moléculaires (10 000 à 1 000 000 Daltons) et sont constituées de longues chaînes d'acides aminés retenues ensemble par des liens peptidiques (Pelczar et Chan, 1981). Ce sont toutes des macromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaires. Certaines sont des holoprotéines constituées uniquement d'un enchaînement d'acides aminés ; d'autres sont des hétéroprotéines possédant une partie non protéique, le cofacteur, nécessaire à l'activité catalytique et lié plus ou moins fortement à la protéine (Arnaud *et al.*, 1993). Elles sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (Simon et Meunier, 1970 ; Arnaud *et al.*, 1993). De plus, les enzymes contribuent à la lyse des nutriments en des composés plus facilement assimilables. Ainsi, parmi les enzymes les mieux connues, on retrouve les enzymes présentes dans le tube digestif où la pepsine, la trypsine et les peptidases brisent les protéines en acides aminés, les lipases dégradent les gras en glycérol et acides gras et les amylases transforment les hydrates de carbone en sucres plus simples (Novo Norsdik, 1997).

Les enzymes agissent comme des catalyseurs de réactions chimiques. Leur plus grande particularité est leur très grande sélectivité à catalyser ces réactions chimiques car contrairement aux catalyseurs inorganiques comme les acides, les bases, les métaux et les

oxydes métalliques, les enzymes sont très spécifiques. Ainsi, chaque enzyme peut briser ou synthétiser un composé particulier. Dans certains cas, elles limitent leur action à des liens spécifiques avec les composés envers lesquels elles interagissent. Par exemple, la plupart des protéases peuvent briser plusieurs types de protéines, mais dans chacune des molécules de ces protéines seuls certains liens seront modifiés selon l'enzyme utilisée. Cette spécificité présente un double aspect, soit une spécificité réactionnelle où l'enzyme ne peut catalyser qu'un type de réaction donné, comme l'hydrolyse de liaisons glucosidiques ou l'hydrolyse de liaisons esters, soit une spécificité quant au substrat puisque l'enzyme se fixe sur le substrat en des points bien précis de la protéine enzymatique. Cette fixation se fait par établissement de liaisons de type hydrogène, hydrophobes ou de Van der Waals (Arnaud *et al.*, 1993).

De plus, par leur seule présence les enzymes accélèrent les réactions chimiques, qui autrement serait très lentes ou même inexistantes, en abaissant l'énergie d'activation nécessaire à la finalisation de la réaction chimique sans être consommées dans le procédé. Après l'achèvement de la réaction chimique, l'enzyme est libérée et est prête à amorcer une nouvelle réaction. En principe, ces réactions devraient se continuer éternellement mais en pratique la plupart des catalyseurs ont une durée de vie limitée, et tôt ou tard, leur activité décroît et il devient moins intéressant de les utiliser. Ceci est particulièrement vrai pour les enzymes qui pour la plupart sont utilisées une seule fois et éliminées lorsque leur travail est accompli (Reed, 1966). Dans les procédés industriels, l'action très spécifique des enzymes permet d'obtenir des effets très particuliers avec très peu de sous-produits non-désirés (Novo Norsdik, 1997). En fait, les enzymes sont les outils-clés de la biotechnologie et de la bio-industrie (Arnaud *et al.*, 1993).

De façon générale, la majorité des réactions enzymatiques peut être représentée par l'équation suivante :



où l'enzyme E et le substrat S se combine pour former le complexe enzyme-substrat ES qui se brise pour donner le produit P. L'enzyme demeure intacte au cours de cette réaction et elle est réutilisée jusqu'à ce que tout le substrat ait été consommé.

D'autre part, l'activité biochimique des microorganismes et de leurs enzymes est particulièrement importante. Une molécule enzymatique type peut, en effet, catalyser la transformation de 10 à 1 000 molécules de substrat par seconde (Pelczar et Chan, 1981). Ainsi, un gramme humide de *Micrococcus urea* peut décomposer jusqu'à 1 200 g d'urée par heure, tandis qu'un gramme de certaines cellules bactériennes peut transformer jusqu'à 14 000 g de lactose par heure (Simon et Meunier, 1970). De plus, la variété d'enzymes élaborées par un seul microorganisme est prodigieuse. Par exemple, à partir d'*Escherichia coli*, il a été isolé plus de 200 enzymes. D'ailleurs, le Tableau 1 présente les 23 variétés d'enzymes isolées chez *Aspergillus oryzae*. Il faut noter que chacune de celles-ci est douée d'une activité biochimique spécifique ce qui permet de concevoir les immenses possibilités de la microbiologie et de la biochimie industrielle future. Enfin, l'influence des conditions de culture est capitale. En effet, un microorganisme donné peut fournir plusieurs enzymes différentes selon le milieu de culture employé. Ainsi, *Bacillus subtilis* peut produire, selon les conditions de culture, des enzymes amylolytiques ou protéolytiques (α -amylase, β -glucanase, protéase neutre et protéase alcaline) (Aviron-Violet *et al.*, 1982 ; Simon et Meunier, 1970). À ce jour, plus de 2 000 enzymes ont été découvertes dont un tiers au moins sont des enzymes à cofacteurs (Nicotinamide adénine dinucléotide, Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, Adénosine triphosphate, Coenzyme A). Parmi elles, une quinzaine seulement sont utilisées à l'échelle industrielle et, si une vingtaine d'enzymes à cofacteurs sont employées sur le plan analytique, aucune réaction d'importance n'est encore réalisée à l'aide de ces dernières (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

Tableau 1 Enzymes présentes chez *Aspergillus oryzae* (Simon et Meunier, 1970)

α -Amylase	Phosphatase	Amidase
β -Amylase	Phosphomonoestérase	Cytase
Dipeptidase	Pectinase	Pectosanase
Lactase	Tannase	Catalase
Lipase	Cellulase	Sulfatase
Maltase	Phosphodiesterase	Rennin (présure)
Peptidase	Tréhalase	Phytase
Protéinase	Nucléase	

Enfin, certaines enzymes sont excrétées à l'extérieur de la cellule même si toutes les enzymes sont d'abord produites à l'intérieur. Il y a donc deux types d'enzymes, soit les enzymes intracellulaires ou endoenzymes et les enzymes extracellulaires ou exoenzymes. Les exoenzymes sont sécrétées par les cellules et agissent à l'extérieur de celles-ci sur les diverses substances organiques telles que les protéines, les hydrates de carbone ou les lipides, formant des dérivés généralement solubles et susceptibles d'être absorbés à travers la membrane cellulaire (Simon et Meunier, 1970). D'autre part, les endoenzymes synthétisent les divers composants cellulaires et décomposent les nutriments afin de pourvoir aux besoins énergétiques de la cellule.

Par ailleurs, la nomenclature et la classification des enzymes ont été normalisées par la Commission sur les Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie, créée en 1955, afin de remédier à la confusion qui régnait alors dans ce domaine et risquait de s'aggraver avec les progrès rapides des connaissances sur les enzymes (Arnaud *et al.*, 1993). Une classification des enzymes en six groupes a donc été établie selon leur action spécifique (Tableau 2). Ces principaux groupes sont ensuite redivisés en plus petits ensembles encore plus spécifiques quant aux réactions biochimiques catalysées.

Tableau 2 Principales classes d'enzymes

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductases	Réactions de transfert d'électrons (transfert d'électrons ou d'atomes d'hydrogène)
Transférases	Transfert de radicaux (groupements phosphates, amines, méthyle, etc.)
Hydrolases	Réactions d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau)
Lyases	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse
Isomérases	Réactions d'isomérisation (réactions où un composé est transformé en un isomère, c'est-à-dire un composé avec les mêmes atomes, mais avec une structure moléculaire différente)
Ligases	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP (adénosine triphosphate)

Comme toutes les autres protéines, les enzymes sont dénaturées par la chaleur, elles précipitent en présence d'éthanol ou de fortes concentrations de sels comme le sulfate d'ammonium et elles ne diffusent pas à travers des membranes sélectives ou semi-perméables.

1,2 Mesure de l'activité enzymatique

Les études cinétiques, basées sur l'analyse mathématique des phénomènes mis en jeu, ont acquis une très grande importance pour la compréhension des réactions chimiques. Bien que ces études théoriques aient été autrefois négligées, elles suscitent actuellement un intérêt particulier pour la transposition des résultats de laboratoire à l'échelle industrielle et pour la réalisation des méthodes modernes de culture en continu (Simon et Meunier, 1970). La théorie des réactions enzymatiques est compliquée par le fait que le poids moléculaire des enzymes mises en œuvre est très élevé et que la structure chimique de ces agents est encore mal connue, tandis que les composés soumis aux transformations enzymatiques ont un poids moléculaire beaucoup plus faible, ce qui empêche l'étude molaire de ces phénomènes. Les réactions enzymatiques possèdent les caractères des réactions chimiques effectuées en présence de catalyseurs. Une réaction chimique n'est pas créée par un catalyseur, mais seulement accélérée par celui-ci, ce qui réduit le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre de la réaction (Simon et Meunier, 1970). L'activité enzymatique molaire est le nombre de molécules de substrat transformé en une minute par une molécule d'enzyme. Pour mesurer l'activité d'une enzyme sur un substrat, il suffit de mesurer la vitesse de réaction exprimée par la quantité de substrats détruits ou par la quantité de produits formés en fonction du temps.

En 1913, Michaelis et Menten ont établi une théorie générale sur l'activité enzymatique basée sur le concept de la formation d'un complexe enzyme-substrat (ES) formé par l'action réversible d'une enzyme (E) sur un substrat (S) tel que mentionné à la section précédente :



où la conversion enzymatique appropriée peut seulement s'établir à partir du complexe

enzyme-substrat,



et où le produit final est P et k_1 , k_2 , et k_3 sont les constantes de vitesse des réactions. Si e, c et S expriment respectivement les concentrations en enzymes, en complexe ES et en substrat, la vitesse de formation du complexe s'écrit alors :

$$\frac{dc}{dt} = k_1(e - c)S - k_2c - k_3c \quad (4)$$

en supposant que S est beaucoup plus grand que c. Au repos, le second membre de l'équation précédente est égal à 0 d'où :

$$c = \frac{eS}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + S} \quad (5)$$

La vitesse de formation v du produit final peut alors s'écrire :

$$v = k_3c = \frac{k_3eS}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + S} = \frac{V_{\max}S}{K_s + \frac{k_3}{k_1} + S} \quad (6)$$

et l'équation de Michaelis devient :

$$v = \frac{V_{\max}S}{K_m + S} \quad (7)$$

dans laquelle :

$$V_{\max} = ck_3 = \text{vitesse maximale de production (toute l'enzyme est utilisée pour la formation du complexe)} ;$$

$K_s = k_2/k_1 =$ constante d'équilibre intervenant dans la dissociation du complexe ES ;

$K_m = K_s + (k_3/k_1) =$ constante de Michaelis-Menten.

Si k_3 est voisin de k_1 , alors $K_m = K_s$. K_m étant inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour le substrat donc, un faible K_m indique de grandes affinités entre l'enzyme et le substrat. Dans la plupart des réactions enzymatiques K_m est de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-5} mole par litre. La constante de Michaelis-Menten, K_m est déterminée par la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximum V (Michaelis et Menten, 1913). Cependant, il est difficile de tracer une courbe facilement interprétable avec cette équation. C'est pourquoi, une autre représentation, celle de Lineweaver-Burk est plus souvent utilisée. À cet effet, on utilise les valeurs réciproques de l'équation de Michaelis-Menten sous la forme :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (8)$$

Si on porte les valeurs de $1/v$ en ordonnée et les valeurs de $1/S$ en abscisse, on obtient une représentation linéaire ou la pente de la droite est égale à K_m/v (Simon et Meunier, 1970 ; Arnaud *et al.*, 1993).

Par ailleurs, certains substrats sont capables d'inhiber partiellement ou totalement des réactions enzymatiques. En effet, si plusieurs composés sont présents, ils peuvent empêcher la réaction en occupant d'une façon plus ou moins complète les sites actifs de l'enzyme. Ils existent trois sortes d'inhibiteurs, soit les inhibiteurs compétitifs, les inhibiteurs non-compétitifs et les inhibiteurs mixtes.

Dans le cas d'une inhibition compétitive, l'équation de Lineweaver-Burke devient :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v} (1 + i/K_i) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (9)$$

dans laquelle i représente la concentration d'inhibiteur et K_i , la constante d'équilibre au cours de la réaction entre l'enzyme et l'inhibiteur (Simon et Meunier, 1970).

1,3 Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles peuvent avoir plusieurs origines dont les plantes, les animaux et les microorganismes (Aviron-Violet *et al.*, 1982 ; Arnaud *et al.*, 1993).

La synthèse d'enzymes à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler. Dès lors, la production d'enzymes à partir de la flore microbienne est l'avenue privilégiée par les producteurs puisqu'elle est plus facile à gérer avec des résultats plus constants. En fait, les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (Arnaud *et al.*, 1993).

Cependant, parmi les milliers d'espèces de microorganismes connus, capables en principe de sécréter des enzymes, un petit nombre seulement de ceux-ci ont jusqu'à ce jour été utilisés à des fins industrielles (Simon et Meunier, 1970 ; Aviron-Violet *et al.*, 1982). De ces milliers de microorganismes, environ 20 seulement sont actuellement commercialisés sur une base qui a un impact significatif sur l'industrie des enzymes et sur les utilisateurs d'enzymes. Ainsi, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus licheniformis* produisent environ 50 % de l'ensemble des enzymes de fermentation, alors que les moisissures du genre *Aspergillus*, *A. niger* et *A. oryzae*, en génèrent 30 % (Aviron-Violet *et al.*, 1982). De plus, 16 enzymes sont à l'heure actuelle considérées comme enzymes industrielles et correspondent approximativement à 90 % du marché. Globalement, environ 60 % de ces enzymes ont une application quelconque dans les industries agro-alimentaires.

Enfin, puisque la production d'enzymes spécifiques varie largement avec les espèces utilisées, le choix de la souche de microorganismes revêt une grande importance. En effet, les possibilités d'utiliser ces germes sont liées aux critères suivants :

- Croissance rapide sur des substrats organiques bon marché ;
- Culture facile et abondante ;
- Fourniture de quantité abondante d'enzymes ;
- Obtention des transformations recherchées d'une manière simple et rapide, avec un rendement élevé et en utilisant le minimum d'énergie ;
- Conservation des propriétés sécrétoires des souches dans le temps ;
- Élaboration de produits faciles à isoler.

Traditionnellement, les enzymes microbiennes étaient produites par culture en surface, soit en couche mince de milieu liquide ou de milieu semi-solide. Les cultures séchées donnaient des préparations suffisamment stables. Cette technique est encore utilisée pour quelques productions, en particulier les enzymes d'origine fongique telles que les amylases d'*Aspergillus*, les protéases d'*Aspergillus* et de *Mucor* ou les pectinases de *Penicillium*. Mais les contrôles de température, d'aération et d'humidité présentent des difficultés et les cultures submergées sont maintenant préférées aux cultures de surface. En fait, dès que le développement de la microbiologie a permis de mieux comprendre les systèmes qui président à la synthèse des enzymes chez les microorganismes, la production industrielle d'enzymes s'est orientée vers les processus fermentaires. Les cultures en milieu liquide profondes, agitées, sont mieux adaptées aux différents contrôles par des méthodes modernes et réduisent les risques de contamination. De plus, elles se prêtent mieux aux opérations d'extrapolation et d'optimisation nécessaires pour le passage du fermenteur pilote de laboratoire au fermenteur industriel (Aviron-Violet *et al.*, 1982 ; Arnaud *et al.*, 1993).

1,4 Développement de l'industrie des enzymes

Les connaissances acquises sur le rôle des diverses enzymes ont permis le développement de nombreuses applications industrielles pour ces dernières. En effet, dès la fin du XIX^e siècle, la production de la levure de boulangerie en cuve profonde et aérée était possible. De plus, la

première production industrielle d'une enzyme, à partir de champignons, a été réussie dès 1911, par Takamine qui obtenait à partir de culture d'*Aspergillus oryzae*, la Takadiastase, une amylase susceptible d'applications industrielles. Boidin et Effront en 1917 produisirent des enzymes d'origine bactérienne d'une façon industrielle et surmontèrent aussi les problèmes d'extraction. En effet, les enzymes sont en général localisées à l'intérieur des microorganismes et leur extraction présente certaines difficultés. Toutefois, dans le cas de microorganismes qui produisent des enzymes exocellulaires, l'extraction de celles-ci s'effectue beaucoup plus facilement. Pendant la première guerre mondiale, la production d'acétone nécessaire à la fabrication des poudres fut mise au point en Angleterre tandis qu'en Allemagne, on l'obtenait par fermentation du glycérol. En 1923, aux États-Unis, Pfizer créa la première usine productrice d'acide citrique par *Aspergillus niger*, alors que d'autres usines furent érigées dans divers pays afin de produire du butanol et des acides acétique, lactique, oxalique, gluconique ou fumarique. À partir de 1928, avec la découverte de la pénicilline par Alexander Flemming, les recherches s'intensifièrent afin de produire des antibiotiques à partir de diverses souches de microorganismes. Ainsi, à la pénicilline s'ajouta rapidement la streptomycine, les tétracyclines, le chloroamphénicol, la bacitracine, l'érythromycine, la novobiocine, la nystatine, la kanamycine et beaucoup d'autres. Dans le même temps, de nombreux producteurs préparèrent industriellement à partir de bactéries ou de champignons, un grand nombre d'enzymes dont les plus importantes sont l'amylase, la glucose-oxydase, la lipase, la streptokinase, la catalase, l'hemicellulase, la pectase, la cellulase, l'invertase et la protéase (Simon et Meunier, 1970). Plusieurs raisons sont responsables de l'accélération des travaux sur les enzymes après la seconde guerre mondiale dont, la découverte de plusieurs nouvelles enzymes, l'accroissement des connaissances sur les propriétés de ces dernières, la possibilité de produire toutes les enzymes utiles dans l'industrie à l'aide de microorganismes et finalement, les progrès accomplis dans le domaine des technologies de fermentation (Reed, 1966).

La culture des microorganismes producteurs d'enzyme est une tradition plus que millénaire dans les pays d'Orient. Les espèces appartenant aux *Mucorales* et surtout *Aspergillus oryzae*, ont de tout temps été des auxiliaires dans la préparation par fermentation d'aliments et de boissons variées. Par exemple, la fermentation du saké, une boisson alcoolisée, commence par une dégradation amylasique du riz, fournissant ainsi les éléments nécessaires aux fermentations

alcooliques par *Saccharomyces cerevisiae*, puis lactique par *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus*. Dans la préparation du shoyu ou sauce de soja, on favorise également la protéolyse. Chaque année, 3 à 4 millions de tonnes de ces produits sont ainsi préparés. Ces industries de fermentation ont, dès la fin du 19^{ième} siècle, suscité le développement des recherches dans le domaine microbiologique et ont été à l'origine du formidable essor qui permet encore au Japon d'occuper une place de choix parmi les nations les plus modernes dans les industries biotechnologiques (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

Par ailleurs, le genre *Bacillus* a connu un développement considérable pour la production d'enzymes industrielle. Diverses raisons peuvent expliquer ce rôle majeur. D'abord le potentiel génétique de ce groupe dont les espèces se rencontrent dans des habitats variés. En effet, y sont représentés des psychrophiles, mésophiles, thermophiles, neutrophiles, acidophiles, alcalophiles. Ensuite, ces microorganismes s'adaptent parfaitement à un développement industriel, à cause de leur facilité de culture et du fait qu'ils excrètent à l'extérieur des cellules une quantité importante de leurs protéines enzymatiques. Enfin, ces enzymes exocellulaires sont des hydrolases, famille qui a connu le plus large développement pour les applications industrielles, notamment les amylases pour le traitement de l'amidon et les protéases dans les détergents (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

1,5 Applications industrielles des enzymes

Jusqu'aux années 1960, les enzymes industrielles restent donc un créneau très étroit. De nouvelles applications ont permis les plus récents développements ; protéases dans les détergents, enzymes coagulantes substituant de la présure animale, glucose isomérase et amyloglucosidase en glucoserie (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Le Tableau 3 illustre quelques exemples d'enzymes, des microorganismes qui les produisent et des applications industrielles qui en sont issues tandis que les sections subséquentes présentent un bref résumé des diverses applications des technologies enzymatiques.

Tableau 3 Exemples d'enzymes industrielles et de microorganismes producteurs

Types d'enzymes	Microorganismes utilisés	Utilisation
Amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Saccharification de l'amidon
	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus roqueforti</i> , <i>Aspergillus niger</i>	Boulangerie, conserve de fruits, textiles, papeterie
	<i>Rhizopus spp.</i>	Industries alimentaires
	<i>Bacillus subtilis</i>	Industries alimentaires
Invertases	<i>Saccharomyces carlbergensis</i>	Confiserie
Protéases	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus mucor</i>	Hydrolyse de protéines et de la gélatine
	<i>Bacillus subtilis</i>	Clarification de la bière
	<i>Pseudomonas putida</i>	Tannerie
	<i>Clostridium spp.</i>	Blanchisserie
	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Détergents
Cellulases	<i>Trichoderma karungi</i> , <i>Myrothecium verrucarium</i>	Dégradation des aliments cellulosiques, textiles
Pectinases	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Botrytis psp.</i>	Clarification des jus de fruit et des vins, industrie textile, accélération des filtrations
Lactases	<i>Candida pseudotropicalis</i>	Crèmes glacées
Lipases	<i>Candida lipolytica</i>	Fromagerie, laiterie
Penicillinase	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus anthracis</i>	Destruction de la pénicilline
Streptokynase	<i>Aspergillus candidus</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Usages médicaux
Streptodornase	<i>Saccharomyces haemolyticus</i>	Usages médicaux
Catalase	<i>Acetobacter peroxydans</i>	Fabrication de matériaux poreux

1,5,1 Alcools, bières, vins et boissons fruitées

Ce secteur alimentaire présente une très grande diversité de techniques et de produits. Ils offrent aux enzymes hydrolytiques un vaste champ d'utilisation étant donné la nature des opérations habituellement pratiquées pour transformer en liquides alimentaires des substances d'origine végétale. En effet, qu'il s'agisse de fermentation, d'extraction, de clarification, de filtration ou de stabilisation, l'utilisation d'enzymes permet d'améliorer les rendements et la qualité de ces produits.

Ainsi, la production d'alcool éthylique par fermentation est une industrie traditionnelle qui a

récemment suscité un regain d'intérêt dans la mesure où l'alcool apparaît maintenant comme un substitut possible d'une partie du pétrole consommé comme carburant. La fermentation alcoolique peut être pratiquée à partir de deux types de matières premières soit le saccharose et l'amidon. Contrairement au saccharose, qui est directement fermentescible, l'amidon doit être dégradé en glucose et maltose. Actuellement, une liquéfaction enzymatique est pratiquée le plus souvent avec de l' α -amylase de *Bacillus licheniformis*, après quoi la saccharification est effectuée au moyen d'amyloglucosidase d'*Aspergillus niger*.

La brasserie est l'une des industries alimentaires où, en dépit de réglementations souvent contraignantes, l'utilisation des enzymes est la plus répandue. Tout d'abord, on peut utiliser des enzymes amylolytiques pour liquéfier l'amidon contenu dans la fraction de grains crus que l'on ajoute généralement à l'extrait de malt pour augmenter la concentration du moût en sucres fermentescibles. Ensuite, l'utilisation de β -glucanases bactériennes ou fongiques permet d'abaisser de façon significative la viscosité du moût et d'améliorer la filtrabilité de la bière (Rivière, 1975 ; Rose, 1961). Puis, pour donner une bonne stabilité colloïdale à froid, des enzymes provenant de la papaïne sont ajoutées. Enfin, pour améliorer la stabilité de la bière, il est possible d'éliminer l'oxygène qui reste emprisonnée dans le col après embouteillage par ajout de glucose-oxydase d'*Aspergillus niger*.

Par ailleurs, pour l'industrie vinicole, quel que soit le type de vin que l'on désire obtenir, le problème principal auquel on se heurte, résulte de la présence dans le grain de raisin de polysaccharides complexes, les pectines, surtout abondantes dans la pellicule et les parties solides du raisin. Ces macromolécules sont responsables des difficultés d'extraction du jus, de sa turbidité et de sa mauvaise filtrabilité. Aussi fait-on appel à des enzymes, les pectinases, pour les détruire. Les pectinases sont obtenues industriellement par fermentation de moisissures appartenant à l'espèce *Aspergillus niger*.

Enfin, dans l'industrie des boissons sucrées non alcoolisées et des jus de fruit, où on fait normalement appel à des extraits de fruits, purs ou dilués, on est confronté au problème précédent, avec les variantes résultant de la nature des fruits traités, du taux d'estérification de leur pectine, de leur acidité, de la plus ou moins grande facilité avec laquelle ils libèrent leurs

pigments et leurs arômes. À côté des enzymes pectolytiques, des préparations cellulolytiques, hémicellulolytiques ou amylolytiques peuvent être utilisées. D'ailleurs, ces diverses activités accompagnent généralement les pectinases produites par *Aspergillus niger* (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

1,5,2 Aliments fermentés orientaux

Les enzymes protéolytiques d'origine fongique ont été utilisées depuis des siècles dans la production de nombreux produits alimentaires orientaux dont la sauce tamari, la sauce soya et le tofu (Tableau 4) (Rose, 1961). Comme les microorganismes utilisés pour la production des enzymes n'exigent pas, en général, une aération importante, les anciennes techniques de culture en surface, sur son, sur balle de riz en Orient ou sur milieu liquide, sont encore employées (Simon et Meunier, 1970).

Tableau 4 Préparation d'aliments orientaux selon le produit ensemencé et les moisissures utilisés

Aliments	Produits ensemencés	Moisissures
Hamanatto	Soya, blé, orge	<i>Aspergillus oryzae</i>
Katsoubashi	Poisson	<i>Aspergillus glaucus</i>
Lao-chao	Riz	<i>Rhizopus chinensis</i>
Meitanza	Soya	<i>Actinomucor elegans</i>
Miso	Soya, riz, orge	<i>Aspergillus oryzae</i>
Ontjom	Arachide	<i>Neurospora sitophila</i>
Sauce soya	Soya, blé	<i>A. oryzae</i> , <i>A. sojae</i>
Sufu	Soya	<i>Actinomucor elegans</i> , <i>Mucor sp.</i>
Tempeh	Soya	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Rhizopus sp.</i>

1,5,3 Glucoserie

L'industrie de la glucoserie est la principale industrie alimentaire utilisatrice d'enzymes, où elles servent à produire du dextrose, du fructose et d'autres sirops spécialisés utilisés en pâtisserie, en confiserie et en production de liqueurs douces. L'utilisation de l'amidon pour la préparation de substances édulcorantes remonte au début du 19^{ième} siècle à une époque où, en Europe, la pénurie de sucre de cannes incitait à trouver des produits de remplacement directement

accessibles aux pays utilisateurs (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Selon le type de produit final recherché, les transformations opérées en glucoserie à partir d'amidon natif (maïs, pommes de terre, blé, etc.) peuvent faire appel à des combinaisons variées des enzymes suivantes : α -amylase bactérienne (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae*), α -amylase fongique (*Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*), β -amylase végétale ou bactérienne (*Bacillus subtilis*), amyloglucosidase fongique (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*), enzymes de débranchement, glucose isomérase bactérienne (*Bacillus coagulans*, *Streptomyces violaceoniger*, *Streptomyces albus*) (Arnaud *et al.*, 1993).

1,5,4 Alimentation animale

L'industrie de l'alimentation animale intègre aussi des enzymes dans ses préparations afin de dégrader les divers éléments nutritifs et d'améliorer l'assimilation et la digestion de ces derniers. De plus, elles favorisent les fermentations anaérobies qui contribuent à augmenter la valeur alimentaire des ensilages. À cet effet, on utilise des mélanges des enzymes suivantes : amylases, cellulases, pectinases, β -glucanases, hémicellulases et protéases. En général, on emploie des préparations enzymatiques d'origine fongique en raison de leur polyvalence. Finalement, l'ajout d'enzymes dans ces préparations permet de réduire le rejet d'azote, de phosphore et de biomasse totale dans l'environnement (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

1,5,5 Boulangerie et pâtisserie

L'utilisation d'enzymes exogènes dans la fabrication de pain vise le plus souvent à corriger certaines des déficiences diastasiques inhérentes à l'emploi d'une matière première naturelle, dont les qualités peuvent varier fortement d'une année à l'autre. Parmi ces enzymes, les amylases sont évidemment les plus importantes car on les incorpore dans les farines de blé hypodiastasiques. Par ailleurs, l'addition d'enzymes telles que la lipoxygénase ou les protéases permet de jouer sur les caractéristiques du gluten et sur les propriétés mécaniques de la pâte (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Ainsi, l'addition de protéases à la pâte améliore sa manipulation, de même que l'élasticité et la texture du gluten, tout en augmentant substantiellement le volume de la mie (Rivière, 1975 ; Rose, 1961). À cette fin, il est possible d'utiliser une protéase fongique provenant d'*Aspergillus oryzae*. Dans un pays comme les États-Unis, près de deux

tiers du pain blanc contient un apport de protéases fongiques (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

1,5,6 Produits laitiers

La transformation du lait en caillé est l'une des premières opérations de l'industrie alimentaire pour laquelle une préparation enzymatique ayant des caractéristiques analogues à celles des produits encore utilisés de nos jours, a été utilisée. Il y a un peu plus d'un siècle, le danois Hansen réussit à obtenir une préparation liquide stable de présure de veau par extraction de caillettes. Actuellement encore, la présure animale représente un marché important parmi les enzymes dites d'extraction. Cependant, les fluctuations du prix des caillettes et leur pénurie épisodique fait que l'on a cherché à s'affranchir partiellement de la dépendance traditionnelle à l'égard de cette enzyme en la remplaçant par d'autres enzymes animales ou végétales et surtout par des enzymes de fermentation. Dans la première catégorie, il faut placer la pepsine de porc ou de bœuf, cette dernière donnant de meilleurs résultats, et la ficine. Dans la seconde catégorie se rangent plusieurs protéases fongiques produites principalement par les espèces suivantes : *Mucor mihei*, *Mucor pusillus* et *Endopathia parasitica* (Aviron-Violet *et al.*, 1982; Aunstrup *et al.*, 1980). Enfin, la production d'enzymes protéolytiques par la technique orientale d'ensemencement en surface est aussi utilisée pour la fabrication des fromages à pâtes molles comme le silton, le roquefort et le camembert (Rose, 1961).

1,5,7 Protéines

L'industrie des protéines utilise des enzymes afin d'augmenter les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des protéines animales et végétales. Les effets recherchés visent à améliorer la digestibilité, le pouvoir émulsifiant, le pouvoir gélifiant ou la solubilité. Parmi les protéases utilisées figurent principalement la papaïne, la pepsine, les enzymes pancréatiques et les protéases bactériennes. Il faut à ce sujet, citer les travaux de la firme danoise Novo Nordsik, compagnie créée en 1989 de la fusion de deux firmes danoises, soit Novo Industri A/S et Nordisk Gentofte A/S, sur l'obtention d'hydrolysats de protéines végétales par utilisation soit de la protéase neutre de *Bacillus subtilis*, soit de la protéase alcaline de *Bacillus licheniformis* (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

1,5,8 Textiles

Le désencollage textile a été, il y a plus de cinquante ans, l'un des secteurs industriels où les enzymes ont fait la démonstration indiscutable de leurs avantages spécifiques. Ainsi, dans le tissage du coton, afin d'augmenter leur résistance à la traction et à l'abrasion, les fils de chaîne sont encollés avec des préparations de polymères présentant une affinité physico-chimique pour la cellulose. Des colles d'amidon, de gélatine de CM-cellulose ou d'alcool polyvinylique sont donc couramment utilisées. Cependant, si la colle qui enduit les fibres les protège au cours du tissage, dès que l'on atteint le stade de l'ennoblissement, il faut l'éliminer sans endommager les fibres et en conservant à celles-ci une hydrophilité uniforme. L'amylase et la protéase de *Bacillus subtilis* ou de *Bacillus licheniformis* sont utilisées régulièrement dans l'industrie des textiles pour leurs diverses propriétés. De même, des protéases bactériennes servent à dégommer la soie brute en solubilisant la séricine, substance gommeuse qui entoure la fibre protéique. Quand l'apprêt de la soie est constitué de gélatine ou de caséine, les protéases de ce type peuvent l'éliminer au cours du désencollage.

1,5,9 Tannerie

En tannerie, trois traitements de la peau sont susceptibles de tirer profit de solutions enzymatiques, soit le reverdissage, le délainage et le confitage (Rose, 1961). Le reverdissage a pour effet de remettre la peau dans un état voisin de l'état frais. Il consiste donc essentiellement à lui faire reprendre l'eau perdue au cours de la conservation, à la débarrasser du sang et des impuretés, à éliminer les ingrédients de conservation et enfin à éliminer les substances interfibrillaires comme l'albumine, la globuline et les mucopolysaccharides. Le reverdissage enzymatique fait appel à la protéase alcaline de *Bacillus subtilis*, moins active que celle de *Bacillus licheniformis*. Cette enzyme permet d'hydrolyser le gel interfibrillaire de la peau qui s'oppose à la pénétration de l'eau. Le délainage consiste à obtenir un relâchement du poil ou de la laine par action de la protéase neutre de *Bacillus subtilis*. Par rapport à l'utilisation de la chaux ou de sulfures alcalins, le délainage enzymatique offre l'avantage de ménager la fleur de la peau et de fournir des fibres de meilleure qualité. Le confitage des peaux est une opération très importante car elle livre, en final, un cuir permettant une meilleure fixation des substances

tannantes et présentant une fleur de meilleure aspect. Traditionnellement, c'était un travail de rivière au cours duquel la peau reverdie, épilée et pelanée était soumise à l'action d'agents biologiques hydrolytiques permettant un bon décrassage des peaux (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Des protéases produites par des souches *Streptomyces fradiae* sont aussi utilisées lors de l'épilage et le délainage des peaux (Rivière, 1975).

1,5,10 Pâtes et papiers

Dans l'industrie des pâtes et papiers, les α -amylases d'origine bactérienne sont utilisées pour liquéfier les colles d'amidon couramment utilisées. La liquéfaction de l'amidon sert à préparer des sauces de couchage renfermant en suspension des matières minérales finement divisées. L'opération du couchage permet d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille de papier qui vient d'être formée, tout en substituant une microporosité artificielle à sa macroporosité naturelle. Pour le carton ondulé, on utilise des colles d'amidon pour les joints de colle qui permet de fixer la cannelure sur la couverture (Aviron-Violet *et al.*, 1982). De plus, les enzymes améliorent la consistance des pâtes et le blanchissement de ces dernières.

1,5,11 Détergents

Si le traitement enzymatique de fibres avant tissage occupe encore une place importante dans le domaine textile, c'est cependant le secteur de la détergence qui a connu la plus forte expansion depuis les années 1960 (Ellwood, 1968, Argüello *et al.*, 1998). En fait, l'emploi d'enzymes dans les détergents est l'application la plus répandue de toutes les technologies enzymatiques. Les enzymes servent à dégrader les protéines, les féculents et les chaînes d'acides gras dans les lavages (Rivière, 1975 ; Rose, 1961 ; Aehle *et al.*, 1993). De même, elles permettent d'améliorer la clarification des couleurs et adoucissent les cotons. De plus, elles permettent de laver les textiles à des températures plus basses et réduisent les quantités de produits chimiques dangereux normalement retrouvés dans les savons.

Dès lors, à cause de leur très grande importance économique, la biosynthèse des protéases alcalines de *Bacillus* a été largement étudiée. Ainsi, en 1959, une nouvelle préparation, "Bio 40", basée sur une protéase de *B. subtilis* a été produite. Cette nouvelle protéase a

marqué un changement important dans l'industrie des détergents, mais c'est en 1960 qu'une autre protéase issue de *B. licheniformis*, couramment appelé Subtilisin Carlsberg, a littéralement révolutionné le marché des détergents. Cette enzyme a été étudiée scientifiquement par Ottesen et ses collègues au laboratoire Carlsberg au Danemark et a été introduite commercialement par la compagnie Danoise Novo Nordsik en 1960. Durant les années subséquentes, les travaux de recherche de la compagnie Novo Nordsik et de la compagnie Kortman et Schulte ont démontré l'intérêt grandissant des protéases produites à partir de *B. licheniformis*. Ainsi, déjà en 1969, environ 50 % des détergents manufacturés en Europe et aux États-Unis contenaient des enzymes protéolytiques. D'ailleurs, les protéases issues de *B. licheniformis* sont devenues très rapidement les enzymes microbiennes les plus importantes du point de vue économique (Aunstrup *et al.*, 1980). En effet, les ventes totales de protéases microbiennes en 1977 étaient estimés à 120 millions de dollars canadiens, dont 75 % venaient de l'industrie des détergents et 10 % des industries laitières. Les 15 % restants provenaient de la somme de plusieurs applications mineures (Aunstrup *et al.*, 1979).

1,5,12 Graisses et huiles, hygiène corporel et autres

Dans l'industrie des graisses et des huiles, les enzymes peuvent modifier la lécithine et hydrolyser les gras et les esters. Elles contribuent à la synthèse de gras spécialisés. L'industrie des soins de beauté et de l'hygiène corporel se sert aussi des enzymes dans la préparation de nombreux produits. Elles servent aussi à récupérer l'agent des films usagés après l'hydrolyse de la gélatine.

1,6 Importance économique de l'industrie enzymatique

Grâce aux progrès importants qui ont jalonné les trente dernières années de son existence, l'industrie des enzymes est en pleine progression puisque son chiffre d'affaires global a connu une importante augmentation depuis le début des années 80. Ainsi, au cours de la dernière décennie, le marché des enzymes industrielles a connu un volume annuel de croissance de 10 à 15 %. En effet, en 1982 le marché des enzymes industrielles était de 375 million de dollars canadiens alors qu'en 1990, il était de 720 millions et de 1 milliard en 1994. Enfin, en 1996 il atteignait 1,92 milliards de dollars canadiens (Arnaud *et al.*, 1993 ; Aviron-Violet *et al.*, 1982 ;

China West International, Inc., 1994 ; Novo Nordisk, 1997). Cette croissance est attribuable au développement de nouveaux produits enzymatiques et à l'expansion géographique des nations industrialisées. Au cours des années, Novo Nordisk, le plus grand producteur d'enzymes industrielles, et l'ensemble des industries produisant des enzymes, ont noté un lien direct entre les ventes d'enzymes et le développement économique des nations. Ainsi, dans les premières étapes de développement économique d'un pays, il n'y a pas d'augmentation significative dans les ventes d'enzymes mais lorsqu'un pays rejoint un certain développement économique, il y a une consommation accrue et rapide des enzymes. Ce phénomène a été observé récemment en Corée du Sud, au Brésil et en Chine. En 1996, de nouveaux marchés se développent pour les enzymes, particulièrement en Chine.

La plus grande partie de ce marché est liée aux enzymes de type hydrolytique comme les protéases, les cellulases et les lipases. La plus grande partie de ces enzymes hydrolytiques (80 %) se retrouvent dans l'industrie des détergents tandis que les 20 % restants sont majoritairement dans l'industrie alimentaire et l'industrie textile. D'ailleurs, globalement, l'industrie des détergents accapare 34 % du marché total des enzymes industrielles, soit plus du double des industries alimentaires et de l'industrie des textiles (Tableau 4).

Tableau 5 Marché mondial des enzymes industrielles en 1996

Industries	Pourcentage (%)
Détergent	34
Hydrates de carbone	12
Textile	11
Autres	43

De plus, les protéases issues principalement de *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*, et utilisées principalement dans les détergents, sont les enzymes occupant la plus grande part du marché mondial avec une production annuelle de 500 tonnes et 40 % du marché des ventes d'enzymes industrielles (Tableau 5). Enfin, la production mondiale de protéases, peu importe l'origine, est environ de 1 000 à 2 000 tonnes d'enzymes pures par année (Aunstrup *et al.*, 1980). Aux États-Unis, environ 50 % des détergents liquides, 25 % des détergents en poudre

et la plupart des agents de blanchiment en poudre contiennent des enzymes susceptibles de dissoudre les taches qui ne seraient pas enlevées autrement.

Tableau 6 Production d'enzymes industrielles (Aunstrup *et al.*, 1979)

Enzymes	Qté produite par année (tonne d'enzymes pures)	Proportion des ventes (%)
Amylase de <i>Bacillus</i>	300	12
Amylase fongique	10	3
Glucoamylase	300	14
Glucose isomérase	50	12
Pectinases	10	10
Protéases de <i>Bacillus</i>	500	40
Protéase fongique	10	1
Presure microbienne	10	7
Autres enzymes	10	1

De très grands efforts de R&D sont présentement en cours afin de créer de nouveaux produits brevetables qui assureraient une part importante du marché des enzymes. D'ailleurs, il faut compter environ de 7 à 10 ans pour mettre au point un nouveau système enzymatique industriel et assurer sa diffusion (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Actuellement, la compétition est très forte dans le monde des enzymes industrielles et les prix des enzymes sont en baisse entraînant des coupes majeures dans les coûts de production. La capacité de produire des enzymes à un faible coût est donc essentielle.

Par ailleurs, dans la plupart des transformations où elles interviennent, les enzymes ne représentent guère que 0,5 à 5 % de la valeur du produit sur lequel elles agissent, lequel peut, à son tour, n'être qu'un intermédiaire ou un constituant ne représentant qu'une fraction limitée d'un produit fini (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

2 ENZYMES PROTÉOLYTIQUES

Ce deuxième chapitre traite de manière détaillée de divers aspects associés à la production industrielle des protéases. Dans un premier temps, une description sommaire de la nature de ces enzymes est présentée, suivie d'une présentation systématique des différents types d'enzymes protéolytiques. Par la suite, les différentes applications industrielles des protéases sont abordées, ainsi que les méthodes de production de ces enzymes employées à l'échelle industrielle. Les milieux de culture utilisés pour l'étape de fermentation et les techniques d'extraction et de purification des enzymes sont ensuite discutés, alors que les approches de standardisation et de contrôle de l'activité protéolytique viennent compléter les aspects théoriques. Ce deuxième chapitre se termine par la présentation de l'hypothèse de recherche associée à ce projet, ainsi que des objectifs spécifiques de recherche.

2,1 Nature et provenance des protéases

Les protéases (ou protéinases ou enzymes protéolytiques) sont des enzymes hydrolysant les protéines et les polypeptides. En général, toutes les enzymes protéolytiques sont capables d'hydrolyser les liens peptidiques mais diffèrent dans leur mode d'action sur les polypeptides. Les endopeptidases (ou protéinases) peuvent scinder les grosses chaînes de polypeptides des protéines en plus petits fragments quelquefois appelés protéoses ou peptones. Les exopeptidases altèrent ces petites molécules jusqu'à l'obtention d'acides aminés. Les exopeptidases sont également divisées en deux groupes dont l'un attaque le lien peptidique près d'un groupe carboxyle libre (-COOH) (carboxypeptidases) et l'autre qui requiert la présence d'un groupe aminé libre près du lien peptidique (-NH₂) (aminopeptidases) (Rose, 1961 ; Arnaud *et al.*, 1993). Grâce à l'action combinée des endopeptidases et des exopeptidases, les protéines sont hydrolysées en leur constituant, les acides aminés.

Les enzymes d'origine végétale, et spécialement les protéases, sont par ordre d'intérêt décroissant en technologie : la papaine extraite d'une plante équatoriale et tropicale (*Carica papaya*), la broméline isolée de l'ananas (*Ananas comosus Merr*) et la ficine issue de la figue (*Ficus glabrata*). Ces enzymes, classées dans le groupe des protéases thiol, exigent la présence

du groupe -SH- libre dans leur site actif pour exercer une activité protéolytique (Arnaud *et al.*, 1993 ; Aviron-Violet *et al.*, 1982). Les utilisations de la papaïne industrielle sont nombreuses (environ 300 tonnes par année) dont 75 % en brasserie où l'enzyme fait l'objet de tentative d'immobilisation sur des supports de type cellulose, 10 % dans les industries de la viande, 5 % dans la fabrication d'hydrolysats de poissons et de têtes de poulets destinés à l'alimentation animale et 2 % dans l'industrie pharmaceutique (Arnaud *et al.*, 1993).

Seules les pepsines bovines et porcines présentent actuellement un intérêt industriel. La pepsine bovine est un des constituants mineurs normaux de la présure (ou chymosine) mais dont la sécrétion ne devient prépondérante qu'après le sevrage. Elle est préparée à partir du quatrième estomac des veaux non sevrés. Les tissus sont alors découpés, et mis à tremper en solution acide pour activer l'enzyme. Ensuite, le pH est réajusté à 5,5-6,0, correspondant à la stabilité optimale. Après filtration clarifiante, la solution est additionnée de chlorure de sodium pour prévenir les développements microbiens (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Par ailleurs, l'utilisation de pepsine porcine a débuté pendant la seconde guerre mondiale, mais ne s'est réellement développée que depuis 1960. L'enzyme est produite à partir de la muqueuse gastrique du porc où elle se trouve sous la forme d'un précurseur, le pepsinogène, d'un poids moléculaire de 42 000 Daltons. Le Tableau 7 présente les principales protéases d'origine végétale ou animale de même que leur application industrielle.

Tableau 7 Utilisation des protéases d'origine végétale et animale

Applications	Protéases
Fabrication du fromage	Rennine (présure)
Fabrication du pain	Trypsine
Protection des aliments congelés ou refroidis	Papaïne
Attendrissement des viandes	Papaïne
Brasserie	Protéases du malt
Hydrolyse des protéines	Pancréatine, pepsine

2,2 Types de protéases microbiennes

Les protéases provenant de microorganismes sont d'origine bactériennes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, etc.) ou fongiques (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, etc.). Les enzymes protéolytiques provenant de microorganismes sont classées en quatre groupes principaux selon leur mécanisme d'action ; protéinase sérine, protéinase thiol, métalloprotéinase et protéinase acide (Keay et Moser, 1969). Cependant, dans le présent document, il ne sera pas fait mention des protéinases thiols issues de microorganismes puisque ces dernières n'ont pas d'applications industrielles connues jusqu'à maintenant.

2,2,1 Protéases sérines

2,2,1,1 *Subtilisin Carlsberg*

C'est en 1952, que Güntelberg et Ottensen des Laboratoires Carlsberg (Danemark) ont décrit, pour la première fois, la préparation et la cristallisation d'une protéase ayant la capacité de convertir l'ovalbumine en plakalbumine (Ottensen et Spector, 1960 ; Aunstrup *et al.*, 1980). Cette enzyme a, plus tard, été appelée *Subtilisin Carlsberg* et est rapidement devenue la protéase la plus importante du point de vue économique car elle est l'enzyme la plus utilisée dans l'industrie des détergents. Elle est commercialement produite depuis 1960 alors que la compagnie Novo Nordsik a développé une méthode simple de production. La production annuelle de cette enzyme représente approximativement 500 tonnes d'enzymes pures par année.

Si au début des travaux de Güntelberg et Ottensen, le microorganisme responsable de la production de cette enzyme a d'abord été classé comme *Bacillus subtilis*, il est bien établi maintenant qu'il s'agit plutôt de *Bacillus licheniformis*. Néanmoins, ils existent peu de publications sur les travaux effectués sur *Bacillus licheniformis* puisque cette enzyme est extrêmement utilisée dans l'industrie des détergents, entre autres, et qu'elle a fait l'objet de nombreux brevets. Cependant, il appert, selon la compagnie Novo Nordsik, que les protéases connues de différentes souches de *Bacillus licheniformis* sont pratiquement identiques et donc que la production de *Subtilisin Carlsberg* soit spécifique aux espèces du genre *Bacillus*

licheniformis (Ottensen et Spector, 1960).

Bacillus licheniformis est une espèce de *Bacillus* saprophyte étroitement relié à *Bacillus subtilis*. Ce microorganisme peut être utilisé pour produire plusieurs métabolites d'intérêt commercial (Tableau 8). Güntelberg (1954) a rapporté que la production de protéases était de 2,5 g d'enzyme pure par litre de milieu de culture. Il n'existe pas de données sur les productions industrielles mais il semble juste de présumer qu'elles soient supérieures. Güntelberg (1954) mentionne également que la production de protéases commence à la fin de la phase logarithmique de croissance et que la culture finale est asporogène. Cette absence de spores est considérée comme un avantage puisque la sporulation complète arrête la croissance et la formation d'enzymes (Aviron-Violet *et al.*, 1982). De plus, il est très difficile de séparer les spores de la culture finale.

Tableau 8 Métabolites d'intérêt commercial produits par *Bacillus licheniformis*

Métabolites	Produits
Enzymes	Protéase Alpha-amylase Pénicillinase
Antibiotiques	Bacitracine
Solvants	Butylène, glycole, glycérole
Polypeptides	D-glutamylpolypeptide

Subtilisin Carlsberg est donc la première enzyme microbienne à avoir été préparée sous forme cristalline et ses propriétés ont été largement étudiées. Ainsi, la protéase est constituée d'une simple chaîne de peptide avec 274 résidus d'acides aminés, et puisque la cystine et la cystéine en sont absentes, il n'y a pas de ponts disulfures. La structure tertiaire est sphérique avec un diamètre de 4,2 nm. Le site actif est formé par les résidus : Ser 221, His 64 et Asp 32. L'activité enzymatique est entravée par les réactifs qui interagissent avec le groupe sérine comme le di-isopropylfluorophosphonate (DFP) et le fluorure de phénylméthylsulphonyl (PMSF).

Subtilisin Carlsberg a une spécificité qui lui permet d'hydrolyser la plupart des liens peptides et certains liens esters. Pour l'hydrolyse des protéines, aucun activateur n'est nécessaire et le Ca^{2+} n'est pas requis pour sa stabilité comparativement à plusieurs protéases sérines. Dès lors, les agents comme l'EDTA et le tripolyphosphate n'inactivent pas l'enzyme. De plus, la protéase est stable sur une vaste gamme de pH, soit entre 5 et 11. Cependant, le pH optimum dépend des conditions de culture. Enfin, la protéase est stable jusqu'à 50°C.

Par ailleurs, *Subtilisin Carlsberg* n'hydrolyse pas complètement les protéines en acides aminés et la quantité d'hydrolyse atteinte dépend de la protéine en question, des conditions de réaction et de la quantité d'enzyme utilisée. Ainsi, pour la caséine de 30 à 40 % des liens peptides sont hydrolysés seulement (Aunstrup *et al.*, 1980).

2,2,1,2 *Subtilisin Novo*

Subtilisin Novo est une protéase sérine alcaline qui est présente en tant qu'activité annexe lors de la préparation d' α -amylase de *Bacillus*. Cette enzyme a été purifiée et cristallisée pour la première fois en 1954 par Hagihara qui utilisait la préparation commerciale de protéase bactérienne Nagarse (B.P.N.) comme source de protéase. Il appela l'enzyme isolée *Subtilisin B.P.N.* En 1960, Ottesen et Spector ont isolé une enzyme similaire du produit commercial de protéinase bactérienne Novo et l'ont appelé *Subtilisin Novo*. Des travaux subséquents ont démontré que les deux enzymes isolées avaient la même séquence d'acides aminés et étaient donc identiques. Puisque les protéases constituent un sous-produit non-désiré des préparations d' α -amylase, des travaux ont été effectués afin de minimiser le contenu en protéase. Actuellement, la plupart des préparations d' α -amylase sont exemptes de protéases. Par contre, certaines préparations ont été optimisées afin de produire des protéases en plus grandes quantités mais elles présentent un intérêt très faible comparé au marché que détient *Subtilisin Carlsberg* (Aunstrup *et al.*, 1980).

Subtilisin Novo est donc produite par la variété de *B. subtilis* qui produit aussi l' α -amylase. Cette variété est maintenant classée selon le manuel Bergey's comme étant *Bacillus amyloliquefaciens*. Ce microorganisme produit aussi d'autres enzymes d'intérêt commercial dont l' α -amylase, le β -glucanase, l'hémicellulase et des protéases neutres.

La synthèse des protéases alcalines commence à la fin de la phase logarithmique de croissance et est étroitement reliée au processus de sporulation. La productivité des souches est à peine de 10 % de celles retrouvée dans le cas de *B. licheniformis*. Les protéases de *Subtilisin Novo* sont produites lorsque les microorganismes sont dans un milieu riche présentant de bonnes conditions d'aération de même qu'une température entre 30 et 40°C et un pH entre 6,0 et 7,0.

Subtilisin Novo contient 275 acides aminés dans sa séquence. Il y a d'ailleurs une homologie avec *Subtilisin Carlsberg* puisque seulement 58 des 275 résidus d'acides aminés sont différents. Enfin, il n'y a pas de résidus cystéine et donc pas de ponts disulfures. Le site actif comprend : Ser (221), His (54) et Asp (32). De plus, *Subtilisin Novo* est plus dépendante du Ca^{2+} pour sa stabilité que *Subtilisin Carlsberg*. Le Tableau 9 présente une comparaison de certaines propriétés physiques de *Subtilisin Carlsberg* et *Subtilisin Novo*.

Tableau 9 Propriétés physiques de *Subtilisin Carlsberg* et *Subtilisin Novo*

Propriétés	<i>Subtilisin Carlsberg</i>	<i>Subtilisin Novo</i>
Nombre d'acides aminés	274	275
Poids moléculaire selon la séquence des acides aminés	27 277	27 537
Point isoélectrique	9,4	9,1
S _{20w} (unités Svedberg)	2,85	2,81
Viscosité intrinsèque	3,2	3,6
E ^{1mg/mL} _{280nm}	0,95	1,17

2,2,1,3 Protéases de *Bacillus alcalophilus*

Le succès commercial des protéases dans l'industrie de la détergence au début des années 1960 a conduit à des recherches intensives afin de trouver d'autres protéases alcalines ayant une activité supérieure à celle de *Subtilisin Carlsberg*. Les propriétés recherchées étaient une bonne stabilité primaire sous des conditions de lessivage, soient des pH entre 9,0 et 10,0, des températures supérieures à 50°C et la tolérance à la présence de surfactants et d'agents séquestrants. Ces travaux ont conduit à la découverte des protéases alcalines issues de *Bacillus alcalophilus*. Ces protéases ont des caractéristiques similaires à celles du groupe *Subtilisin* mais peuvent avoir un maximum d'activité enzymatique allant jusqu'à pH 12.

Les microorganismes utilisés dans la préparation de ces nouvelles protéases peuvent être caractérisés comme étant des co-partenaires alcalophiles de *B. subtilis* et de *B. licheniformis*. Ces microorganismes sont faciles à faire pousser lorsque le pH est maintenu supérieur à 7,5 en additionnant du carbonate de sodium ou des sels d'acides métabolisables au milieu de culture. Plus de 90 % du bouillon final sera ainsi constitué de protéases alcalines.

Enfin, ces protéases alcalines sont des protéases sérines comme les *Subtilisin*. Elles sont constituées de chaînes de peptides simples dépourvues de ponts disulfures et de carbohydrates. Leur poids moléculaire se situe entre 20 000 et 30 000 et leur point isoélectrique est de 11. Elles sont stables et actives dans une gamme de pH variant entre 6 et 12 et peuvent être utilisées à des températures supérieures à 60°C.

2,2,2 Métallo-protéases

Les métallo-protéases sont des enzymes endopeptidases qui contiennent un métal essentiel, habituellement le Zn. Leur pH optimum se situant autour de 7,0, elles sont donc aussi appelées les protéases neutres. Les métallo-protéases peuvent être retrouvées seules ou associées à d'autres protéases chez plusieurs microorganismes. Ainsi, elles sont formées par plusieurs espèces de *Bacillus*, comme *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megatherium* et *B. stearothermophilus* (Keay *et al.*, 1972). Elles sont également présentes dans les préparations protéolytiques issues des moisissures comme *Aspergillus oryzae*, où la métallo-protéase se retrouve présente avec une protéase acide et une autre alcaline.

Les métallo-protéases issues de *B. amyloliquefaciens* (BA) et *B. thermoproteolyticus* (*Thermolysin*) sont couramment utilisées en industrie. Le marché pour ces enzymes n'est pas très grand, mais il y a quelques applications dans l'industrie des protéines et en d'autres cas mineurs où il est intéressant d'hydrolyser les protéines. Les préparations commerciales de protéases neutre de *B. amyloliquefaciens* contiennent habituellement une quantité appréciable de protéases sérines et α -amylase. Un seul produit commercial, *Neutrase*®, de la compagnie Novo Nordskik, est exempt d'activités de ces deux autres enzymes.

Les métallo-protéases de *B. amyloliquefaciens* peuvent être produites par les mêmes organismes utilisés dans la production de *Subtilisin Novo* et α -amylase. Ces souches sont souvent appelées *B. subtilis* dans la littérature mais l'organisme utilisé commercialement pour la production de ces protéases et amylases est plutôt *B. amyloliquefaciens*. Murray et Prince en 1970 (Aunstrup *et al.*, 1980) ont décrit l'isolement d'une bonne souche de production qui est asporogène, qui ne produit pas de protéase sérine et en même temps produit une meilleure gamme de protéase neutre que la souche-mère. La proportion finale entre les protéases neutres et alcalines dépend de la composition du milieu et des conditions de fermentation (Aunstrup *et al.*, 1980). Puisque la protéase neutre est moins stable dans les milieux de fermentation que la protéase alcaline, un très court temps de fermentation favorisera la production de protéases neutres.

Par ailleurs, la source de *Thermolysin*, *B. thermoproteolyticus* Roko, a été nommée par son découvreur Endo en 1962 (Aunstrup *et al.*, 1980), mais les espèces ne sont pas généralement reconnues et l'organisme devrait plutôt être classifié comme une variété de *B. stearothermophilus* (Aunstrup *et al.*, 1980). Sidler et Zuber en 1977 (Aunstrup *et al.*, 1980) ont préparé une protéase neutre similaire en cultivant *B. stearothermophilus* NCOB 8924. *Thermolysin* est donc produite en faisant croître le microorganisme durant 24 heures à 55°C et à pH compris entre 6 et 8 dans des cultures submergées. Il n'existe pas de résultats publiés à savoir si le microorganisme produit d'autres protéases ou amylases.

La séquence d'acides aminés de *Thermolysin* comprend 316 acides aminés (Tableau 10) en une seule chaîne de peptide exempte de liens disulfures. La molécule est repliée afin de former deux lobes séparés par un profond creux dans le bas duquel un atome de Zn est lié à deux résidus histidine et un résidu glutamate. L'atome de Zn est essentiel pour l'activité et le site actif comprend six acides aminés situés tout près de ce dernier. Quatre atomes de Ca sont également liés à la molécule et sont importants pour la stabilité à la chaleur de l'enzyme.

Les propriétés de la protéase neutre de *B. amyloliquefaciens*, qui est constituée de 326 résidus d'acides aminés, sont très proches de celles de la *Thermolysin*. La principale différence entre les deux enzymes est la thermostabilité. En effet, la *Thermolysin* perd 50 % de son activité

lorsque chauffée durant 15 minutes à un pH de 7,2 et une température de 84°C tandis que *B. amyloliquefaciens* est sensible à une température de 59°C. Les causes de cette différence ne sont pas encore clairement établies mais elles pourraient être reliées au pourcentage plus grand d'acides aminés hydrophobes et la présence de quatre atomes de Ca chez *Thermolysin* au lieu de deux pour *B. amyloliquefaciens*.

Par ailleurs, les métallo-protéases ont une activité maximum pour l'hydrolyse de la caséine à des pH entre 7 et 8 (Aunstrup *et al.*, 1980), et sont stables dans une gamme de pH de 5 à 10. La stabilité augmente considérablement si du Ca²⁺ est ajouté au milieu de culture et diminue lorsque des agents séquestrants sont ajoutés. Ainsi, des agents chélateurs forts, comme l'acide dinitrioloéthylène tétraacétique (EDTA), inhibe l'enzyme en enlevant l'atome de Zn alors que l'enlèvement des atomes de Ca affecte seulement la thermostabilité de l'enzyme. Enfin, les métallo-protéases hydrolysent de préférence les peptides avec des chaînes hydrophobes comme la phénylalanine et la leucine et elles présentent une faible activité estérase.

Tableau 10 Propriétés des métallo-protéases de *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus thermoproteolyticus*

Propriétés	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. thermoproteolyticus</i>
Nombre d'acides aminés	326	316
Poids moléculaire	37 000	34 400
Acide aminé terminal-N	Ala	Ile
Acide aminé terminal-C	Leu	Lys
Nombre d'atomes de Zn par molécule	1	1
Nombre d'atomes de Ca par molécule	2	4

2,2,3 Protéases acides

Plusieurs moisissures produisent des protéases avec des pH optimum entre 3,0 et 5,0. Ces protéases acides ne sont pas inhibées par les agents inhibiteurs des protéases-sérines, les agents séquenceurs ou les réactifs avec des groupes thiols. Ces propriétés sont étroitement reliées à celles des enzymes digestives animales, pepsine et rennine. Ces enzymes présentent donc un intérêt industriel dans les secteurs où l'hydrolyse des protéines à faible pH est désirée. Deux

applications prédominant dont l'hydrolyse des fèves de soya afin de produire de la sauce soya et la coagulation du lait pour la préparation de fromage. D'autres applications se retrouvent dans l'industrie boulangère, dans l'industrie pharmaceutique et la brasserie.

Plusieurs protéases acides sont disponibles commercialement mais la plupart de ces préparations sont utilisées dans des travaux de laboratoire. L'utilisation industrielle est pratiquement limitée aux enzymes de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* et *Mucor miehei*. Les ventes de ces protéases représentent de 5 à 10 millions de dollars américains environ. Cependant, la valeur des protéases du groupe *Aspergillus* est difficile à évaluer puisque les microorganismes sont utilisés directement par les producteurs de sauce soya ou autres mets asiatiques.

2,2,3,1 Protéases d'*Aspergillus niger*

La protéase la plus connue est la protéase acide *Aspergillopeptidase A*[®] produite par *Aspergillus saitoi* (ou *Aspergillus phoenicis*). Cette enzyme a été isolée en 1956 par Yoshida et est commercialement disponible depuis ce temps, mais ces applications industrielles sont limitées. Ainsi, on la retrouve principalement dans les préparations digestives. De plus, de petites concentrations de protéases acides sont parfois retrouvées dans d'autres préparations d'*Aspergillus niger* comme la glucoamylase et la pectinase.

La production commerciale s'effectue sur des milieux semi-solides de son de blé contenant de l'azote inorganique. Les méthodes précises ne sont, en général, pas publiées. Ichishima en 1970 (Aunstrup *et al.*, 1980) a, cependant, décrit des méthodes de cultures en laboratoire sur milieu semi-solide ou liquide d'*Aspergillus saitoi* ATCC 14332. La culture est effectuée entre 30 et 35°C à un faible pH durant 60 à 96 heures. L'enzyme est récupérée par précipitation à l'éthanol. Habituellement, une activité importante de la part d'une carboxy-peptidase acide est également retrouvée dans le précipité.

Aspergillopeptidase A[®] est une protéase acide typique. Son pH optimum pour l'hydrolyse des protéines à 30°C se situe entre 2,5 et 3,0, et sa gamme de pH s'étend entre 2,0 et 5,0. Elle a une spécificité relativement étroite qui ressemble à celle de la pepsine puisque les liaisons

peptides avec une chaîne hydrophobe sont préférentiellement attaquées. Elle a une faible activité peptidase, amidase et estérase. La trypsinogène et la chymotrypsinogène sont activées par l'enzyme. De plus, la molécule contient de 283 à 289 acides aminés (poids moléculaire entre 34 000 et 35 000) et est constituée d'une seule chaîne de peptide avec un résidu sérine à son N-terminal et alanine à son C-terminal. La molécule contient aussi deux résidus cystéine qui forment un lien disulfure. Enfin, il n'y a pas de méthionine présente dans la molécule et il n'y pas de preuve qu'elle contienne du carbohydate.

2,2,3,2 *Protéases d'Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae et *Aspergillus sojae* sont d'importantes sources d'enzymes industrielles, particulièrement pour l'industrie alimentaire. Ainsi, *Aspergillus oryzae* est utilisé pour produire des préparations de takadiastase qui sont des préparations contenant de multiples enzymes préparées sur des milieux semi-solides de son de blé par des moisissures. Les plus importantes enzymes de la takadiastase sont les α -amylase et les protéases et les préparations commerciales contiennent habituellement les deux types d'enzymes en quantité appréciable de sorte qu'il est parfois difficile de bien connaître une préparation quant à son contenu spécifique. Les protéases retrouvées sont soit acide, soit neutre ou soit alcaline, ce qui leur confère une activité protéolytique sur une vaste gamme de pH. La takadiastase est utilisée principalement pour fabriquer des préparations digestives et dans l'industrie boulangère. Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont aussi employées en médecine pour la dissolution des caillots sanguins. Enfin, les protéases issues d'*Aspergillus sojae* ne sont pas commercialement disponibles puisqu'elles sont directement utilisées par les producteurs de sauce soya.

L'obtention industrielle de protéases d'*Aspergillus oryzae* s'effectue donc sur milieu semi-solide de son de blé. Les souches commerciales ne sont pas disponibles mais la souche *Aspergillus oryzae* NRLL 2160 est souvent utilisée pour la production en laboratoire de protéases. Lorsque ces souches sont cultivées en milieu liquide, il y a seulement une production de protéases sérines. En fait, la proportion entre les diverses protéases dépend des conditions de culture et la production spécifique de protéase acide est favorisée par la croissance des microorganismes à faible pH.

Aspergillus oryzae produit des protéases acide, neutre et alcaline et il a été possible d'isoler plusieurs isoenzymes de chaque type. Les protéases acides ont un optimum de pH pour l'hydrolyse des protéines entre pH 4,0 et 4,5. Elles sont stables à des pH entre 2,5 et 6,0 et sont inactivées à 50 % après 10 minutes à 60°C. De plus, l'enzyme présente une faible activité estérase. Elle active le trypsinogène, et son centre actif est similaire à celui de la pepsine. Lorsque l'enzyme est produite en milieu semi-solide, deux composants de l'enzyme peuvent être isolés, l'un étant une glycoprotéine avec environ 50 % d'hydrates de carbone alors que l'autre n'en contient pas. Par ailleurs, lorsque l'enzyme est isolée de cultures liquides, tous ces composants contiennent des hydrates de carbone. Par ailleurs, deux composants neutres ont aussi été isolés. Ce sont des métallo-protéases types qui sont inhibés par des agents séquestrants. L'une de ces protéases neutres a un pH optimum de 7,0, est stable entre 5,5 et 12, et est rapidement inactivée au-dessus de 50°C tandis que l'autre a pH optimum entre 5,5 et 6,0 et retient plus de 70 % de son activité lorsque chauffée à 90°C durant 10 minutes. La protéase alcaline, pour sa part, a un optimum de pH entre 7,0 et 8,5, est stable entre 4,5 et 9 et est rapidement détruite à 60°C. Il s'agit d'une protéase sérine et ses propriétés sont similaires aux protéases sérines de *Bacillus* spp. L'enzyme est stabilisée par l'ajout de Ca²⁺ et inhibée par des réactifs sérines.

Les préparations de protéases d'*Aspergillus oryzae* contiennent aussi des quantités substantielles de peptidases qui sont importantes pour la production d'acides aminés libres dans l'hydrolysat. Les composés protéolytiques d'*Aspergillus sojae* sont similaires à ceux d'*Aspergillus oryzae* même si il est possible de distinguer les enzymes des deux espèces par électrophorèse.

2,2,3,3 *Protéases de Mucor spp.*

Les deux souches thermophiles de *Mucor*, *Mucor pusillus* et *Mucor miehei* sont importantes par leur production de présure microbienne. L'enzyme de *M. pusillus* a été introduite en 1969 et celle de *M. miehei* en 1972. Les ventes de ces deux enzymes représentent environ 5 millions de dollars américains par année.

Les deux microorganismes et les enzymes qu'ils produisent sont étroitement reliés même s'il existe des différences importantes dans les deux enzymes qui sont décisives pour leur production de même que pour leurs applications. Ces protéases sont principalement utilisées pour la coagulation du lait et la fabrication de fromage.

La souche de *Mucor pusilus* isolée par Arima en 1964 (Aunstrup *et al.*, 1980), lorsqu'il a découvert l'enzyme, n'est pas disponible au public, mais les souches ATCC 16458 et NRRL 2543 sont utilisables pour produire l'enzyme. La souche NRLL 2543 a été étudiée principalement par Somkuti et Baloil (Aunstrup *et al.*, 1980) qui ont découvert, en 1968, qu'ils pouvaient produire la protéase en culture liquide dans un milieu contenant 5 % de son de blé en suspension. Les quantités obtenues sont cependant très faibles par rapport à celles issues de culture sur milieu semi-solide ce qui confère à cette dernière méthode un intérêt industriel beaucoup plus grand. Les détails de la méthode de production utilisée sont peu connus mais on peut supposer que les moisissures sont cultivées sur un milieu humide de son de blé avec des additifs variés à une température de 30°C, tel que décrit par Arima en 1964 (Aunstrup *et al.*, 1980). Après une incubation de trois jours, l'enzyme est extraite du son avec de l'eau et est récupérée par précipitation à l'éthanol. Durant la culture, quelques activités parallèles peuvent se former dont la cellulase, la lipase et une protéase non-spécifiée. Ces enzymes peuvent être éliminées par des traitements à l'acide, par l'absorption sur du dioxyde de silicium ou d'autres absorbants. En général, les préparations commerciales ne contiennent qu'une seule protéase acide.

L'enzyme est donc une protéase acide typique avec un résidu aspartate sur son site actif. Elle constituée d'une simple chaîne de peptide et son poids moléculaire est d'environ 30 000 Daltons. Même si la molécule contient deux groupes cystéines, il n'y a pas de liens disulfures et pas de carbohydrate. Son pH optimum pour l'hydrolyse de l'hémoglobine est de 4,0 alors que pour la caséine il est de 4,5. L'enzyme est spécifiquement active sur les liens peptides impliquant une chaîne aromatique. Elle est stable entre des pH de 3,0 à 6,0 et perd 90 % de son activité lorsque chauffée durant 15 minutes à 65°C et à pH 5,5. Ces propriétés sont similaires à celles de la pepsine et de la présure, mais sont différentes dans les activités de coagulation du lait.

Par ailleurs, plusieurs souches de *Mucor miehei* sont susceptibles d'être utilisées pour la production commerciale de protéase acide, dont CBS 370,65 (Aunstrup *et al.*, 1980), NRRL 3420 et NRRL 13042. Ces souches peuvent produire des protéases acides dans les mêmes proportions.

Mucor miehei est, en outre, bien adaptée pour la culture en milieu liquide. Ainsi, de bonnes quantités d'enzymes sont obtenues dans un milieu contenant 4 % d'amidon de pommes de terre, 3 % de dérivés de soja et 10 % d'orge (Aunstrup *et al.*, 1980). Le microorganisme est incubé entre 30 et 35°C et le pH est maintenu entre 5,0 et 7,0. Durant la culture, des lipases sont formées et doivent être enlevées avant que la protéase acide soit utilisée pour la production de fromage. La formation de protéase non-spécifique est négligeable et il n'est donc pas nécessaire d'inclure une autre étape d'élimination de cette enzyme. La protéase acide est, par ailleurs, vendue sous une forme liquide, et le procédé de récupération consiste tout simplement à enlever le mycélium du bouillon de culture et à concentrer le liquide contenant l'enzyme par évaporation ou ultrafiltration.

La protéase de *Mucor miehei* est une protéase acide-aspartate avec un poids moléculaire de 38 000 Daltons. La molécule est constituée d'une chaîne simple de peptides et contient environ 6 % d'hydrate de carbone. Elle est stable à 38°C entre des pH de 3,0 à 6,0 avec un optimum à 4,5 pour la stabilité et pour l'activité à dénaturer l'hémoglobine. L'enzyme hydrolyse spécifiquement les liens peptidiques impliquant une chaîne aromatique et hydrophobe. Dans son action à oxyder la chaîne d'insuline B, elle montre des similarités avec la pepsine, la présure et la protéase de *Mucor pusillus*. Ces propriétés pour la coagulation du lait sont aussi similaires, mais elles sont différentes pour sa dépendance à la température et aux concentrations en Ca^{2+} .

2,2,3,4 Protéases d'*Endopathia parasitica*

Cette enzyme a été découverte en 1965 par Sardinas (Aunstrup *et al.*, 1980) et a été commercialement utilisée comme présure microbienne à partir de 1969. Elle comporte une activité protéolytique supérieure à celles issues de *Mucor* spp., mais néanmoins n'est pas très utilisée. Elle a ainsi montré de bons résultats pour la production de fromage emmental.

Une souche appropriée d'*E. parasitica* (ATCC 14729) est cultivée dans un milieu de culture contenant 3 % d'extrait de soja, 1 % de glucose, 0,3 % de nitrate de sodium, 1 % de lait écrémé, 0,05 % de phosphate dihydrogène de potassium et 0,025 % de sulfate de magnésium. La période d'incubation est de 48 heures à un pH entre 6,0 et 7,0 et une température de 28°C. L'enzyme étant très instable, il est nécessaire de la récupérer rapidement à de faibles températures et de préférence en absence d'oxygène. L'enzyme est toujours commercialisée sous forme solide.

La protéase acide d'*Endopathia parasitica* a un poids moléculaire entre 34 000 et 39 000 Daltons. Elle est constituée d'une chaîne simple de peptides sans carbohydrate. Elle est stable à des pH entre 4,0 et 4,5 avec un optimum à 4,5. Elle est inactivée en moins de 5 minutes à 60°C. Son point isoélectrique est de 5,5, et son optimum pour l'hydrolyse de l'hémoglobine dénaturée est à pH 2,0. L'hydrolyse de l'insuline B oxydée montre une plus grande spécificité que la pepsine, la présure ou que les protéases de *Mucor* spp. L'activité de coagulation du lait est moins dépendante de la température et du contenu en Ca²⁺ que la présure et les protéases de *Mucor* spp.

2,3 Applications industrielles des protéases

Tel que mentionné dans les sections précédentes, les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Ces protéases produites à partir de différentes sources microbiennes sont commercialisées sous plusieurs noms par quelques compagnies hautement spécialisées. Le Tableau 11 présentent les principales protéases utilisées commercialement selon leur nom commercial, leur source microbienne et leur fabricant.

Tableau 11 Protéases utilisées commercialement selon leur nom commercial, leur source microbienne et leur fabricant (Aunstrup *et al.*, 1980)

Microorganismes	Noms commerciaux	Fabricants
<i>Aspergillus niger</i>	Proctase®	Novo Nordsik (Danemark)
	Pamprosin®	Yakult Biochemicals (Japon)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Veron P®	Röhm GmbH (Danemark)
	Panasyme®	Associated British Maltsters (Angleterre)
	Prozyme®, Biozyme A®	Amano (Japon)
	Sanzyme®	Sankyo (Japon)
	Sumyzyme AP®	Shin Nihon (Japon)
	Protéases fongiques	Miles (Etats-Unis)
<i>Rhizopus sp.</i>	Newlase®	Amano (Japon)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (<i>Bacillus subtilis</i>)	Neutrase®	Novo Nordsik (Danemark)
	Rapidermase®	Société Rapidase (France)
	Proteinase 18®	Associated British Maltsters (Angleterre)
	Protin®	Daiwa Kasei (Japon)
	Biopraxe®, Nagase®	Nagase (Japon)
	Rhosyme®	Rohm and Haas (Etats-Unis)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Alcalase®	Novo Nordsik (Danemark)
	Optimase®	Miles Kali-Chemie GmbH (Allemagne)
	Maxatase P®	Gist Brocades N.V. (Hollande)
<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	Termoase®, Thermolysin®	Daiwa Kasei (Japon)
<i>Bacillus alcalophilus</i>	Esperase®, Savinase®	Novo Nordsik (Danemark)
	Protéases hautement alcalines	Gist Brocades N.V. (Hollande)
<i>Endothia parasitica</i>	Surecurd®, Suparen®	Pfizer (États-Unis)
<i>Mucor miehei</i>	Rennilase®	Novo Nordsik (Danemark)
	Fromase®	Gist Brocades N.V. (Hollande)
	Morcurd®	Pfizer (États-Unis)
<i>Mucor pusillus</i>	Marzyme®	Miles (États-Unis)
	Emporase®, Meito rennet®, Noury lab®	Meito Sangyo (Japon)

2,3,1 Détergents

Les procédés de buanderies sont destinés à enlever les taches sur les tissus de la façon la plus simple possible. Dans la plupart des procédés, un agent de lavage est utilisé. Cet agent peut être constitué d'un ou de plusieurs surfactants, d'agents séquestrants, alcalins et autres. En Europe, il est commun d'incorporer du perborate, qui agit alors comme un agent blanchissant en libérant du peroxyde d'hydrogène à des températures supérieures à 50°C. Dans d'autres pays, comme les États-Unis, le blanchiment est obtenu par addition d'agents blanchissants de façon séparée sous la forme d'hypochlorite après la phase de lavage (souvent au rinçage).

Les tissus deviennent sales lorsqu'ils absorbent des particules ou des solutions des matériaux qui nous entourent ou qui sont excrétés par le corps. La nature de la saleté est évidemment très variable mais peut être classée en général comme étant de la terre, de petites particules inertes, des lipides, des hydrates de carbone, des protéines et autres. Dans les procédés de lavage, la chaleur, les conditions alcalines et la présence de surfactants et d'agents séquestrants vont dissoudre ou disperser la plupart de ces composés, et les agents blanchissants vont décomposer les autres particules non-dissoutes. Cependant, les saletés d'origine protéinique ne seront pas toujours enlevées par ces traitements, et les protéines toujours accrochées aux tissus seront capables de retenir d'autres composés. En effet, les protéines peuvent coaguler sur les tissus d'une telle façon qu'elles ne peuvent être dissoutes aux pH usuels (entre 9,0 et 10,0) des processus de lavage. Cette coagulation serait causée par le pH alcalin, la température, les procédés enzymatiques, comme la coagulation du sang, et par l'action des agents oxydants comme le peroxyde d'hydrogène formé par les détergents contenant du perborate lorsque soumis à des températures supérieures à 50°C. Cette dernière action revêt une importance particulière puisque les taches protéiniques qui ne seront pas enlevées à 50°C précipiteront sur les tissus et seront d'autant plus difficiles à enlever.

L'utilisation d'enzymes protéolytiques permet de résoudre ce problème. Ainsi, les protéases hydrolyseront les protéines dissoutes ou coagulées et les composés solubles dégradés seront facilement rincés hors du tissu. Il est, dès lors, facile de comprendre que ces enzymes permettent d'enlever les taches de sang même s'il est souvent mentionné que les particules de

sang sont plutôt rares et qu'il semble superflu d'ajouter des protéases pour cette seule raison. Néanmoins, les protéases peuvent dissoudre un très nombre d'autres taches qui ne sont pas nécessairement apparentes mais qui, après plusieurs lavages donneraient des vêtements ayant une apparence terne. Ces taches incluent les protéines des sécrétions corporelles et des particules de peau, de même que de la nourriture comme le lait, les œufs, la viande, le poisson, ainsi que le matériel végétal comme l'herbe. L'habilité des protéases à enlever ces divers composés a été prouvée lors de nombreux tests impliquant à la fois des tissus ordinaires et des tissus sur lesquels des composés précis ont été appliqués. Ainsi, des tests effectués par les fabricants de détergents ont clairement démontrés que les protéases sont des composés très efficaces dans la plupart des procédés de lavage.

En général, les enzymes sont appliquées à l'étape de pré-lavage où les vêtements sont imbibés de la solution de détergents à de faibles températures pour une période de temps considérable avant le lavage final. De cette façon, l'enzyme a suffisamment de temps pour accomplir son travail et, dès lors, un meilleur résultat est obtenu. Par contre, cette méthode requiert de longs temps de séjour et augmente le risque d'une croissance microbienne à cause des microorganismes présents dans les vêtements souillés, ce qui donnerait aux vêtements des odeurs plutôt déplaisantes. Dans une procédure courante en Europe, le lavage consiste en un pré-lavage entre 20 et 30°C durant 10 à 12 minutes suivi par un lavage principal où les éléments sont chauffés à la température désirée (40, 60 ou 95°C selon le tissu) durant une période de 30 à 60 minutes. De cette façon, les protéases agiront très bien car le pré-lavage et le lavage principal à des températures jusqu'à 60°C augmenteront leur activité. Aux États-Unis, le lavage est souvent accompli en ajoutant de l'eau chauffée entre 50 et 60°C aux vêtements et on procède au lavage après un refroidissement de 10 à 15 minutes. De cette façon, les protéases bénéficient de moins de conditions favorables à leur action même si ce traitement améliore aussi considérablement le traitement des taches protéiniques.

L'action des enzymes protéolytiques est dépendante des autres composantes du détergent. Ainsi, les agents oxydants vont inactiver les protéases rapidement. De même, quelques surfactants dénatureront les enzymes. Ceci est particulièrement vrai pour les surfactants cationiques alors que les surfactants anioniques seront moins néfastes et les non-ioniques

n'auront aucun effet sur la stabilité de l'enzyme. De plus, la plupart des détergents contiennent du tripolyphosphate comme agent séquestrant, ce qui implique que les protéases des détergents ne doivent pas être dépendantes du contenu en Ca^{2+} pour leur stabilité. Enfin, à cause des risques de pollution, d'autres agents séquestrants ont été proposés comme l'acide nitrilotriacétique ou l'acide citrique. Les propriétés de ces agents ne sont en général pas aussi bonnes que celles du tripolyphosphate, mais il a été démontré, qu'avec ces agents, l'utilisation des enzymes protéolytiques améliorent l'efficacité du lavage d'une façon significativement plus grande que lorsque le tripolyphosphate est l'agent séquestrant.

Habituellement le contenu en protéases d'un détergent est de 0,5 % d'une préparation contenant 3 % d'enzyme protéolytique active. Ainsi, si 5 g de détergent par litre est utilisé, la concentration en enzymes sera de 0,75 ppm. Cette concentration peut sembler très faible mais il faut se souvenir que l'affinité entre l'enzyme et son substrat est très grande et que l'enzyme est actif jusqu'à épuisement du substrat.

Les enzymes protéolytiques forment un composé important des détergents depuis plus de 35 ans. Les habitudes de lavage du futur détermineront si les protéases seront encore une option valable. Cependant, en raison des tendances actuelles à minimiser le contenu en phosphate et à abaisser les températures de lavage, il est facile de prévoir que l'emploi des enzymes protéolytiques sera en augmentation dans les compositions lessivielles.

2,3,2 Présures microbiennes

Depuis l'origine de la production de fromage, les procédés manufacturés ont été adaptés aux propriétés de la présure de veau, qui est une enzyme idéale à cette fin. Cette enzyme est facilement disponible dans les communautés agricoles, et elle coagule le lait rapidement à son pH naturel avec très peu de dégradation subséquente des protéines du lait. Le principal désavantage relié à l'utilisation de cette enzyme est qu'elle peut être extraite seulement du quatrième estomac des veaux non-sevrés, une ressource qui se fait de plus en plus rare, car il n'est pas rentable économiquement de tuer d'aussi jeunes veaux. Les enzymes microbiennes ont donc été introduites graduellement comme alternative à la présure de veau.

Les propriétés des trois enzymes microbiennes qui ont obtenu un succès commercial sont voisines de celles de la présure, mais certaines différences sont importantes dans le processus de fabrication du fromage. Ainsi, le rapport entre l'activité coagulante du lait et l'activité protéolytique est inférieure dans le cas des enzymes microbiennes à celle de la présure de veau. De plus, la variation de l'activité coagulante du lait avec la température, le pH et la concentration en Ca^{2+} diffère également de la pepsine de veau. En effet, les enzymes protéolytiques provenant des espèces de *Mucor* sont plus dépendantes de la température que la celles extraites du veau, de même que les protéases de *M. pusillus* sont plus affectées par la concentration en Ca^{2+} .

Les protéases de *Mucor* se sont avérées excellentes pour la préparation de la plupart des types de fromage après l'ajustement des techniques de production. Puisqu'il semble important de réduire la concentration en enzymes durant le procédé, particulièrement quand les enzymes proviennent de *M. pusillus*, il est souvent recommandé d'augmenter le contenu en Ca^{2+} dans le lait. D'autres modifications dans les techniques de production incluent l'ajustement du brassage, la réduction du temps et la variation des températures. De plus, le type et le dosage de la culture de départ peut être adapté en fonction des présures microbiennes. Le principal désavantage des protéases de *Mucor* est la température élevée nécessaire pour son inactivation, ce qui a des répercussions importantes dans la fabrication de fromages au lait cru.

Les présures microbiennes, principalement du type *Mucor*, couvrait en 1978, 10 % du marché des présures directement en compétition avec les présures animales. De plus, les présures microbiennes ont jusqu'à maintenant une position importante comme substitut à la rénine même si cette dernière demeure l'option la plus populaire. Par contre, il semble bien improbable que les présures microbiennes supplantent les préparations animales quoique leur prix plus faible, leur stabilité de qualité et une disponibilité illimitée feront en sorte d'augmenter considérablement leur part du marché des présures.

2,3,3 Tannerie

Dans la tannerie, le délainage enzymatique est utilisé depuis le début du siècle et plusieurs sources microbiennes et méthodes ont été suggérées. Jusqu'à présent, quelques usages limités

avec les enzymes ont été faits à cette fin car les procédés enzymatiques s'avèrent plus coûteux et plus difficiles d'utilisation que les méthodes chimiques.

La méthode de délainage la plus employée actuellement consiste à effectuer des traitements avec de la chaux contenant du sulfite de sodium. L'action de délainage est alors rapide et efficace et, au même moment, la peau est assouplie à cause de l'effet alcalin, un phénomène qui rend les manipulations subséquentes plus faciles. Le poil est plus ou moins endommagé durant ce procédé mais cela n'a guère d'importance puisqu'il a très peu ou pas du tout de valeur commerciale. Cependant, si le poil doit être récupéré, comme dans le cas de la laine d'agneau, la chaux et le sulfite de sodium sont appliqués sur le côté chair de la peau et le poil est alors relargué sans dommages subséquents.

Par contre, plusieurs désavantages sont associés à l'emploi de ces produits chimiques dont en premier lieu des impacts majeurs sur la sécurité des travailleurs et l'environnement. Des accidents, souvent néfastes, à cause de la formation de sulfure d'hydrogène ne sont pas rares, et en raison de ces circonstances la présence de sulfures dans l'usine rend le travail désagréable. De même, le traitement des eaux usées issues de ces industries cause de sérieux problèmes. Par conséquent, l'emploi de méthodes enzymatiques semble une alternative intéressante à tous ces inconvénients.

Ainsi, des enzymes protéolytiques de tous les types ont la capacité de libérer les poils et la laine selon les conditions sous lesquelles elles sont actives. Les peaux peuvent être traitées avec une solution enzymatique dans une cuve ou être aspergées sur le côté chair. Puisque la réaction enzymatique est directement dépendante de la température, il est usuel de chauffer les chambres de conditionnement entre 30 et 35°C. Les protéases agissent bien à des pH modérément alcalins, comme celles produites par *B. licheniformis*. Une méthode particulière fait appel à des protéases hautement alcalines provenant d'une espèce de *Bacillus* en combinaison avec de la chaux. Dans ce cas, où les pH sont de 12 à 12,5, un délainage satisfaisant est obtenu.

Dans un procédé typique de ce type, les peaux sont traitées avec de 1,5 à 10 fois leur propre poids avec un liquide contenant 8 % de chaux et 0,1 % d'enzymes protéolytiques durant une

période de 18 à 24 heures à une température de 20 à 30°C.

Après l'enlèvement des poils, les peaux subissent le reverdissage afin de rendre la peau douce et élastique. Autrefois, des enzymes étaient ajoutées dans ce but aux peaux sous la forme d'excréments de chiens ou d'oiseaux mais en 1910, Rohm a découvert qu'il était possible d'utiliser les enzymes protéolytiques du pancréas en remplacement des produits usuels qui causaient des problèmes d'odeurs. Le comportement chimique exact qui induit cette méthodologie n'est pas encore bien défini et le résultat final est encore une question d'apparence et de texture du cuir ainsi obtenu. Néanmoins, il a été clairement démontré que les enzymes protéolytiques seules peuvent être utilisées dans l'étape de reverdissage. Les détails associés à cette opération, incluant le pH, la température, la concentration en enzymes et la durée, sont fonction de l'expérience et sont développés individuellement par les tanneurs.

Les préparations enzymatiques servant pour le reverdissage peuvent contenir de la trypsine pancréatique ou des protéases de *A. oryzae*, *B. amyloliquefaciens* ou *B. licheniformis* ou un mélange de ces différentes enzymes. La sciure de bois est un ingrédient fort populaire dans la préparation de ces enzymes puisqu'il facilite l'application des enzymes sur les peaux et la récupération de ces derniers. Il est néanmoins plus économique d'asperger directement les peaux avec les solutions enzymatiques. De plus, l'ajout d'enzymes protéolytiques dans l'eau de lavage favorise l'absorption de l'eau par les peaux ce qui est particulièrement pratique lorsque des peaux séchées sont utilisées.

Le développement futur de l'enzymologie dans l'industrie du tannage est difficile à évaluer. Ainsi, le délainage enzymatique est prêt à utiliser et pourrait même être amélioré mais des problèmes de dispersion forment présentement une barrière économique. Cependant, l'emploi d'enzymes dans le reverdissage fera de plus en plus appel aux protéases microbiennes de préférence à la trypsine pancréatique en raison des coûts de fabrication du cuir qui sont à la hausse.

2,3,4 Boulangerie

Les enzymes amylolytiques sont utilisées pour ajuster les propriétés de la farine depuis plus de 50 ans. La source initiale était le malt, mais plus tard les enzymes de *A. oryzae* ont été graduellement employées à ces fins. L'objectif principal de ces ajouts est d'aider à la formation de sucres fermentescibles et ainsi de donner aux levures de meilleures possibilités pour faire lever la pâte à pain (Aunstrup *et al.*, 1980).

La première préparation fongique utilisée était relativement pauvre en activité amylolytique, mais plutôt haute en activité protéolytique, ce qui causa un effet parallèle déplaisant puisque la protéase attaquait le gluten de la farine et détruisait sa capacité à retenir le dioxyde de carbone produit par les levures. Le pain devenait alors plat et gluant (Reed, 1966). Ce problème a depuis été résolu par le développement d'amylase fongique contenant peu ou pas du tout de protéases. Néanmoins, les protéases fongiques ont maintenant trouvé une application de plus grande importance en boulangerie, soit pour ajuster les propriétés du gluten.

Ainsi, lors de la préparation de la pâte, un mélange mécanique combiné à des périodes de repos est nécessaire afin de préparer la pâte pour le boulanger et ce à cause du comportement élastico-visqueux du gluten. En effet, les propriétés du gluten varient constamment ce qui a un impact direct sur les qualités de la pâte. Il s'agit d'un inconvénient majeur dans l'industrie boulangère et il est maintenant usuel d'ajuster les propriétés de la farine avant de commencer à l'utiliser. Ceci peut être effectué avec des agents oxydants qui vont accroître la force du gluten, en réagissant avec les groupements thiols du gluten et en créant des ponts disulfures, ou par des agents réducteurs qui auront l'effet opposé. Ces agents peuvent être du bromate, du peroxyde, du sulfite ou de la cystéine. Cependant, ils sont indésirables dans la nourriture et par conséquent interdit dans plusieurs pays.

Une autre façon d'affaiblir le gluten à un niveau constant est d'ajouter des protéases et ainsi d'ajuster la préparation de la pâte selon les propriétés amendées, ce qui implique des temps de mélange et de repos inférieurs, soit un avantage pour l'industrie boulangère. Les protéases issues de *A. oryzae* sont les favorites pour ces usages, car elles ont une bonne activité aux pH usuels de la pâte, soit entre 5,0 et 6,0, et qu'elles sont rapidement inactivées durant la cuisson.

Les protéases de *B. amyloliquefaciens* peuvent aussi être utilisées si la préparation ne contient pas d'alpha-amylase. Mais, jusqu'à présent, elles sont très peu employées, par conservatisme, de même que par le fait qu'aux États-Unis seules les protéases de *A. oryzae* sont autorisées pour cette usage.

Dans la fabrication de biscuits et de craquelins, la pâte doit être très souple afin de prévenir le morcellement et le craquement des biscuits lors de la cuisson. Aussi, l'impression précise de lettres et de décorations, qui sont très communes dans les biscuits, requièrent une pâte très souple et très élastique. Dans ce cas, les protéases bactériennes s'avèrent un excellent choix et particulièrement les protéases neutres. La quantité d'enzymes ajoutée à la farine est extrêmement faible, soit environ 0,01 ppm de protéine enzymatique active. La plupart des préparations enzymatiques employées à ces fins sont standardisées à une activité faible avec la farine.

2,3,5 Brasserie

L'application traditionnelle des protéases dans l'industrie de la brasserie est la protection de la stabilité colloïdale à froid, soit d'empêcher la formation d'un précipité de protéine et de tannine causé par l'entreposage à froid de la bière. Les protéases bactériennes et fongiques peuvent être utilisées à cette fin, avec néanmoins une préférence envers les enzymes protéolytiques de la papaye (papaine) et de l'ananas (broméline). Les protéases microbiennes n'ont pas été utilisées de façon extensive commercialement à cette fin car, dans plusieurs pays, ces enzymes n'ont pas encore été approuvées pour cet usage. Par ailleurs, elles n'offraient pas d'avantages supérieures aux enzymes des plantes.

Aux cours des dernières années (début des années 1980), il y a eu un intérêt croissant afin de substituer au malt traditionnel de l'orge cru ou d'accroître les quantités d'adducteurs de brasserie. Lorsque ces modifications sont effectuées, il devient alors nécessaire d'ajouter des enzymes microbiennes comme l'alpha-amylase afin d'obtenir une fermentation suffisante et du bêta-glucanase microbien pour abaisser la viscosité du magma formé par le complexe orge-bêta-glucose. Par ailleurs, l'abaissement de la concentration en malt a un impact négatif sur la quantité d'acides aminés libres formés durant la fermentation. Il est alors devenu essentiel

d'introduire une protéase afin de contrer ces effets. Ainsi, la meilleure enzyme commerciale à cette fin est la métallo-protéase neutre de *B. amyloliquefaciens* puisque son pH d'activité maximum est très proche des pH de brassage, entre 5,0 et 6,0, et qu'elle n'est pas affectée par la présence des inhibiteurs de protéases de l'orge, qui perturbent les protéases sérines. Cette métallo-protéase neutre a aussi le très grand avantage d'activer la bêta-amylase de l'orge et donc d'accroître l'activité amylolique lors de la fermentation. De plus, l'addition de protéases doit toujours être effectuée lorsqu'une grande proportion d'orge est utilisée au broyage, mais aussi pour compenser les effets d'une préparation de malt ayant une activité protéolytique faible ou pour accroître la concentration en acides aminés dans le mélange lorsqu'un pourcentage élevé d'adducteurs de brasserie est ajouté. La quantité de protéinase utilisée en brasserie est faible, ainsi elle est habituellement inférieure à 0,001 % de l'orge comme enzyme protéinique active ou moins de 1 ppm de tout le mélange (Aunstrup *et al.*, 1980).

2,3,6 Attendrissement des viandes

Le traitement des viandes avec des protéases pour améliorer ses qualités est une ancienne pratique dans les pays tropicaux où des ananas frais étaient servis avec les viandes ou bien celles-ci étaient conservées dans des feuilles de papayer afin que les enzymes protéolytiques de ces deux plantes puissent les attendrir. Les effets recherchés sont une dégradation primaire des tissus connecteurs de collagène et d'élastine, et la majeure partie de l'action enzymatique s'effectue dans une gamme de température entre 40 et 60°C.

La papaine a été largement utilisée à cette fin. Ainsi, il est possible de l'appliquer sur la viande immédiatement avant la préparation ou bien l'enzyme peut être injectée à l'animal juste avant l'abattage. Ceci est possible, car l'enzyme est alors inoculée sous sa forme oxydée inactive, laquelle devient active par réduction dans le corps de l'animal. L'enzyme attendrisseur idéal doit attaquer les tissus connecteurs à de faibles températures et être inactivée à 50°C. Elle doit aussi avoir une bonne activité aux pH usuels de la viande, soit entre 4,0 et 5,0.

Jusqu'à maintenant, plusieurs essais ont été effectués afin d'introduire des enzymes microbiennes, bactériennes ou fongiques, pour cette application. Mais aucune des enzymes utilisées n'a pu être commercialisées avec succès. L'activité sus-jacente aux tissus connecteurs

est trop faible, et de plus il n'a pas été possible de trouver une enzyme microbienne ayant les mêmes propriétés que la papaine, soit sa désactivation par oxydation et sa réactivation par réduction (Aunstrup *et al.*, 1980).

2,3,7 Hydrolyse des protéines

La plus importante application des protéases microbiennes pour la production d'hydrolysats de protéines, est la fabrication de la sauce soya. Par ailleurs, l'emploi de préparations protéolytiques commerciales pour l'hydrolyse des protéines est relativement restreint. Ainsi, elles sont fréquemment utilisées pour changer les propriétés fonctionnelles des protéines et non pour leur effet hydrolytique qui résulte en l'obtention d'acides aminés libres. L'objectif de l'hydrolyse peut être d'abaisser la viscosité, comme dans le traitement des composés solubles du poisson, ou de rendre la protéine soluble à des pH isoélectriques. Par exemple, le traitement des protéines de soya ou de la caséine pour faire des produits protéiniques solubles utilisables pour la préparation de liqueurs douces ou de boissons nourrissantes. Le principal problème à éviter est la formation de peptides à goûts amers. Ces peptides contiennent habituellement des résidus d'acides aminés hydrophobes. La quantité formée dépend de la source de protéine et du degré d'hydrolyse atteint. Généralement, la formation de ces peptides amers peut être évitée si le degré d'hydrolyse est maintenu très bas comme dans le cas des protéines de soya où il doit être inférieur à 10 %. Un autre exemple de l'emploi de l'hydrolyse enzymatique se retrouve dans le traitement du gluten du maïs, une protéine avec une très faible rétention en eau. Par action des protéases, il est possible d'augmenter de façon significative l'absorption de l'eau par cette protéine afin de former une suspension homogène.

2,3,8 Autres applications

À travers les âges, les protéases d'origine microbienne ont été employées pour une variété d'applications d'importance économique mineure, comme la récupération des sels d'argent en photographie par hydrolyse de la gélatine, le dégomme des soies, l'amélioration de la récupération du caoutchouc par la digestion de protéines indésirables dans les peaux de latex et divers procédés de nettoyage spéciaux comme le nettoyage des membranes pour l'ultrafiltration ou les instruments médicaux vitaux comme les équipements de dialyse. Aussi,

les protéases sont utilisés pour dissoudre les tissus humains lors des autopsies afin d'améliorer les possibilités de détection d'intoxication ou d'empoisonnement chez les cadavres. Quelques autres applications mineures existent et en fait les protéases microbiennes représentent des outils intéressants lorsque l'enlèvement ou la dégradation des protéines sont requis.

2,4 Méthodes de production des protéases

Les méthodes de fermentation utilisées pour la production de protéases microbiennes sont similaires à celles employées pour fabriquer d'autres produits de fermentation. Les méthodes générales sont bien décrites dans la littérature existante sur le sujet et ne feront donc pas l'objet d'une description détaillée dans le présent ouvrage. Cependant, il est nécessaire d'en préciser certains détails relatifs aux protéases microbiennes.

Ainsi, les méthodes de production de protéases microbiennes ont été développées en vertu de trois objectifs principaux, soit de minimiser les coûts de production, de satisfaire les exigences du marché en regard aux propriétés catalytiques, à la pureté et la stabilité et enfin de respecter les normes des autorités gouvernementales. En général, la production de protéases microbiennes n'est pas très compliquée sauf quelques étapes plus sophistiquées.

2,4,1 Fermentation semi-solide

Les protéases issues d'*Aspergillus* et de *M. pusillus* sont produites sur des milieux semi-solides. Dans ces procédés, un mélange de son et d'amidon est humidifié avec une solution contenant des éléments nutritifs et de l'acide chlorhydrique destiné à assurer l'hydrolyse partielle de l'amidon, au cours de la stérilisation. La masse humide est disposée en couche mince sur des plateaux métalliques placés dans une étuve à température et humidité contrôlées. Après stérilisation par la vapeur vive, les plateaux sontensemencés avec des spores d'*Aspergillus tamarisii* ou *Aspergillus flavus-oryzae*. Lorsqu'un mycélium se forme à la surface des graines, ces derniers sont recouverts de saumure durant plusieurs mois afin de permettre à la digestion protéolytique de s'accomplir (Rose, 1961 ; Simon et Meunier, 1970). Les différences biochimiques entre les cultures sur milieu semi-solide ou liquide n'ont pas été étudiées en détails, mais plusieurs effets indiquent que ces variations sont profondes et

fondamentales. Ainsi, il y a une différence importante dans la concentration en eau mais aussi le fait que le mycélium, dans le milieu semi-solide, est exposé à l'air atmosphérique et peut croître sans être dérangé sous sa forme naturelle, une condition qui lui permet de produire des spores et des cellules normales en quantité supérieure à celles retrouvées en milieu liquide (Aunstrup *et al.*, 1980). D'ailleurs, de façon générale, en fermentation semi-solide, les quantités d'enzymes produites sont supérieures à celles issues de fermentations submergées. Par exemple, la production d'alpha-amylase de *A. oryzae* sur milieu semi-solide, s'accompagne d'une production substantielle de protéases et d'aminopeptidases alors que ces enzymes sont absentes lors de la production en fermentation liquide.

Les fermentations semi-solides présentent, cependant, un très grand désavantage, puisqu'il n'est pas possible d'ajouter des éléments nutritifs pendant le processus. Les changements de pH et les teneurs en hydrate de carbone sont donc prédéterminés lorsque le milieu est inoculé. Par ailleurs, il semble que la fermentation se poursuit de façon beaucoup plus stable quand le problème de contrôle de l'humidité du milieu est résolu.

De plus, la récupération des enzymes préparées par fermentation semi-solide s'effectue simplement. Ainsi, les enzymes sont extraites du magma fermenté par addition d'eau et/ou de tampon à un pH pré-déterminé, habituellement dans un système mixte afin d'obtenir une concentration élevée d'enzymes récupérées. La solution est alors filtrée et concentrée par ultrafiltration ou évaporation et ce concentré est utilisé comme préparation enzymatique après standardisation et ajout de préservatifs, ou l'enzyme est précipitée avec des solvants ou plus rarement avec des sels.

2,4,2 Fermentation liquide

Les protéases issues de *M. miehei*, *E. parasitica* et toutes celles du genre *Bacillus* sont produites en fermentation liquide. Plusieurs des composantes des milieux de fermentation sont des produits d'agriculture commun et peu coûteux qui peuvent être obtenus en quantité appréciable et de qualité uniforme. Ces milieux sont généralement assez concentrés puisqu'une teneur en matières sèches de 10 à 15 % est assez courante. Le contenu en protéines du milieu de culture est aussi généralement assez élevé. Habituellement, des concentrations élevées en

acides aminés libres sont à éviter, car leur présence inhibe la formation de protéases.

La consommation des hydrates de carbone durant la fermentation est élevée, et il est courant d'en ajouter en quantités croissantes afin de garder la concentration basse en tout temps. Il n'y a pas de données sur une possible inhibition de la production de protéases en présence de grandes quantités d'hydrates de carbone mais il a été observé que l'utilisation des hydrates de carbone est meilleure lorsque ce principe d'alimentation est respecté. Les hydrates de carbone peuvent être utilisés sous forme de glucose, sucrose ou hydrolysats d'amidon. Cependant, lorsque ce dernier est utilisé, son assimilation par *B. amyloliquefaciens* est incomplète puisque ce microorganisme ne produit pas l'enzyme nécessaire à l'hydrolyse complète de l'amidon. Il y a plusieurs années, les farines de poisson étaient fortement recommandées comme source de protéine pour ces fermentations. Néanmoins, leur utilisation a été graduellement abandonnée car les odeurs des protéines de poissons étaient transférées au produit enzymatique final, un défaut particulièrement encombrant dans les préparations lessiviées.

Dans les pratiques commerciales, la composition des milieux est optimisée de façon continue afin de maintenir l'équilibre entre les différents composés et, dès lors, de maximiser la production des microorganismes et de minimiser les quantités de produits inutilisés à la fin de la fermentation. Cet équilibre est hautement dépendant des interactions entre les diverses souches de microorganismes, les composants du milieu de culture, l'équipement de fermentation et les conditions d'opération de la fermentation.

Le temps de fermentation est aussi très important puisque le milieu de culture utilisé pour une longue fermentation avec une production élevée d'enzymes est différent de celui requis pour une courte fermentation. En fait, il faut toujours se rappeler que l'objectif principal de la microbiologie industrielle n'est pas d'obtenir la plus grande concentration possible d'enzymes par unité de masse cellulaire ou la concentration la plus élevée d'enzymes dans le bouillon final, mais de minimiser les coûts totaux de production tout en maintenant une grande qualité au niveau du produit désiré (Aunstrup *et al.*, 1980).

Enfin, les procédés en continu ou en semi-continu pour la production de protéases ne sont pas des pratiques commerciales courantes, même si certains auteurs ont démontré qu'il était possible de maintenir des productions élevées de protéases sur de longues périodes de temps (Jensen, 1972). En effet, il est plus intéressant d'utiliser les procédés en mode cuvée puisqu'économiquement ils permettent un meilleur épuisement des éléments nutritifs du milieu de culture par rapport à un procédé en continu ou en semi-continu. L'amélioration des souches de microorganismes représente aussi une partie importante des travaux effectués dans l'industrie mais peu de données sont disponibles sur le sujet. Ainsi, il est de notoriété publique que les souches mutantes asporogènes de *Bacillus* sont très prisées. Elles sont avantageuses puisqu'elles donnent de meilleures quantités de protéases comparativement aux souches sporulantes. De plus, elles éliminent les risques de sporulation soudaine qui cause l'arrêt de la production enzymatique. Par ailleurs, aucun problème de bactériophage n'a été rapporté dans la production de protéases.

La formation de sous-produits est souvent problématique dans la fermentation d'enzymes, et les protéases ne sont pas une exception, même si certaines sont excrétées de façon assez pures. Ainsi, dans le cas de *Subtilisin Carlsberg*, plus de 60 % des composés protéiniques des préparations commerciales de base se retrouvent sous la forme de protéases et sans la présence d'autres enzymes en quantité appréciable. Avec d'autres espèces de *Bacillus*, plusieurs enzymes sont produites en même temps et sont généralement laissées dans les préparations commerciales. Néanmoins, elles peuvent être supprimées par modification génétique des microorganismes utilisés. Un exemple réussi de cette sorte de modification est l'enlèvement des protéases sérines produites par la souche de *B. amyloliquefaciens* employée dans la production de protéases neutres. Cependant, dans d'autres cas, il a été impossible jusqu'à maintenant d'enlever les composés indésirés par la génétique, par exemple, dans le cas de la production de présure à partir des espèces de *Mucor*, où la sécrétion de protéases est immédiatement suivie de celle de lipases, qui doivent être enlevées afin que la préparation puisse être utilisée pour la fabrication de fromages. Dans ce cas, il semble que la lipase soit particulièrement importante pour le métabolisme des lipides du microorganisme dont les mutants ne peuvent survivre sans cette enzyme.

Idéalement le bouillon de fermentation à la fin du processus de production devrait être une solution claire de protéases avec un précipité formé des microorganismes producteurs. En pratique, le bouillon contiendra souvent 1 % de matières cellulaires sèches, 0,1 à 0,5 % d'enzymes, 1 à 2 % de résidus d'éléments nutritifs et de composés du milieu de fermentation. La quantité de protéines enzymatique basée sur l'addition de protéines peut atteindre 10 % (Aunstrup *et al.*, 1980).

2,5 Milieux de culture pour la production de protéases

Les matières premières comptent pour 60 à 80 % du prix de revient dans une production d'enzymes par fermentation (Arnaud *et al.*, 1993). Les matières premières, qui vont apporter aux microorganismes leurs éléments nutritifs (énergie, carbone, azote, phosphore, soufre, sels minéraux, vitamines, etc.) sont donc choisies en fonction des critères suivants :

- Compatibilité avec les réglementations en vigueur dans les pays modernes en ce qui concerne les normes des produits destinés à l'alimentation : absence d'antiseptiques, d'antibiotiques, de pesticides, de métaux lourds, etc ;
- Approvisionnement stable en quantité et en qualité tout au long de l'année ;
- Coûts aussi peu élevés que possible, y compris stockage et transport.

Pratiquement tous les produits régulièrement utilisés proviennent des industries agricoles et alimentaires (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

La source d'énergie se trouve dans les hydrates de carbone choisis parmi :

- Des produits nobles tels qu'amidons de maïs, de céréales, de pommes de terre, etc ;
- Des sous-produits riches en oligosaccharides. Le lactosérum comporte environ 80 % de lactose et 10 à 15 % d'azote organique. Les mélasses, de canne ou de betterave, dont les qualités varient en fonction de leur origine

et du procédé mis en œuvre pour les obtenir, contiennent de 35 à 65 % de saccharose et, selon leur nature, de l'acide glutamique et de la bétaine.

L'azote est apporté sous forme minérale, sels d'ammonium, ou organique par des protéines animales ou végétales : la caséine (13 % d'azote), les farines de poissons, les protéines de pomme de terre, de coton, d'arachide, de soja, de maïs obtenu à partir des eaux de trempage (3 à 4 % d'azote, 20 à 25 % d'acide lactique) (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Le Tableau 12 présente des compositions typiques de milieux de culture utilisés lors de la production d'enzymes protéolytiques.

Tableau 12 Milieux de culture utilisés à l'échelle industrielle pour la production de protéases (composition en g/L)

Protéases de <i>Bacillus</i> (Aunstrup <i>et al.</i>, 1980)	
Hydrolysât d'amidon	150
Lactose	4,3
Farine de coton	30
Levure de bière	7,2
Protéine de soja	3,65
K ₂ HPO ₄	4,3
MgSO ₄ .H ₂ O	1,25
Métaux traces	
Protéases fongiques (Lehmann <i>et al.</i>, 1977)	
Amidon de blé	30
Liqueur de trempage du maïs	5
Farine de soja	20
Caséine	12
Gélatine	5
“ Distiller's dried solubles 2 ”	5
Na ₂ HPO ₄	2,4
Nitrate de sodium	1
Chlorure d'ammonium	1
Sulfate ferreux	0,01
Protéases de <i>Mucor</i> (Aunstrup <i>et al.</i>, 1980)	
Amidon de patates	40
Farine de soja	30
“ Ground barley 2 ”	100
Carbonate de calcium	5

2,6 Extraction et purification des protéases

Les enzymes sont actuellement les catalyseurs les plus efficaces et les plus recherchés dans des domaines extrêmement variés : biocatalyse industrielle (synthèse d'acides aminés, de peptides, de nucléotides, d'antibiotiques, etc.), technologie alimentaire, applications pharmaceutiques et cliniques, bioconversion et potentialités énergétiques, etc. Ceci nécessite des besoins de plus en plus élevés en enzymes de degré de pureté variable selon leurs utilisations. Ces applications ont été longtemps limitées pour des raisons techniques et économiques ; mais grâce au remarquable développement des recherches fondamentales en enzymologie et à l'extrême diversité des méthodes de purifications et de contrôle apparues durant ces vingt dernières années, cette situation semble se débloquer (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

Cependant, dans la majorité des cas, la matière première de départ est extrêmement hétérogène et il est pratiquement impossible d'isoler une molécule suffisamment purifiée, en une seule étape. Il faut faire appel, souvent de manière empirique, à la combinaison d'un certain nombre d'opérations successives, adaptées au produit visé et en fonction de contraintes technico-économiques. Ainsi, il existe toute une panoplie de techniques de séparation et de purification selon les propriétés globales des biomolécules et selon leurs propriétés surfaciques. La première catégorie donnera un mélange de molécules possédant des propriétés physico-chimiques très voisines. Puis, les procédés biospécifiques reposant sur la formation d'un complexe réversible entre la molécule à purifier et un composé appelé ligand, permettront d'isoler sélectivement et spécifiquement toute molécule possédant une affinité pour ce ligand (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

Dès lors, il est possible de représenter en trois étapes la ligne directrice d'un processus d'isolement d'une enzyme, selon le stade de pureté recherchée :

- 1^{ière} étape : L'extraction donnant un mélange de molécules, sous forme soluble, possédant un même comportement physico-chimique ;
- 2^{ième} étape : Fractionnement du mélange en jouant sur les différences de solubilité pour obtenir une famille moléculaire ;

3^{ème} étape : Purification par des méthodes physico-chimiques ou biospécifiques plus fines conduisant à une molécule pure.

Dans la pratique industrielle, le terme “enzymes purifiées” recouvre communément des préparations enrichies par un simple fractionnement de l’extrait de départ. Les enzymes peuvent être purifiées par des procédés mécaniques et non-mécaniques. Parmi les procédés mécaniques, on retrouve la sonification, la congélation-décongélation, le broyage ou agitation avec des abrasifs, la désintégration à haute pression et l’homogénéisation à haute pression. Pour les procédés non-mécaniques, il y a la dessiccation, la lyse chimique et physique et la lyse enzymatique. Enfin, il est possible d’extraire les enzymes à l’aide de solvants. Le Tableau 13 résume, d’ailleurs, quelques méthodes d’extraction des enzymes (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

Tableau 13 Différentes méthodes d’extraction des enzymes (Aviron-Violet *et al.*, 1982)

Méthodes	Traitement
Désintégration des tissus et des particules cellulaires	<ul style="list-style-type: none"> • Mécanique : découpage, hachage, homogénéisation • Oscillations à haute fréquence : sonification, turmix • Broyage avec microbilles de verre • Désintégration et homogénéisation à haute pression
Extraction avec des solutions aqueuses	<ul style="list-style-type: none"> • Température : choc par le froid • pH : choc alcalin ou acide • Concentration saline : choc osmotique • Effets spécifiques des substrats
Méthodes spéciales d’extraction	<ul style="list-style-type: none"> • Par le butanol • Par l’acétone • Par des solvants lipidiques • Congélation - décongélation
Utilisation de détergents	<ul style="list-style-type: none"> • Désoxycholate de sodium, tween 20, teepol XL, triton X 100, etc.
Extraction par des enzymes	<ul style="list-style-type: none"> • Autolyse (protéolyse, lipolyse) • Utilisation d’enzymes purifiées (trypsine, lipase, etc.)

La première étape d’une chaîne d’extraction et de purification simple, est d’abaisser la température du bouillon de culture final à 5°C. Ensuite, les matériaux solides contenus dans le bouillon sont enlevés par centrifugation et filtration. Des flocculants peuvent être ajoutés au

mélange afin d'améliorer la séparation solide-liquide. La précipitation avec des sels, comme le phosphate de calcium, dans le bouillon permettra d'enlever les colloïdes. Cependant, l'agglomérat ainsi produit est souvent gluant et difficile à disposer. Dès lors, les agents floculants utilisés dans le traitement des eaux usées, sont souvent utilisés dans la bio-industrie. Ainsi, divers poly-électrolytes et la terre de diatomée sont souvent utilisés pour clarifier les bouillons de fermentation.

Plusieurs méthodes peuvent être employées pour convertir le bouillon prétraité en produit enzymatique commercial. La concentration par évaporation ou par ultrafiltration est l'une de ces méthodes. De même, il est important, une fois le produit concentré, d'en préserver la qualité enzymatique par addition de préservatifs, très souvent du chlorure de sodium à une concentration de 10 à 20 %. Après l'addition des préservatifs, l'activité enzymatique est ajustée aux valeurs spécifiques désirées par des dilutions avec de l'eau contenant aussi des préservatifs. Dans certains cas, il est nécessaire d'ajouter des stabilisateurs d'enzymes à ces préparations. Généralement ces stabilisateurs sont sous la forme de sels comme les sels de calcium pour les métallo-protéases ou de protéines comme la caséine.

Les préparations de protéases sous forme liquide offrent un grand nombre d'avantages puisque les coûts de fabrication sont bas, la manipulation est facile et les risques associés à la formation de poussière sont évités. Dans quelques applications, il est cependant préférable d'utiliser des préparations enzymatiques sèches comme dans l'industrie des détergents ou de la boulangerie. Les préparations enzymatiques sèches peuvent être préparées par simple séchage à l'air. Cependant, les coûts associés à cette pratique sont très élevés et le concentré obtenu doit avoir le plus haut taux en substance sèche. D'autres techniques plus économiques impliquent l'ajout de différents sels qui vont précipiter les enzymes. Il sera ensuite aisé de récupérer le produit enzymatique par filtration ou centrifugation et de le faire sécher (Aunstrup *et al.*, 1980). De plus, afin d'éliminer les risques d'intolérance, les producteurs ont mis au point des produits qui ne libèrent pas de poussières protéolytiques. Diverses méthodes ont été proposées, basées essentiellement sur l'enrobage dans des cires. Par exemple, les préparations enzymatiques utilisées dans l'industrie des détergents produiront moins de 0,5 µg de poussière enzymatique par kilogramme (Aunstrup *et al.*, 1980).

2,7 Standardisation et contrôle de l'activité protéolytique

Les étapes finales dans les procédés de fabrication sont la standardisation de l'activité enzymatique et l'assurance que les propriétés des préparations rencontrent les spécifications désirées (Aunstrup *et al.*, 1980). Ces étapes sont importantes du point de vue économique, technique et sécuritaire, et le nombre de tests effectués, particulièrement ceux concernant la sécurité, sont en pleine croissance.

Les enzymes sont toujours vendues sur la base de leur activité et donc la méthodologie pour déterminer l'activité enzymatique est d'une importance économique essentielle. Malheureusement, l'activité protéolytique n'est pas facile à évaluer de façon précise puisque les substrats protéiniques connus ne sont pas bien définis. La plupart du temps, plusieurs liens peptidiques différents sont hydrolysés et il n'y a aucun moyen de déterminer directement quels liens et combien ont été hydrolysés. Pour quelques enzymes, des substrats simples bien définis peuvent être utilisés comme les esters du type benzoyl-arginine ethyl ester pour la détermination de l'activité de *Subtilisin Carlsberg* ou de simples peptides avec un groupe chromophore comme Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroaniline. Néanmoins, l'emploi de tels systèmes n'est pas recommandé puisque la contamination par d'autres enzymes, comme les peptidases et les esterase, peuvent influencer les résultats et, dès lors, donner une fausse activité.

En général, le principe appliqué pour déterminer l'activité enzymatique d'une préparation commerciale consiste à traiter un substrat relativement bien défini avec l'enzyme durant un certain temps, d'inactiver l'enzyme et d'évaluer les produits de la réaction avec une méthode appropriée. Afin d'obtenir des valeurs comparables pour une enzyme donnée, "La Commission sur les Enzymes de l'Union Internationale des Biochimistes" a défini l'unité internationale (U.I.) comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la conversion de 1 μ M de substrat par minute sous des conditions standardisées de concentration de substrat, de pH optimum, d'absence d'inhibiteur et de présence d'activateurs. De plus, pour éviter les écarts dans la définition des unités, il est habituel d'utiliser une préparation standard de l'enzyme en question comme référence. Le standard de référence est alors analysé en comparaison avec chaque cuvée d'enzymes produites. Cependant, cette définition ne s'applique pas dans le cas de

la plupart des enzymes commerciales puisque les méthodes utilisées ne rassemblent pas l'ensemble des conditions décrites ci-dessus. Dès lors, les producteurs d'enzymes et les utilisateurs s'entendent sur des méthodes qui rencontrent les besoins de l'utilisateur. Dans la plupart des cas, les tests enzymatiques sont choisis par le manufacturier plutôt que par l'utilisateur. La pureté enzymatique sera vérifiée par la mesure de l'activité spécifique de l'enzyme (activité biologique/poids en protéines). Celle-ci doit être constante pendant une période raisonnable et être aussi forte que possible. À cela, il faut donner des informations sur les activités des enzymes contaminantes exprimées en % de l'activité spécifique de l'enzyme "pure" (Aviron-Violet *et al.*, 1982).

Pour les protéases, les tests d'activité protéolytique sont effectués avec les substrats suivants ; poudre de cuir, azocoll, viande crue, poudre de lait, caséine, azocaséine, N'-diméthylcaséine, gélatine, acétyl-gélatine, hémoglobine, peptone et peptide. Les produits de l'hydrolyse protéolytique sont déterminés par la précipitation des protéines hydrolysées avec de l'acide trichloroacétique et en mesurant l'absorption ultraviolet à 275 nm comme dans la méthode de Anson (1939). Puisque les acides aminés aromatiques sont souvent responsables pour la plus grande partie de l'absorption à l'ultraviolet, les résultats sont habituellement reliés à la quantité de tyrosine dissoute.

2,8 Procédés brevetés de production de protéases alcalines

Plusieurs brevets ont été déposés afin de protéger des procédés de production de protéases alcalines. La présente section résume un ensemble de brevets importants dans ce domaine technologique.

2,8,1 Brevet américain no. 3 838 009

- Fukumoto J., Takarazuka, Yamamoto T., Amagasaki et Tsuru D. (1974)
Process for producing detergent resisting alkaline protease.

Le milieu de culture doit contenir une source de carbone, de l'azote et d'autres nutriments sous différentes formes afin que *Bacillus licheniformis* puisse croître. Les sources de carbone peuvent être des hydrates de carbone comme l'amidon, la dextrine, le sucre de canne, le

lactose, le maltose, le dextrose, le fructose, la mélasse, etc. Les sources d'azote peuvent être les sels d'ammonium, l'urée, le peptone, les extraits de viande, l'acide casaminé, la liqueur de trempage du maïs, la farine de soya, la caséine, le son de blé, etc. De plus, de l'extrait de levure, de la levure sèche, des vitamines, etc. peuvent être ajoutés au milieu de fermentation, de même que des sels inorganiques comme les sels de phosphate et de magnésium, les sels de calcium, les sels de potassium, les sels de sodium, les sels ferreux, les sels de manganèse, de zinc, etc. La température optimum de fermentation se situe entre 25 et 40°C alors que le pH optimum est de 5,5 à 8,5. Le temps de fermentation est de 20 à 72 heures.

Les protéases alcalines produites par cette méthode peuvent être précipitées et concentrées par addition de solvants organiques comme l'acétone et l'alcool dans une proportion de 50 à 65 % (v/v), ou par ajout de sels comme le sulfate d'ammonium, le chlorure de calcium ou le chlorure de sodium en proportion de 40 à 70 % (v/v). Les protéases peuvent être purifiées par les méthodes usuelles comme l'adsorption et la désorption, ou par des résines échangeuses d'ions, etc.

Les auteurs du brevet ont comparé quatre souches bactériennes qu'ils ont fait croître selon différentes conditions. Le Tableau 14 résume les résultats obtenus selon les conditions opératoires testées pour ces quatre souches bactériennes.

Tableau 14 Résumé des résultats obtenus par Fukumoto *et al.* (1974)

	Exemple 1	Exemple 2	Exemple 3	Exemple 4
Souche	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
numéro ATCC	21415	21416	21417	21418
milieu de culture	5% farine de soya 3% dextrine 1% (NH ₄)H ₂ PO ₄ 0,03% KCl 0,02% MgSO ₄	1 % glucose 5 % amidon 1 % extrait de soya 0,5 % (NH ₄)H ₂ PO ₄ 0,05 % MgSO ₄	1 % glucose 5 % amidon 1 % extrait de soya 0,5 % (NH ₄)H ₂ PO ₄ 0,05 % MgSO ₄	1 % glucose 5 % amidon 1 % extrait de soya 0,5 % (NH ₄)H ₂ PO ₄ 0,05 % MgSO ₄
Activité enzymatique (U.I./mL)	7,18 (50 h)	5,53 (40 h)	4,42 (40 h)	3,87 (40 h)

2,8,2 Brevet américain no. 3 748 233

- Viccaro J.P. (1973) Alkaline protease, method for its production, and detergent composition.

Cette invention relate la production de protéases alcalines à l'aide de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424. Le milieu de culture utilisé consiste en 1 à 4 % de protéines, de 1 à 12 % de glucose et quelques suppléments minéraux afin de permettre une croissance du microorganisme. La production maximale d'enzymes est atteinte à un pH de 7,6. La plupart de l'activité enzymatique se retrouve dans le surnageant après centrifugation. L'enzyme peut alors être récupérée par les méthodes conventionnelles. Néanmoins, dans une procédure préférentielle, un sel de calcium, comme l'acétate de calcium, est ajouté au milieu de culture avant la centrifugation. Le surnageant de la centrifugation contient alors 98 % de l'activité enzymatique totale retrouvée dans le bouillon de culture. Par la suite, l'enzyme peut être récupérée par ajout de 1/3 de volume d'acétone à 2°C au surnageant de centrifugation. Le précipité ainsi formé est alors enlevé par centrifugation. De l'acétone supplémentaire est ajouté au surnageant jusqu'à ce qu'une saturation de 75 % dans le fluide soit atteinte. La suspension est alors maintenue à une température de -20°C durant trois heures. Le précipité est récupéré et séché sous vide. La protéase alcaline peut alors être utilisée comme un ingrédient actif dans les compositions enzymatiques pour les détergents à des niveaux variants entre 0,02 et 0,10 % de la poudre lessivielle. L'activité est déterminée en unités glycine (U.G.) et une unité internationale (U.I.) équivaut à 1 551 unités glycines. Lorsque l'enzyme est diluée cinq fois avec du phosphate de sodium, son activité est d'environ 1 300 unités glycine/mg ($1\ 300 / 1\ 551 = 0,838$ U.I./mg). Le Tableau 15 résume les résultats obtenus selon les conditions opératoires.

Tableau 15 Résumé des résultats obtenus par Viccaro (1973)

	Exemple 1	Exemple 2
Souche	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
numéro ATCC	21424	21424
milieu de culture	6 % glucose	3 % de glucose
	2 % extrait de soja	1 % extrait de soja
	0,04% CaCl ₂	0,04% CaCl ₂
	0,02 % MgCl ₂	0,2 % de MgCl ₂
Activité enzymatique avant extraction et purification (U.I./mL)	13,35 (48 h)	11,15 (48 h)

2,8,3 Brevet américain no. 3 576 719

- Murao S. (1971) Alkaline proteinase.

Ce brevet décrit la production d'une protéase alcaline avec une souche de *Bacillus subtilis*. Cette protéinase est particulière puisqu'elle atteint son maximum d'activité à pH 11,0 et qu'elle retient pratiquement toute son activité même lorsque maintenue durant 10 minutes entre 60 et 65°C. Elle est stable durant 20 heures à 30°C à des pH entre 8,0 et 12,0 mais est inactivée à 50 % à pH 7,0 pour la même période et la même température. De plus, elle ne perd pas son activité lorsque conservée à 5°C durant 24 heures dans un tampon borate à pH 8,5.

La souche utilisée est *Bacillus subtilis* ATCC 21228 et elle est inoculée dans un milieu de fermentation contenant des sources complexes de carbone et d'azote, et de préférence des protéines animales ou végétales digérées. Le milieu de choix contient du polypeptone, des farines de poisson, du CaCl₂, et de la farine de soja. De plus, l'incorporation d'amidon hydrolysé (dextrine) accroît les quantités d'enzymes de 25 fois. Des conditions aérobies sont nécessaires de même que des températures entre 30 et 33°C durant 48 à 96 heures. La récupération des enzymes s'effectue en ajustant le pH entre 9,0 et 10,0 avec 10 % d'hydroxyde d'ammonium, et en ajoutant du sulfate d'ammonium jusqu'à une saturation de 50 %. Le mélange est maintenu à 5°C durant 16 heures. Le précipité est alors enlevé par filtration ou centrifugation. L'ajout de 1/10 de volume de tampon borate *b* (tampon borate *b* = 1 partie M/5

d'acide borique, 1 partie M/20 de chlorure de sodium, 1 partie M/20 de borate de sodium, diluée en 1 partie de tampon par 9 parties d'eau distillée) par volume de bouillon de culture à pH entre 8,5 et 9,5 avec 10 % d'hydroxyde d'ammonium permet d'enlever les solides restants dans le surnageant par une centrifugation à 14 000 x g. Le nouveau surnageant est maintenu durant 1 à 2 heures à température ambiante puis refroidit à 5°C durant 16 heures. Les cristaux d'enzymes sont alors récupérés et lavés avec le tampon borate *b*. Les cristaux peuvent être séchés sous vide. Le Tableau 16 résume les principaux résultats obtenus par Murao (1971).

Tableau 16 Résumé des résultats obtenus par Murao (1971)

	Exemple 1	Exemple 2
Souche	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
numéro ATCC	21228	21228
milieu de culture	1% extrait de poisson 1% peptone 0,3% NaCl	1% extrait de soya 1% peptone 0,3% NaCl
Activité enzymatique avant extraction et purification (U.I./mL)	4,00 (18-22 h)	27,50 (96 h)

2,8,4 Brevet américain no. 4 052 262

- Horikoshi K. et Ikeda Y. (1977) Preparation of an alkaline protease

Les protéases alcalines de cette invention sont produites par les souches *Bacillus subtilis* ATCC 21522, *Bacillus subtilis* ATCC 21536 et *Bacillus subtilis* ATCC 21537. Ils existent deux milieux de culture principaux. Le premier contient comme source de carbone du glucose, de l'amidon, de la dextrine, du maltose ou du fructose et comme source d'azote, de l'extrait de levures, du peptone ou de l'extrait de maïs. Des sels inorganiques comme le carbonate de potassium, le carbonate de sodium ou le bicarbonate de sodium sont également ajoutés. Le second milieu de cultures est caractérisé par l'élimination du glucose et de l'amidon et l'utilisation de sels inorganiques à base de carbonate. Dans les deux cas le pH de départ est ajusté à 7,0.

Le milieu de culture sélectionné est alors inoculé avec la souche choisie et incubé dans un agitateur rotatif à une température entre 25 et 45°C. La production de protéases atteint généralement un maximum après 30 à 50 heures de culture. Dès lors, les méthodes usuelles de récupération des protéases peuvent être utilisées. Le Tableau 17 résume les principaux résultats obtenus par Horikoshi et Ikeda (1977).

Tableau 17 Résumé des résultats obtenus par Horikoshi et Ikeda (1977)

	Exemple 1	Exemple 2	Exemple 3	Exemple 4	Exemple 5	Exemple 6	Exemple 7
Souche	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
numéro ATCC	21522	21522	21522	21522	21537	21537	21536
milieu de culture	1% glucose 0,1% K ₂ HPO ₄ 0,5% extrait de levures, 0,5% peptone 0,025% MgSO ₄ 1% NaHCO ₃	2% son de blé 0,04% extrait de levures 0,2% extrait de maïs 1% NaHCO ₃	0,1% K ₂ HPO ₄ 0,5% extrait levures 0,5% peptone 0,025% MgSO ₄	0,1% K ₂ HPO ₄ 0,5% extrait de levures 0,5% peptone 0,025% MgSO ₄ 1 % de NaHCO ₃	2% amidon 0,1% K ₂ HPO ₄ 0,5% extrait de levures 0,5% peptone 0,02% MgSO ₄ 1 % de NaHCO ₃	2% amidon 0,1% K ₂ HPO ₄ 0,5% extrait de levures 0,5% peptone 0,02% MgSO ₄ 1 % de NaHCO ₃	2% amidon 0,1% K ₂ HPO ₄ 0,5% extrait de levures 0,5% peptone 0,02% MgSO ₄ 1 % de NaHCO ₃
Activité enzymatique (U.I./mL)	1,49 (48 h)	1,60 (48 h)	1,08 (48 h)	1,38 (48 h)	2,49 (72 h)	1,71 (72 h)	4,14 (72 h)

2,9 Hypothèse de recherche

Le marché industriel de la vente d'enzymes, particulièrement des protéases alcalines, est en pleine croissance à travers le monde. Les manufacturiers de ces enzymes protéolytiques doivent réduire leurs coûts de production afin de pouvoir mieux combattre les concurrents commerciaux. Compte-tenu qu'une proportion importante de ces coûts de production est attribuable aux éléments nutritifs constituant les milieux de culture utilisés dans les étapes de fermentation, le développement de méthode de production de protéases à partir de déchets urbains ou industriels semble donc fort prometteur. À cette fin, les boues d'épuration représentent un milieu riche en protéines et en divers éléments nutritifs, pouvant satisfaire la croissance de divers microorganismes producteurs de protéases. Ainsi, il appert que la production de protéases alcalines utilisées dans la fabrication de détergents pourrait se faire par substitution des milieux synthétiques coûteux, par des boues d'épuration municipales riches en éléments nutritifs et disponibles en quantité désirée et sans frais.

2,10 Objectifs spécifiques de recherche

Le présent projet de recherche a pour objet principal de tester et d'évaluer la bioproduction de protéases alcalines à partir de boues d'épuration municipales. De fait, les objectifs spécifiques de recherche peuvent être exprimés de la manière suivante :

- Déterminer les rendements de production de protéases dans des boues d'épuration et ce, en utilisant divers microorganismes employés dans l'industrie pour la production d'enzymes protéolytiques.
- Établir les besoins en éléments nutritifs exogènes aux boues pour la production de protéases dans ce milieu de culture.
- Évaluer l'intérêt technico-économique de produire des protéases à partir des boues d'épuration en comparaison aux pratiques actuelles.

3 PROCESSUS MÉTHODOLOGIQUE

Ce chapitre du présent mémoire regroupe l'ensemble des informations relatives aux protocoles expérimentaux et aux matériels et méthodes employés pour tester, à l'échelle du laboratoire, le procédé de production de protéases alcalines à partir de boues d'épuration municipales.

3,1 Microorganismes producteurs de protéases

Les microorganismes retenus pour cette étude sont *Bacillus licheniformis* ATCC 21424, *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 et *Bacillus licheniformis* ATCC 21416 acquis auprès de l'American Type Culture Collection (1230, Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852-1776, États-Unis). Ces microorganismes ont été sélectionnés sur la base de leur capacité à produire d'importantes quantités de protéases alcalines (Fukumoto *et al.*, 1974 ; Viccaro, 1973). La pureté des cultures utilisées comme inoculum est vérifiée avant chaque série d'essais par observation microscopique et par culture sur le milieu gélosé Standard plate count agar.

3,2 Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour l'entretien, la conservation et la production de protéases à partir des diverses souches bactériennes à l'étude sont présentés dans cette section, de même qu'une brève description des constituants des boues d'épuration utilisées dans le cadre de ce projet.

3,2,1 Milieu pour l'entretien et la conservation des souches microbiennes

L'entretien et la conservation des diverses souches microbiennes sont effectués en faisant croître les microorganismes durant 48 heures à 37 °C dans des erlenmeyers de 500 mL stérilisés à l'autoclave et contenant 100 mL de milieu trypticase soya (Difco). Le milieu trypticase soya est composé de 17 g de bacto tryptone, 5 g de NaCl, 2,5 g de dipotassium phosphate, 3 g de bacto soytone et de 2,5 g de bacto dextrose par litre d'eau, le tout étant stérilisé à l'autoclave à 120°C durant 20 minutes à une pression de 15 psi.

3,2,2 Milieu synthétique pour la production de protéases

Le milieu synthétique de culture employé pour la production de protéases par *B. licheniformis* ATCC 21424, *B. licheniformis* ATCC 21415 et *B. licheniformis* ATCC 21416, est composé des produits suivants (en pourcentage p/v) : 5 % d'extrait de farine de soya (Sigma-Aldrich Canada inc.), 3 % de dextrine ou glucose (source de carbone) (Sigma-Aldrich Canada inc.), 1 % de phosphate d'ammonium (source d'azote), 0,03 % de KCl et 0,02 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Le pH de ce mélange est ajusté à 7,6 avec H_2SO_4 1N ou NaOH 1N. Cependant, le pH de la préparation variant durant le déroulement des essais, il a été nécessaire d'ajouter un tampon pour maintenir les conditions alcalines du milieu de production. Ainsi, un tampon phosphate (PBS 0,01M, pH 7,6) contenant 1,236 g/L de Na_2HPO_4 anhydre et 0,18 g/L de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ a tout d'abord été testé, puis une solution dix fois plus concentrée de ce même tampon (PBS 0,1M, pH 8,2) a également été évalué. Enfin, un tampon borate constitué de 0,2 M d'acide borique et 0,05 M de sodium borate a aussi été utilisé. Le milieu synthétique de culture est ensuite stérilisé à l'autoclave à 120°C durant 20 minutes à une pression de 15 psi. Les Tableaux 18 et 19 donnent les caractéristiques physico-chimiques du milieu synthétique initial avec tampon PBS 0,1M.

Tableau 18 Caractéristiques physico-chimiques du milieu synthétique avec tampon PBS 0,1M

Paramètre	Milieu synthétique
Solides Totaux (g/L)	63,8
Solides Volatils (g/L)	47,9
Matières en suspension (g/L)	51,0
Matières volatiles en suspension (g/L)	38,8
Azote (% p/p)	4,8
Carbone (% p/p)	33,8
Soufre (% p/p)	0,0
Carbonique organique total (mg/L)	13 182
Azote ammoniacal (mg/L)	778
Ortho-phosphate (mg/L)	3 252

Tableau 19 Teneurs en métaux et autres éléments dans le milieu synthétique avec tampon PBS 0,1M

Paramètre	Milieu synthétique	
	Soluble (mg/L)	Total (mg/kg)
Cd	0,04	0,31
Cr	0,19	3,07
Cu	0,11	3,26
Mn	0,10	6,65
Ni	0,35	2,95
Pb	0,36	4,20
Zn	2,66	12,41

3,2,3 Milieux à base de boues d'épuration pour la production de protéases

Les milieux de culture alternatifs à l'étude pour la production de protéases alcalines sont constitués de boues d'épuration secondaires prélevées à l'usine d'épuration de la base militaire de Valcartier ou encore, de boues mixtes (primaires 60 % et secondaires 40 %) provenant de la station d'épuration de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ). Certains essais sont réalisés à partir des filtrats des boues obtenus après filtration sur membrane Whatman 934-AH. D'autres essais sont effectués avec des boues diluées à 25 et 50 % (v/v) dans le milieu synthétique décrit précédemment. Des ajouts de source de carbone (dextrine ou glucose) et d'azote (phosphate d'ammonium) sont effectués pour certains essais. De plus, les tampons décrits plus-haut sont utilisés pour quelques essais en ajoutant tout simplement les ingrédients secs aux boues d'épuration. Le pH des boues est ajusté à 7,6 avec NaOH 1N, puis celles-ci sont stérilisées par autoclavage. Les Tableaux 20 et 21 présentent un résumé des caractéristiques des boues d'épuration utilisées pour l'ensemble des essais expérimentaux.

Tableau 20 Caractéristiques physico-chimiques des boues d'épuration de Valcartier et de la CUQ

Paramètre	Valcartier	CUQ
Solides Totaux (g/L)	6,3	23,0
Solides Volatils (g/L)	4,6	10,7
Matières en suspension (g/L)	3,5	18,0
Matières volatiles en suspension (g/L)	2,4	6,8
Azote (% p/p)	6,8	3,1
Carbone (% p/p)	41,5	32,7
Soufre (% p/p)	0,0	0,0
Carbonique organique total (mg/L)	316	584
Azote ammoniacal (mg/L)	236	135
Ortho-phosphate (mg/L)	40,3	9,24

Tableau 21 Teneurs en métaux et autres éléments dans les boues d'épuration de Valcartier et de la CUQ

Paramètre	Valcartier		CUQ	
	Soluble (mg/L)	Total (mg/kg)	Soluble (mg/L)	Total (mg/kg)
Cd	0,02	1,90	0,01	0,52
Cr	0,06	29,2	0,06	8,87
Cu	0,14	419	0,01	30,4
Mn	0,06	217	0,62	24,5
Ni	0,08	12,7	0,11	3,48
Pb	0,20	49,5	0,22	16,4
Zn	0,26	201	0,54	65,2

3,3 Essais de production de protéases

Les essais de production de protéases sont effectués dans des fioles agitées de 500 mL de capacité munies de chicanes internes pour améliorer l'agitation du milieu. Des volumes d'inoculum de 0,2, 1,0 ou 5,0 mL issus de pré-cultures des microorganismes à l'étude sont ajoutés au milieu synthétique ou au milieu à base de boues pour un volume total de 100 mL. Les fioles sont incubées à 37°C et agitées à 175 rpm sur un agitateur rotatif. Des échantillons sont prélevés périodiquement pour les mesures de pH, les dénombrements bactériens et pour les mesures d'activité protéolytique. Une douzaine de séries d'essais ont été effectués pour un total de 132 essais de fermentation en fioles agitées. Le Tableau 22 présente les conditions opératoires utilisées pour les 12 groupes d'essais.

Tous les groupes d'essais sont menés en comparant les rendements de production de protéases des trois souches de *Bacillus licheniformis* (ATCC 21415, ATCC 21416 et ATCC 21424) avec des fioles contrôles non-inoculées, à l'exception des deux derniers groupes d'essais (K et L), lesquels sont effectués uniquement avec *Bacillus licheniformis* ATCC 21424. D'autre part, la fréquence d'échantillonnage est fixée à 24 heures pour l'ensemble des essais, sauf pour les groupes d'essais I et J, pour lesquels des échantillons sont prélevés aux 12 et 6 heures respectivement.

Tableau 22 Conditions opératoires des groupes d'essais de production de protéases

Groupe	Essais	Durée (jours)	Tampon	Milieux	Inoculum (% v/v)
A	1-7	3	aucun	Synt. + dextrine	5
B	8-14	4	aucun	Synt. + dextrine	5
C	15-21	4	aucun	Synt. + dextrine	5
D	22-28	3	aucun	Synt. + dextrine	5
E	29-40	4	aucun	Synt. + dextrine Valc (25%) Valc (50%)	5
F	41-52	4	PBS 0,01M	Synt. + dextrine Valc (100%) + dextrine	5
G	53-64	4	PBS 0,1M	Synt. + glucose Valc (100%) + glucose	5
H	65-76	4	PBS 0,1M	Synt. + dextrine Valc (100%) + dextrine	5
I	77-100	2	PBS 0,1M	Synt. + dextrine CUQ (100%) CUQ (100%) + dextrine CUQ (100%) + dextrine + soya Valc (100%) Valc (100%) + dextrine Valc (100%) + dextrine + soya	0,2
J	101-108	2	PBS 0,1M	Synt. + dextrine CUQ (100%) + dextrine	1
K	109-120	4	PBS 0,1M Borate	Synth + glucose CUQ (100%) CUQ (100%) + glucose Surn. CUQ (100%) + glucose Valc (100%) Valc (100%) + glucose Surn. Valc (100%) + glucose	1
L	121-132	4	PBS 0,1M	Synth + glucose Synth + dextrine CUQ (100%) + glucose CUQ (100%) + dextrine CUQ (100%) + glucose + azote Surn. CUQ (100%) + glucose Surn. CUQ (100%) + dextrine Valc (100%) + glucose Valc (100%) + dextrine Valc (100%) + glucose + azote Surn. Valc (100%) + glucose Surn. Valc (100%) + dextrine	1

3,4 Dénombrement des microorganismes producteurs de protéases

Les populations de microorganismes producteurs de protéases, en croissance dans les milieux synthétiques ou dans les boues sont dénombrées sur chambre Petroff-Hauser à l'aide d'un microscope photonique à lumière transmise Zeiss équipé d'un système de contraste interférentiel différentiel.

3,5 Mesure de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique des diverses préparations est déterminée en se basant sur l'effet de l'enzyme sur la caséine. Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par la protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés. La quantité de tyrosine libérée, qui peut être mesurée directement par colorimétrie (absorbance à 275 nm) ou par réaction avec le réactif de Folin-Ciocalteu (absorbance à 660 nm), devient alors une mesure de l'activité de l'enzyme (Kunitz, 1947 ; Lowry *et al.*, 1951 ; Layne, 1957 ; Spies, 1957 ; Hagiwara *et al.*, 1958 ; Yagi *et al.*, 1972 ; Hashimoto *et al.*, 1972 ; Fukumoto *et al.*, 1974).

3,5,1 Préparation de la caséine

La solution protéinique est préparée quotidiennement en ajoutant 1,2 % de caséine (Sigma-Aldrich Canada inc.) à un tampon borate à pH 8,2 (0,2 M acide borique, 0,05 M chlorure de sodium et 0,05 M borate de sodium).

3,5,2 Préparation des solutions enzymatiques

Les solutions enzymatiques sont préparées en diluant les cultures bactériennes ou l'enzyme pure dans le tampon borate à pH 8,2 afin de maintenir les conditions alcalines lors de la réalisation du test enzymatique. La solution enzymatique standard est préparée en utilisant la Subtilopeptidase A de Subtilisin Carlsberg commercialisée par la compagnie Sigma-Aldrich Canada inc. sous le code P 5380, soit une protéase de type VIII d'origine bactérienne. Selon Sigma-Aldrich Canada inc., l'enzyme utilisée possède une activité comprise entre 7 et 15 unités (voir définition ci-dessous) par milligramme de solide. Dans le cadre de cette étude, la solution enzymatique standard fournie par Sigma-Aldrich Canada inc. sous le lot # 126H0018 génère

une activité de 7,0 unités/mg de solide selon les évaluations effectuées par cette firme.

3,5,3 Réaction enzymatique

La réaction enzymatique s'effectue en ajoutant 1 mL de la solution enzymatique à tester à 5 mL de la solution de caséine. Le mélange caséine-protéase est maintenu à 30°C durant 10 minutes. Après cette période, la réaction est arrêtée par ajout de 5 mL d'une solution d'acide trichloroacétique (36 mL d'une solution 50 % (p/v) d'acide trichloroacétique, 220 mL d'une solution 1 M d'acétate de sodium, 330 mL d'une solution 1 M d'acide acétique dans un volume total de 1 000 mL). Le mélange est ensuite incubé à 30°C durant 30 minutes afin de s'assurer de la précipitation totale de la caséine non-hydrolysée.

Un blanc est préparé en ajoutant 5 mL de la solution de caséine à 5 mL de la solution d'acide trichloroacétique, ce mélange étant maintenu à 30°C durant 10 minutes. Dès lors, 1 mL de la solution enzymatique est ajoutée en incubant toujours à 30°C durant 30 minutes. Dans les deux cas, le précipité de caséine non-hydrolysée est enlevé par filtration sur du papier filtre Whatman 934-AH.

3,5,4 Mesure de l'activité enzymatique

Deux méthodes sont utilisées au cours des divers essais pour mesurer l'activité enzymatique. La première consiste en une mesure directe de l'absorbance lue à 275 nm. La densité optique ainsi déterminée peut être convertie en concentration de tyrosine libérée dans le filtrat. La méthode indirecte consiste en une réaction de coloration s'effectuant par ajout à 1 mL du filtrat de réaction, de 5 mL d'une solution de 0,44 M de carbonate de sodium et de 1 mL du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 1/5. La réaction est maintenue à 37°C durant 20 minutes. La densité optique de la solution est alors mesurée à 660 nm.

Pour fins de simplification, une seule définition d'activité enzymatique (U.I.) est retenue pour décrire les résultats obtenus, soit celle de "La Commission sur les Enzymes de l'Union Internationale des Biochimistes". La définition est la suivante : *Une unité d'enzyme hydrolyse la caséine pour produire la coloration équivalente à 1,0 μ mole (ou 181 μ g) de tyrosine par minute à pH 8,2 et à 37°C.*

La tyrosine employée avec les deux méthodes provient de la compagnie Sigma, sous le numéro de référence T 3754 et comme étant de la L-tyrosine pure à 98 %. Les courbes d'étalonnages de tyrosine sont préparées à partir de solutions de tyrosine comprises entre 0 et 181,0 mg de tyrosine (1,0 mM). Lors de l'emploi de la méthode directe (lecture à 275 nm), la tyrosine est diluée dans 50 % de tampon borate et 50 % de la solution d'acide trichloroacétique. Pour la méthode indirecte (lecture à 660 nm), la solution de tyrosine est traitée, comme les filtrats de réaction enzymatique, avec la solution de carbonate de sodium et le réactif de Folin-Ciocalteu.

Les lectures d'activités enzymatiques sont toujours effectuées en duplicata pour chacun des échantillonnages. Enfin, les absorbances (275 et 660 nm) sont mesurés sur un spectrophotomètre UV visible DMS 200 de la compagnie Varian.

3,6 Mesures analytiques

Les lectures de pH sont effectuées à l'aide du pH-mètre Fischer Accumet 805 MP. L'électrode Canlab à référence interne Ag/AgCl, double jonction de verre est utilisée pour les lectures. Les solides totaux (ST) et volatils (SV), de même que les matières en suspension totales (MES) et volatiles (MESV) sont déterminés selon les méthodes standardisées (APHA *et al.*, 1989).

Les métaux et éléments nutritifs en solution (Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn) sont mesurés par absorption atomique à la flamme (atomic absorption flamme, Spectra-20). Les métaux et les éléments nutritifs totaux dans les boues sont déterminés après digestion par HNO₃, HF et H₂O₂ 30 % selon le protocole utilisé par le Ministère de l'Environnement du Québec (MENVIQ. 89,12/213 - Mét. 1,3). Une matrice de 5 % (v/v) d'acide nitrique est utilisée pour l'ensemble des échantillons et contrôles analysés durant ces travaux. Lors des digestions, un blanc et l'échantillon de référence NM-1 sont employés comme contrôle de qualité pour la digestion des boues et pour les mesures au plasma.

L'azote, le carbone et le soufre total dans les boues sont mesurés sur un analyseur NCS (NA 1500 Carlo Erba instruments). Le carbone organique dissous, les ortho-phosphates et l'ion ammonium sont mesurés sur un auto analyseur Technicon.

4 TESTS ET VALIDATION DE LA MÉTHODE DE MESURE DES PROTÉASES

Ce chapitre contient les résultats des tests effectués sur la méthode de mesures de protéases de même qu'une évaluation du niveau de précision obtenue par cette technique. Ces travaux sont essentiels afin de s'assurer de la qualité des résultats concernant la production de protéases alcalines selon le milieu de culture fourni.

4,1 Courbes d'étalonnages de tyrosine

La production de courbes d'étalonnages de tyrosine permet d'établir une relation directe entre la concentration en tyrosine d'une solution et l'absorbance mesurée. Durant ce projet de recherche, 61 courbes d'étalonnages ont été effectuées avec la méthode à 275 nm et le Tableau 21 montre le peu de variation entre les différents étalonnages. À partir de ces courbes d'absorbance, une relation linéaire ($r^2 > 0,997$ pour toutes les courbes d'étalonnages) est donc obtenue entre les concentrations de tyrosine et l'absorbance mesurée. Une équation linéaire de base permet d'établir à $775 \pm 25 \mu\text{M}$ de tyrosine pour chaque unité de D.O.

Tableau 23 Absorbance mesurée à 275 nm selon les concentrations en tyrosine

Tyrosine (μM)	Absorbance moyenne (D.O.)	Absorbance minimale (D.O.)	Absorbance maximale (D.O.)
0	0 ± 0	0	0
50	$0,064 \pm 0,013$	0,037	0,099
100	$0,125 \pm 0,011$	0,098	0,150
250	$0,320 \pm 0,012$	0,287	0,364
500	$0,630 \pm 0,014$	0,596	0,653
1000	$1,292 \pm 0,034$	1,142	1,341

4,2 Solution enzymatique standard

La validation de la méthode de mesures de l'activité protéolytique s'effectue en traitant une solution enzymatique standard de la même façon que l'ensemble des échantillons. La mesure de l'activité protéolytique de cette solution devrait alors être similaire à celle obtenue par la firme ayant standardisée cette préparation.

La Subtilopeptidase A de Subtilisin Carlsberg utilisée pour ces travaux et commercialisée par la compagnie Sigma génère une activité de 7,0 unités/mg de solide selon les évaluations effectuées par cette firme. Les résultats comparatifs obtenus avec la méthode à 275 nm permettent d'évaluer l'activité protéolytique de la solution standard à $7,33 \pm 0,88$ unités/mg avec une valeur minimale de 4,67 unités/mg et une valeur maximale de 9,92 unités/mg et ce, après l'analyse d'une soixantaine d'échantillons. Ces résultats semblent cohérents avec ceux obtenus par la compagnie Sigma car cette dernière n'a donné aucune information sur le nombre de réplicats effectués et l'écart-moyen obtenus. Or donc, la méthode à 275 nm s'avère adéquate pour évaluer l'activité protéolytique de façon précise.

4,3 Comparaison des méthodes de lecture de l'activité protéolytique

Une comparaison des mesures d'activité enzymatique selon deux méthodes colorimétriques est aussi effectuée, soit entre la méthode à 275 nm et celle de Folin-Ciocalteu à 660 nm. Cette comparaison s'avère nécessaire afin de choisir la méthode la plus sensible au matériel étudié. La Figure 1 montre la correspondance entre les mesures d'adsorbance des échantillons selon la méthode à 275 nm et celle à 660 nm. Ces résultats indiquent que la méthode à 660 nm donne des résultats inférieurs d'environ 30 % à ceux obtenus par la méthode à 275 nm. De plus, dans le cas de la Subtilopeptidase A de Subtilisin Carlsberg utilisée comme standard (activité de 7,0 unités/mg selon Sigma), la méthode à 275 nm donne une valeur moyenne (5 échantillons) de $7,05 \pm 0,43$ unités/mg, alors que celle à 660 nm montre une valeur de $5,25 \pm 0,40$ unités/mg. Il semble donc que la méthode à 275 nm soit plus susceptible de donner des résultats conformes à la réalité que celle à 660 nm. D'ailleurs, dans le cas de cette dernière, il faut se rappeler qu'elle comporte des étapes supplémentaires afin d'effectuer la coloration et que, par conséquent, elle devient moins précise que l'autre méthode nécessitant moins de manipulation.

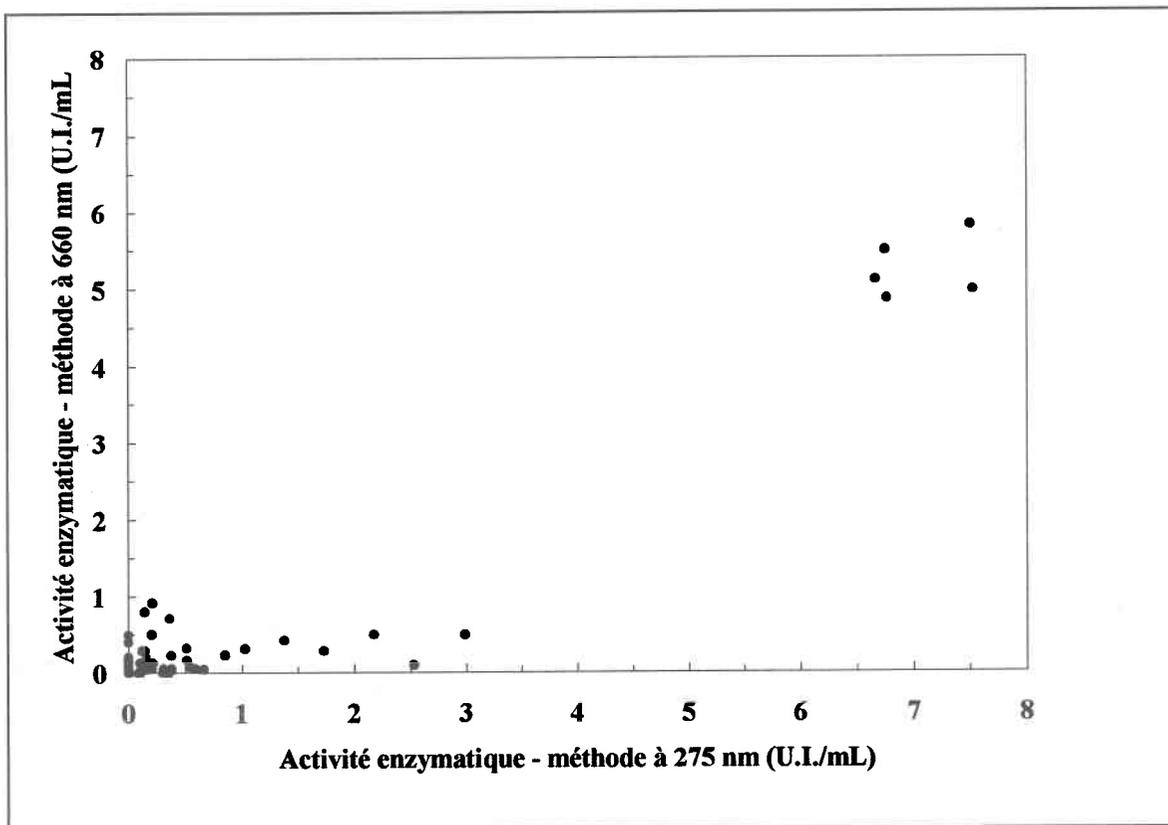


Figure 1 Corrélation entre les mesures d'activité enzymatique effectuées avec la méthode à 275 nm et celle à 660 nm

4,4 Tests de co-précipitation caséine-tyrosine

Un autre facteur pouvant influencer la précision des résultats obtenus est la possibilité de co-précipitation du complexe caséine-tyrosine lors de l'ajout de l'acide trichloroacétique. En effet, si la tyrosine libérée par la réaction enzymatique forme un complexe avec la caséine, cet acide aminé pourrait être précipité lors de l'ajout de l'acide trichloroacétique. Une telle précipitation aurait comme principale conséquence de sous-évaluer l'activité protéolytique mesurée. Deux tests sont donc effectués afin de vérifier le comportement de la tyrosine lors de l'ajout de l'acide trichloroacétique.

Le premier test consistait à comparer deux façons de préparer les blancs, soit en ajoutant à la caséine la solution d'acide trichloroacétique, d'attendre 10 minutes pour s'assurer de la précipitation complète des protéines, puis d'ajouter une quantité connue de tyrosine (0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 et 1 000 μ moles de TYR/L) et de laisser agir durant 30 minutes (CAS +

TCA + 10 min + TYR + 30 min). La seconde possibilité est d'ajouter à la caséine la solution de tyrosine et immédiatement additionner l'acide trichloroacétique puis de laisser agir durant 30 minutes (CAS + TYR + TCA + 30 min). La Figure 2 présente les résultats de ce test et montre que la tyrosine n'est pas précipitée lorsque la solution d'acide trichloroacétique est ajoutée en dernier lors de la préparation du blanc.

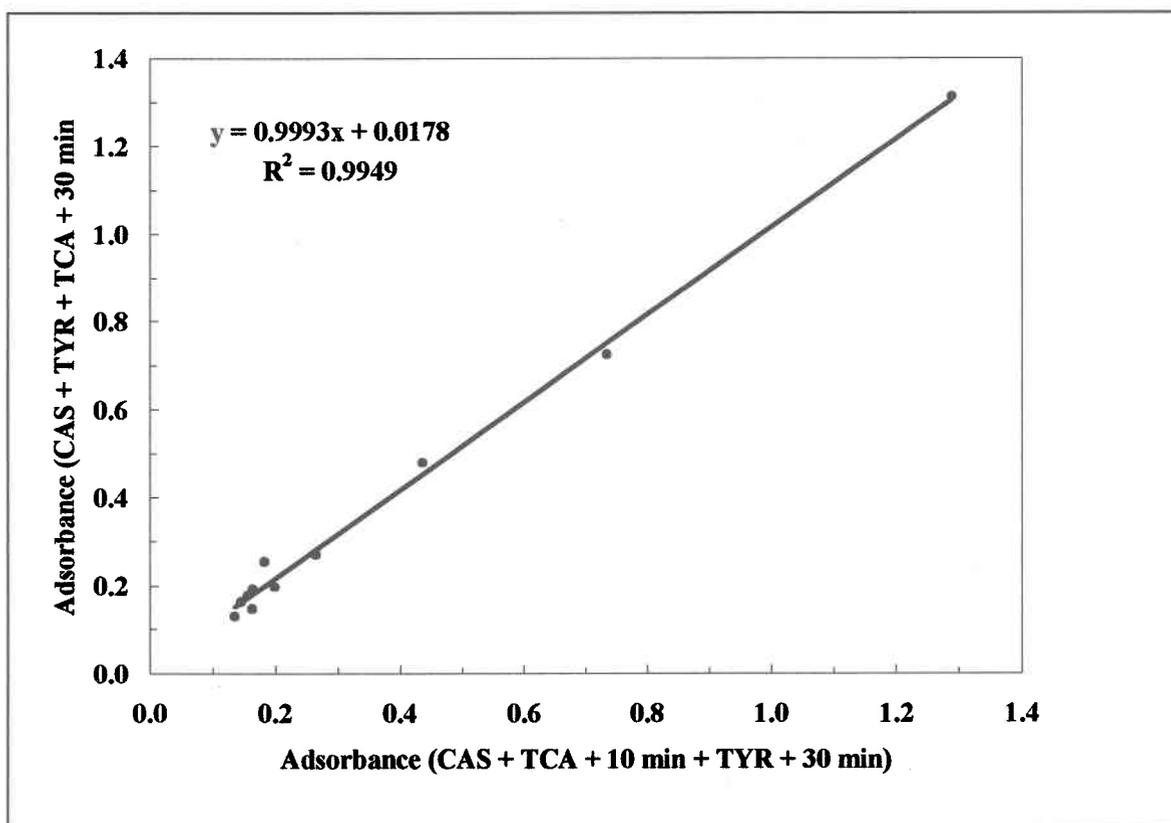


Figure 2 Comparaison des mesures d'absorbance entre les deux méthodes de préparation du blanc

Pour le second test, des blancs sont préparés (CAS + TCA + 10 min + TYR + 30 min) toujours avec des quantités connues de tyrosine (0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 et 1 000 μ moles de TYR/L). Les absorbances de ces blancs sont comparées à celles obtenues en ajoutant les mêmes concentrations de tyrosine à la caséine et laissant agir cette solution durant 10 minutes avant de procéder à la précipitation avec l'acide trichloroacétique (CAS + TYR + 10 min + TCA + 30 min), soit la procédure habituelle pour mesurer l'activité protéolytique

d'une solution inconnue. Les résultats de ce deuxième test (Figure 3) montrent eux-aussi que la tyrosine ne forme pas de complexe avec la caséine et n'est donc pas précipitée lors de l'ajout de l'agent neutralisant. La mesure de l'activité protéolytique par la méthode à 275 nm indique donc très bien les quantités de tyrosine réellement présentes dans les échantillons.

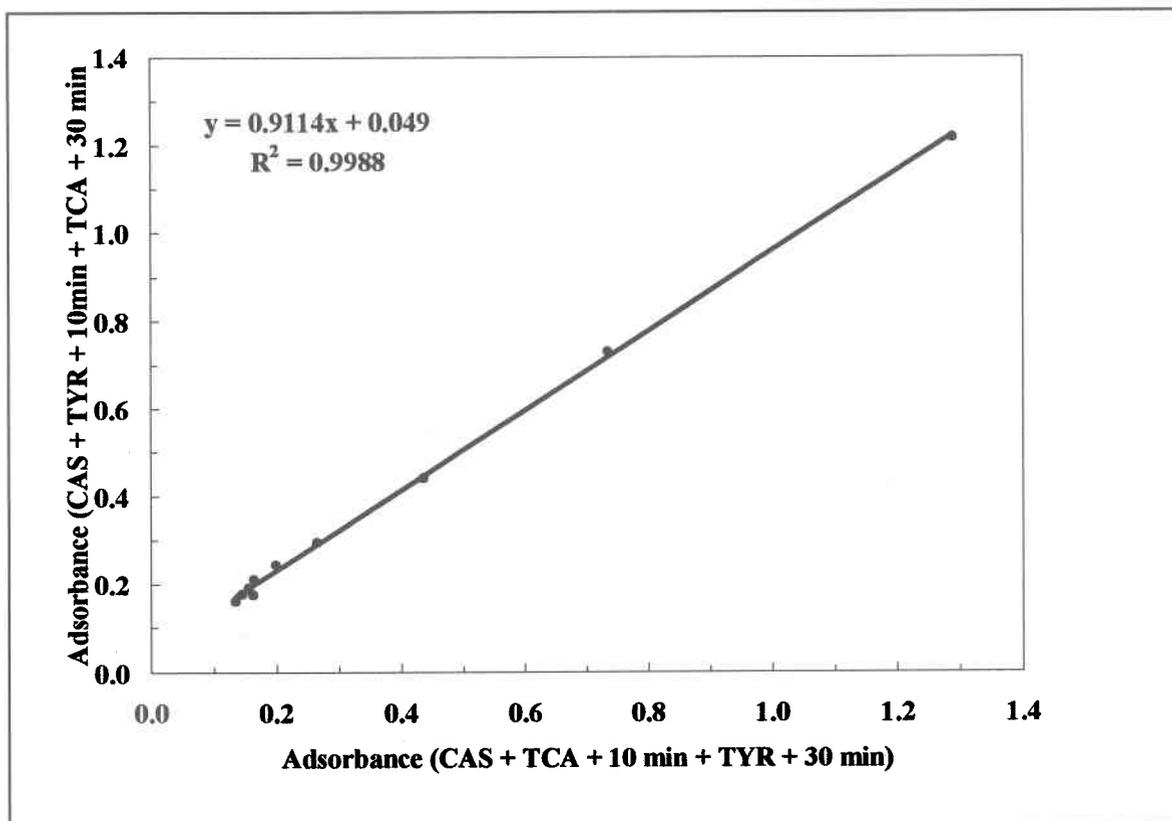


Figure 3 Vérification de la stabilité entre la préparation du blanc et la mesure de l'activité enzymatique

5 TESTS DE PRODUCTION DE PROTÉASES

Ce chapitre contient les résultats des tests de production de protéases selon diverses conditions expérimentales testées : type de milieu (synthétique ou boues d'épuration), effet de la source de carbone, effet de la source d'azote, effet du type de tampon.

5,1 Tests initiaux de production de protéases en milieu synthétique

Les premiers tests effectués consistent à comparer la production de protéases en milieu synthétique rapportée par les différents brevets étudiés et celle obtenue durant la présente recherche. Le Tableau 24 résume les principaux résultats de la littérature portant sur la production de protéases alcalines. Ces résultats montrent que la production de protéases se situe entre 1,08 et 13,35 U.I./mL sur une période variant entre 40 et 72 heures de fermentation. Il faut aussi remarquer que les substrats varient souvent d'un microorganisme à l'autre. De plus, pour une même souche, une variation dans la composition nutritionnelle du milieu de culture induit souvent une variation dans la synthèse des enzymes protéolytiques.

Le Tableau 25 présente la production enzymatique obtenue lors de fermentation en milieu synthétique pour les trois souches étudiées soit *Bacillus licheniformis* ATCC 21424, 21415 et 21416. Les résultats varient entre 0,47 et 4,45 U.I./mL sur une période de 48 à 96 heures pour la souche ATCC 21424 alors que les activités se situent entre 0,48 et 4,37 U.I./mL sur une période de 48 à 72 heures pour la souche ATCC 21415 et entre 0,69 et 9,71 U.I./mL pour une fermentation de 48 à 72 heures pour la souche ATCC 21416.

Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par Viccaro (1973) et Fukumoto *et al.* (1974) puisque la composition des milieux n'est pas la même pour les souches ATCC 21424 et ATCC 21416. Il faut cependant une plus longue période de fermentation dans les présents travaux pour obtenir une production enzymatique aussi élevée que dans le cas des deux principaux brevets à l'étude. Ce plus long délai peut être causé par une moins grande acclimatation des souches au milieu de culture utilisé et certainement à un pH de croissance non-contrôlé. En effet, les enzymes sont pour la plupart sensibles au pH du milieu. Ainsi, une enzyme qui fonctionne optimalement à pH 7,0 sera inactivée lorsque son environnement deviendra trop

alcalin ou trop acide (McKane et Kandel, 1996). Ce phénomène comporte deux importantes conséquences dont la nécessité d'un choix judicieux du pH du milieu et l'obligation de contrôler le pH entre autre par utilisation de tampons, puisque la plupart des réactions enzymatiques induisent un changement du pH (Atkinson et Mavituna, 1983).

Tableau 24 Synthèse des principaux résultats de la littérature portant sur la production de protéases alcalines

Références	Microorganismes	Substrats	Activité enzymatique (U.I./mL)
Viccaro (1973)	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21424	1 % extrait de soya 3 % glucose	13,35 (48 h)
Fukumoto et al. (1974)	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21415	5 % farine de soya 3 % dextrine	7,18 (50 h)
	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21416	5 % amidon soluble 1 % extrait de soya 1 % glucose	5,53 (40 h)
	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21417	5 % amidon soluble 1 % extrait de soya 1 % glucose	4,42 (40 h)
	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21418	5 % amidon soluble 1 % extrait de soya 1 % glucose	3,87 (40 h)
Hirokoshi et Ikeda (1977)	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21522	0,5 % peptone 0,5 % extrait de levures 1 % glucose	1,49 (48 h)
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21522	2 % son de blé 0,04 % extrait de levures 0,2 % extrait de maïs	1,60 (48 h)
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21522	0,5 % peptone 0,5 % extrait de levures	1,08 (48 h)
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21522	0,5 % peptone 0,5 % extrait de levures	1,38 (48 h)
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21537	0,5 % peptone 0,5 % extrait de levures 2 % amidon soluble	2,49 (72 h)
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21537	0,5 % peptone 0,5 % extrait de levures 2 % amidon soluble	1,71 (72 h)
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21536	0,5 % peptone 0,5 % extrait de levures 2 % amidon soluble	4,14 (72 h)

Tableau 25 **Activité enzymatique maximale de protéases lors des tests initiaux en milieu synthétique**

Souches	Tampon	Milieu	Groupe	Essais	Temps (heures)	Protéases (U.I./mL)
ATCC 21424	Aucun	Synt. + dextrine	A	2	72	4,22
				3	72	2,61
	Aucun	Synt. + dextrine	B	9	48	4,45
				10	72	2,92
	Aucun	Synt. + dextrine	C	16	96	2,95
				17	96	3,48
	Aucun	Synt. + dextrine	D	23	72	2,21
				24	72	0,47
ATCC 21415	Aucun	Synt. + dextrine	A	4	72	0,64
				5	72	0,50
	Aucun	Synt. + dextrine	B	11	48	0,48
				12	48	0,55
	Aucun	Synt. + dextrine	C	18	96	2,70
				19	96	2,60
	Aucun	Synt. + dextrine	D	25	72	4,37
				26	24	0,51
ATCC 21416	Aucun	Synt. + dextrine	A	6	72	1,80
				7	72	0,78
	Aucun	Synt. + dextrine	B	13	96	0,88
				14	48	0,69
	Aucun	Synt. + dextrine	C	20	96	2,60
				21	96	1,36
	Aucun	Synt. + dextrine	D	27	72	9,71
				28	72	5,18

D'autre part, la Figure 4 montre un exemple d'activité enzymatique sur une période de 96 heures. Cette activité ne s'effectue pas nécessairement de façon constante dans le temps. En fait, il est fréquent de rencontrer un maximum d'activité après une période donnée suivie d'une brusque chute de cette dernière après un certain temps. Ainsi, les travaux de Swisher (1969) ont montré que l'activité protéolytique d'une souche de *B. subtilis* était maximum après 48 heures (1,5 U.I./mL) et était absente après 72 heures. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette baisse de l'activité enzymatique après une période donnée dont une détérioration des conditions de production, une utilisation importante des enzymes menant à leur inactivation ou une inhibition de l'activité protéolytique causée par une accumulation de sous-produits. En fait,

plusieurs réactions métaboliques sont au moins en partie régularisées par activation ou inactivation de la synthèse des enzymes correspondantes. Par exemple, un organisme évitera de dépenser de l'énergie à produire une certaine enzyme si le substrat correspondant n'est pas disponible (McKane et Kandel, 1996).

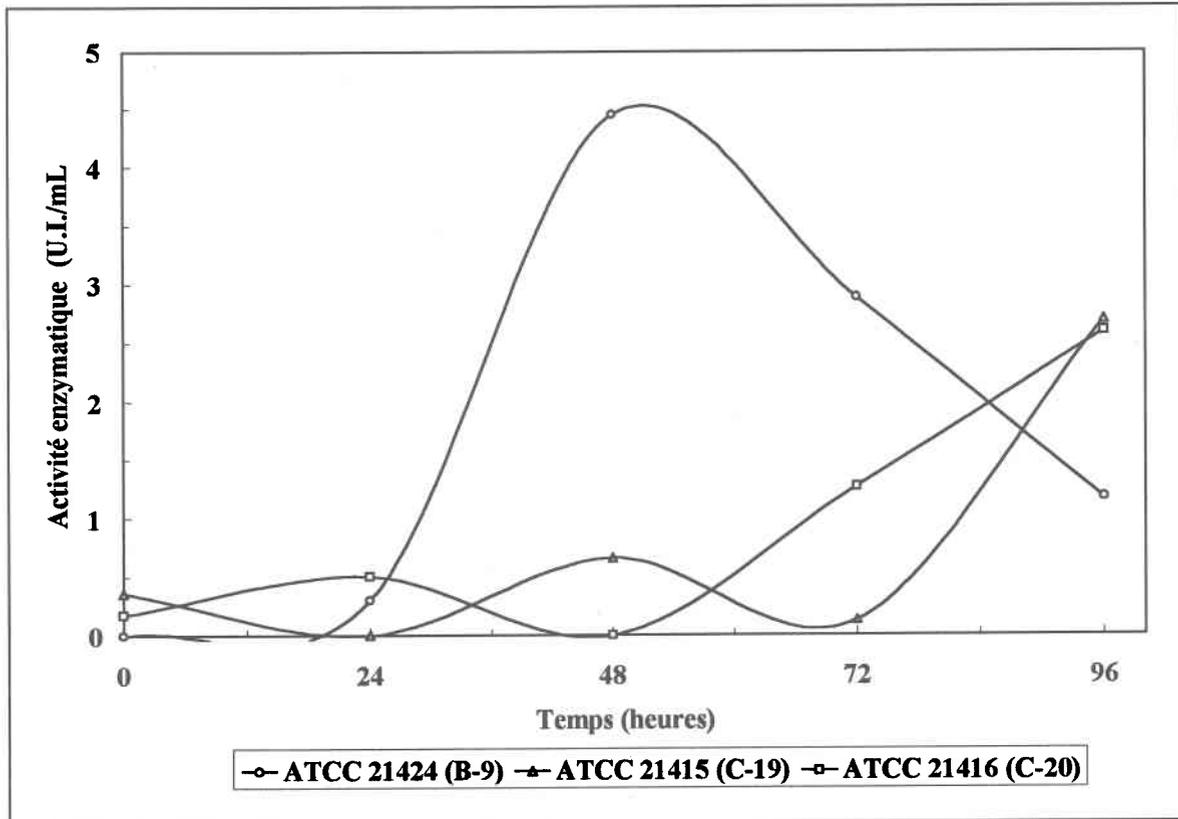


Figure 4 Exemple de production enzymatique par mesure de l'activité enzymatique en milieu synthétique sur une période de 96 heures

5,2 Première étude comparative de la production de protéases dans le milieu synthétique et les boues d'épuration

La première étude comparative de production de protéases dans le milieu synthétique et les boues d'épuration est effectuée à l'aide de quatre expériences distinctes. Dans le premier cas (groupe F), un tampon PBS 0,01M, pH 7,6, est ajouté sous forme solide au milieu synthétique et aux boues de Valcartier afin de maintenir le pH dans des conditions optimales de production. Au second essai (groupe G), la dextrine est remplacée par du glucose comme source de carbone et le tampon PBS 0,1M, pH 7,6, est utilisé. Le troisième essai (groupe H), comprend la dextrine et le tampon PBS 0,1M, pH 7,6. Enfin, pour le dernier essai (groupe J), les boues de Valcartier sont remplacées par les boues de la CUQ tandis que la dextrine et le tampon PBS 0,1M, pH 7,6, sont utilisés. La production maximale de protéases pour les trois premiers groupes d'expérience est donnée au Tableau 26 alors qu'elle se retrouve au Tableau 27 pour les essais avec les boues de la CUQ.

Lors des trois premiers essais (Tableau 26) avec la souche ATCC 21424, les meilleurs résultats sont obtenus lorsque le tampon PBS 0,1M est utilisé et que la source de carbone employée est le glucose. Ainsi, en milieu synthétique et dans ces conditions, la production maximale d'enzymes protéolytiques, soit 5,51 U.I./mL, est atteinte en 24 heures. Pour le milieu composé de boues de Valcartier, une activité enzymatique maximale comparable est déterminée (5,42 U.I./mL) en utilisant la même source de carbone et le même tampon. Dans ce cas, toutefois, une période de fermentation de 72 heures est requise. Il semble donc qu'une acclimatation de cette souche au milieu composé de boues secondaires soit nécessaire pour atteindre des rendements équivalents de protéases pour une même période de temps.

Pour la souche ATCC 21415, les meilleurs résultats sont également obtenus lorsque le glucose et le tampon PBS 0,1M sont incorporés au milieu de culture. En effet, pour de telles conditions, la production maximale de protéases en milieu synthétique survient après 72 heures pour un rendement de 3,24 U.I./mL. Par contre, ces valeurs sont beaucoup plus faibles quand le milieu composé de boues secondaires de Valcartier est utilisé. Ainsi, la production maximale de protéases est atteinte après 24 heures avec 1,66 U.I./mL. Il est donc possible que la

production d'enzymes protéolytiques soit stimulée durant les premiers 24 heures par la présence de composés organiques favorisant la croissance de cette souche de *B. licheniformis* ou la synthèse des protéases par cette dernière. Cependant, ces éléments semblent disparaître après 24 heures ou du moins ne plus contribuer à un accroissement de la production enzymatique. Il est également plausible que l'apparition de sous-produits entravent voir inhibent l'activité enzymatique.

Enfin, pour la dernière souche (ATCC 21416), l'utilisation du tampon PBS 0,1M et du glucose contribue également à une production optimale d'enzymes protéolytiques car en milieu synthétique il suffit de 24 heures pour obtenir 7,57 U.I./mL de protéases tandis qu'en milieu composés de boues secondaires de Valcartier la même période de temps induit la formation de 6,08 U.I./mL de protéases. Les boues secondaires de Valcartier semble donc stimuler la génération d'enzymes protéolytiques tout autant que le milieu synthétique lorsque le pH du milieu est semi-contrôlé par l'utilisation d'un tampon PBS 0,1M et qu'une source adéquate de carbone comme le glucose est ajouté.

La Figure 5 présente l'évolution temporelle de la production de protéases pour le milieu synthétique et le milieu à base de boues secondaires de Valcartier lorsque le glucose et le tampons PBS 0,1M sont utilisés, alors que la Figure 6 montre le comportement du pH durant cette même période et pour le même essai. Il faut aussi noter dans ce dernier cas que lorsque le pH du milieu descendait sous 7,0 après une période de 24 heures, ce dernier était rajusté par ajout de 1 mL de NaOH 1N stérile afin de redonner au milieu de culture des conditions alcalines et de favoriser la production de protéases. Cependant, il n'était pas possible de reconstrôler le pH avant la prise de l'échantillon suivant sans diminuer de façon importante la quantité de milieu dans l'erenmeyer. Cette procédure a d'ailleurs été reprise pour tous les essais subséquents. Dès lors, la Figure 6 indique que l'emploi du tampon PBS 0,1M est plus efficace pour maintenir les pH optimums que celui plus dilué quoiqu'il soit encore insuffisant pour maintenir le pH de façon optimale. En général, la forte production enzymatique s'accompagne d'une baisse marquée du pH alors qu'une diminution des protéases survient lors d'une autre augmentation du pH.

Tableau 26 Production maximale de protéases lors des premiers tests comparatifs en milieu synthétique et dans les boues secondaires de Valcartier

Souches	Tampon	Milieu	Groupe	Essais	Temps (heures)	Protéases (U.I./mL)
ATCC 21424	PBS 0,01M	Synt. + dextrine	F	41	48	0,54
				42	72	1,38
	PBS 0,01M	Valc. + dextrine	F	47	48	0,22
				48	96	0,37
	PBS 0,1M	Synt. + glucose	G	53	48	1,74
				54	24	5,51
	PBS 0,1M	Valc. + glucose	G	59	72	5,42
				60	72	4,33
	PBS 0,1M	Synt. + dextrine	H	65	24	0,10
				66	24	0,09
	PBS 0,1M	Valc. + dextrine	H	71	24	0,01
				72	96	0,00
ATCC 21415	PBS 0,01M	Synt. + dextrine	F	43	24	1,73
				44	72	0,86
	PBS 0,01M	Valc. + dextrine	F	49	72	0,52
				50	72	0,59
	PBS 0,1M	Synt. + glucose	G	55	24	1,58
				56	72	3,24
	PBS 0,1M	Valc. + glucose	G	61	48	0,80
				62	24	1,66
	PBS 0,1M	Synt. + dextrine	H	67	24	1,90
				68	24	1,90
	PBS 0,1M	Valc. + dextrine	H	73	24	0,25
				74	48	0,11
ATCC 21416	PBS 0,01M	Synt. + dextrine	F	45	72	3,00
				46	48	2,53
	PBS 0,01M	Valc. + dextrine	F	51	24	0,38
				52	24	0,31
	PBS 0,1M	Synt. + glucose	G	57	24	7,57
				58	24	6,35
	PBS 0,1M	Valc. + glucose	G	63	48	1,19
				64	24	6,08
	PBS 0,1M	Synt. + dextrine	H	69	72	0,13
				70	72	0,23
	PBS 0,1M	Valc. + dextrine	H	75	24	0,22
				76	24	3,08

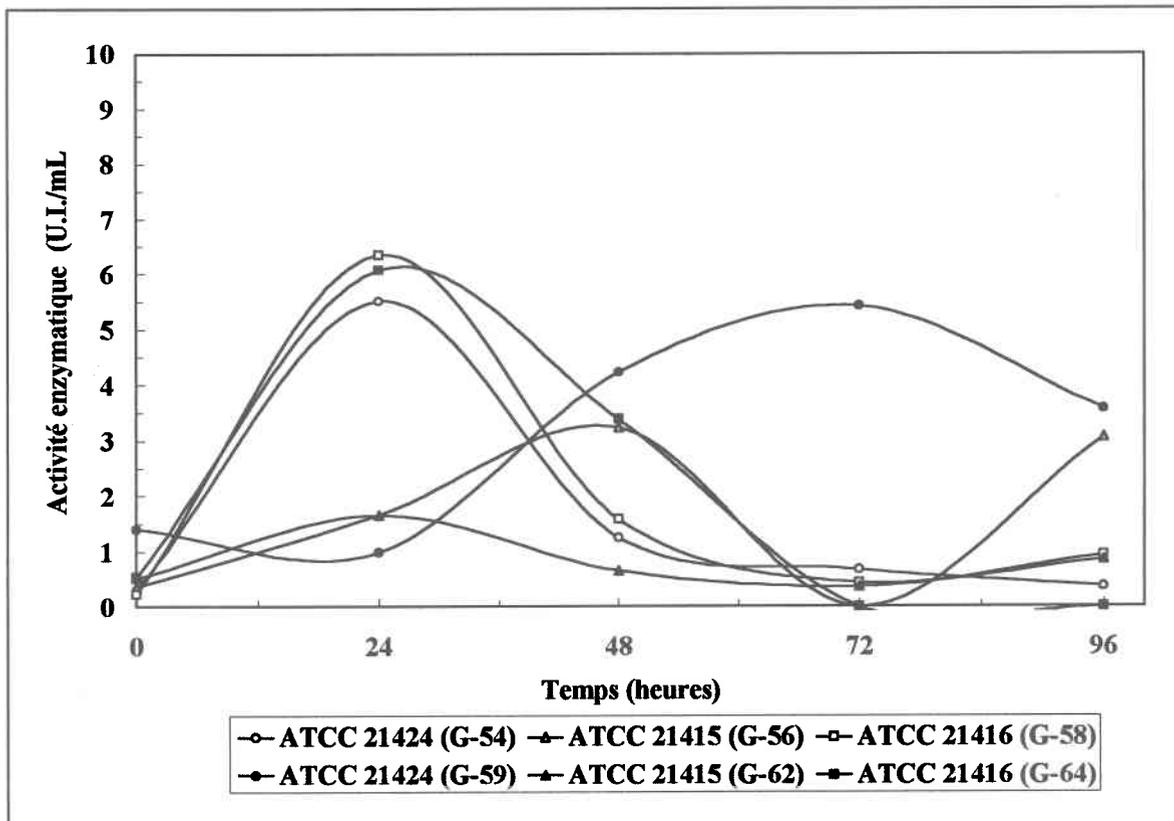


Figure 5 Production de protéases en milieu synthétique et en milieu de boues secondaires de Valcartier avec glucose et tampon PBS 0,1M

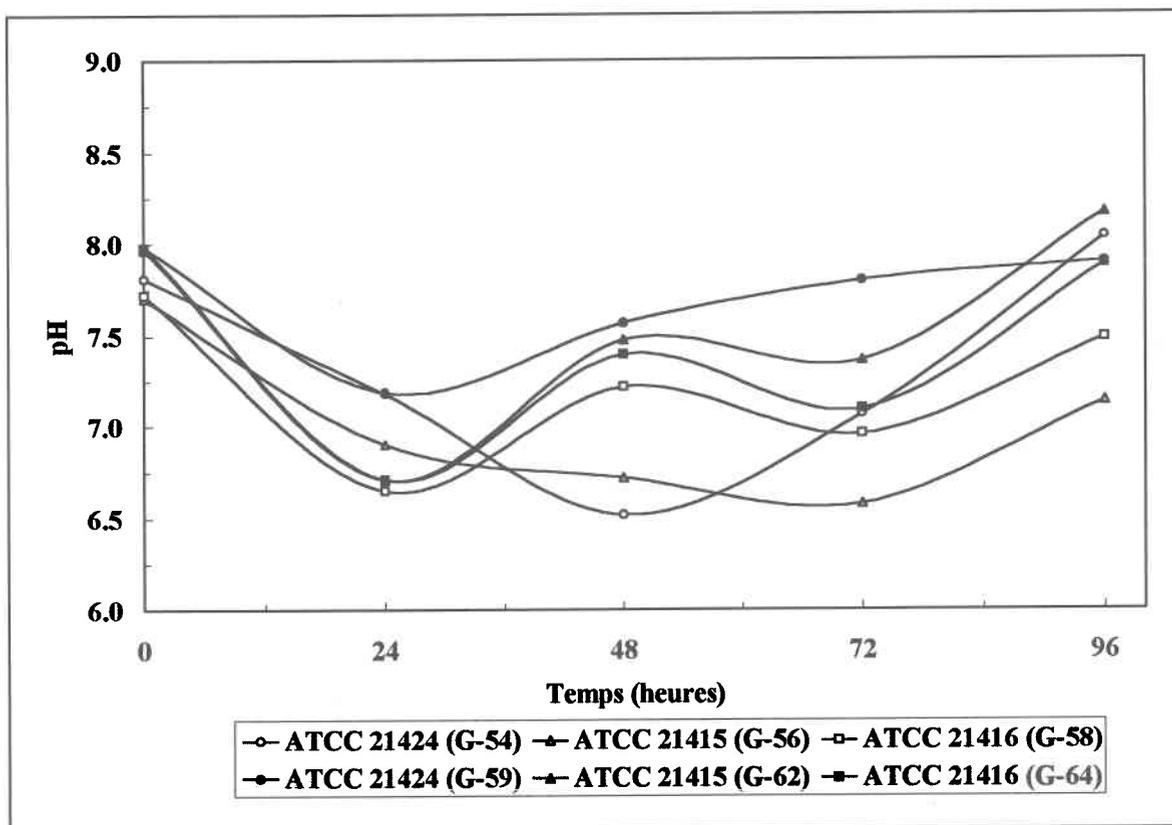


Figure 6 Variation du pH lors de la production de protéases en milieu synthétique et en milieu de boues secondaires de Valcartier avec glucose et tampon PBS 0,1M

Par ailleurs, la production maximale de protéases lors des premiers test comparatifs en milieu synthétique et dans les boues de la CUQ (Tableau 27) diffèrent de celles obtenues avec les boues secondaires de Valcartier. En effet, les productions maximales sont beaucoup plus faibles mais la période étudiée est deux fois plus courte, 48 heures au lieu de 96 heures, et la fréquence d'échantillonnage est quatre fois plus élevée, soit aux 6 heures au lieu de 24 heures. Il faut également mentionner qu'aucune adaptation des souches à ce nouveau milieu n'a été effectué avant de procéder à cet essai.

Néanmoins, pour la souche ATCC 21424, il faut une douzaine d'heures pour produire 0,87 U.I./mL de protéases dans le milieu synthétique avec la dextrine et le tampon PBS 0,1M tandis qu'une même période de temps permet la synthèse de deux fois moins d'enzymes (0,31 U.I./mL) lorsque le milieu à base de boues de la CUQ est utilisé. Par contre, pour la souche ATCC 21415, il faut au moins 36 heures pour produire en milieu synthétique une

quantité équivalente de protéinases (0,24 U.I./mL) à celle retrouvée dans le milieu de boues de la CUQ après 12 heures (0,19 U.I./mL). Enfin, pour la souche ATCC 21416, une période de 42 heures dans le milieu constitué de boues de la CUQ ne permet de produire que la moitié (0,29 U.I./mL) de protéases formées en 12 heures dans le milieu synthétique (0,74 U.I./mL). Il semble donc que la souche ATCC 21424 soit la plus naturellement adaptée à produire des protéases dans le milieu de boues de la CUQ. Toutefois, une meilleure adaptation des souches à ce milieu pourrait produire des résultats fort différents.

Tableau 27 Production maximale de protéases lors des premiers tests comparatifs en milieu synthétique et dans les boues de la CUQ

Souches	Tampon	Milieu	Groupe	Essais	Temps (heures)	Protéases (U.I./mL)
ATCC 21424	PBS 0,1M	Synt. + dextrine	J	102	12	0,87
	PBS 0,1M	CUQ + dextrine	J	106	12	0,31
ATCC 21415	PBS 0,1M	Synt. + dextrine	J	103	36	0,24
	PBS 0,1M	CUQ + dextrine	J	107	12	0,19
ATCC 21416	PBS 0,1M	Synt. + dextrine	J	104	12	0,74
	PBS 0,1M	CUQ + dextrine	J	108	42	0,29

De plus, le pH des divers milieux de culture peut également avoir joué un rôle majeur dans les différences d'activité enzymatique entre le milieu synthétique et le milieu composé de boues de la CUQ. En effet, les pH initiaux des essais effectués dans le milieu synthétique se situe au départ à environ 7,4 tandis qu'ils sont de 9,2 pour les essais dans les boues de la CUQ (Figure 7). En outre, pour les milieux synthétiques, le pH devient rapidement acide après une douzaine d'heures et se maintient dans ces conditions durant les 24-30 heures subséquentes avant de retourner à des conditions plus alcalines. Par contre, pour le milieu constitué de boues de la CUQ, le pH de départ (9,2) fortement alcalin est difficilement abaissé avant 30-36 heures pour la souche ATCC 21424 alors que pour les autres souches, il se maintient à environ 9,0. Il est donc plausible que ces pH fortement alcalins contribuent à inhiber la production de

protéases et qu'un meilleur contrôle du pH vers des valeurs moins alcalines, 7,6 à 8,0 par exemple, aurait peut-être permis d'augmenter la synthèse d'enzymes protéolytiques.

La croissance microbienne est un autre élément important mesuré lors de cet essai. En effet, la Figure 8 montre que le nombre de microorganismes augmentent rapidement de façon exponentielle durant les douze premières heures et atteint par la suite une phase stationnaire et ce, peu importe la souche étudiée ou le milieu de culture utilisé. La composition du milieu ne semble donc pas influencer la reproduction des microorganismes alors qu'elle influencerait sur la synthèse de protéases. En fait, la synthèse des enzymes est reliée aux différentes phases de développement de la culture microbienne mais elle s'exprime de façon différente selon les souches étudiées. Ainsi, certains microorganismes produisent leur protéase durant la phase logarithmique de leur croissance alors que d'autres comme *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* en produisent plutôt dans la phase stationnaire (Boïing, 1982).

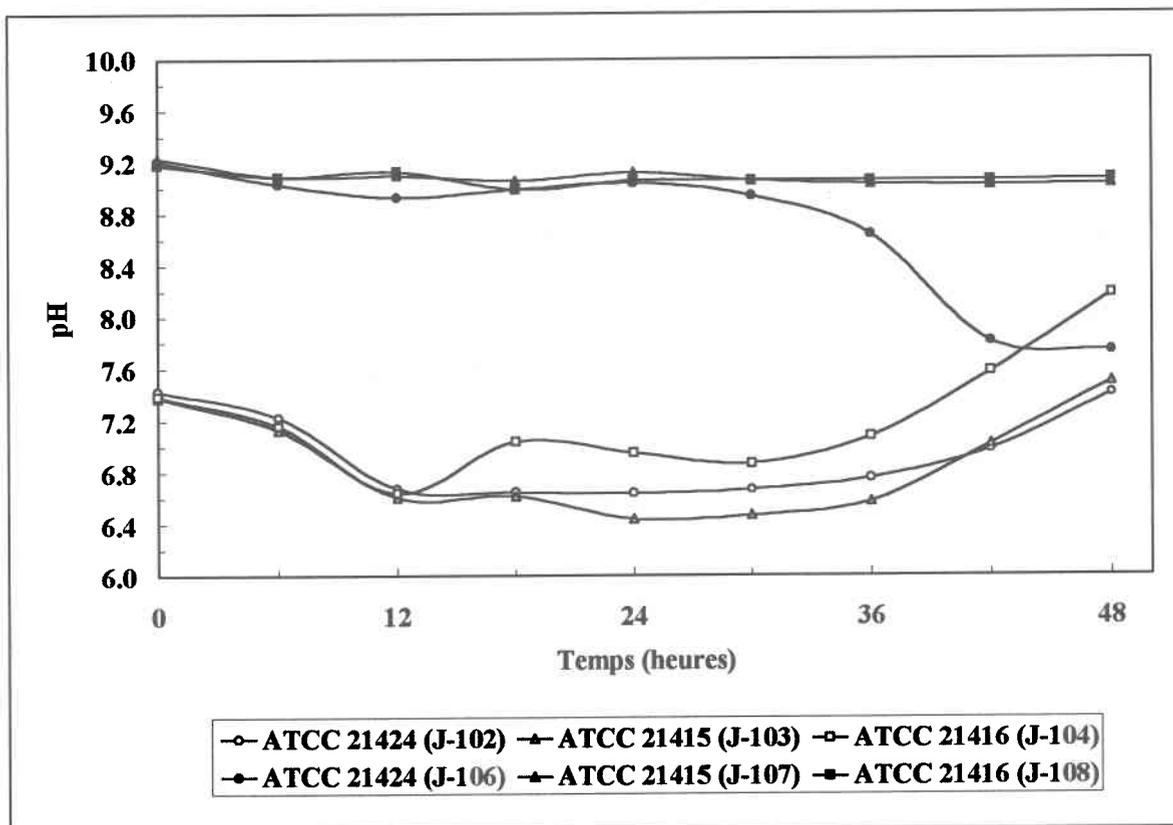


Figure 7 Variation du pH lors de la production de protéases en milieu synthétique et en milieu de boues de la CUQ avec dextrine et tampon PBS 0,1M

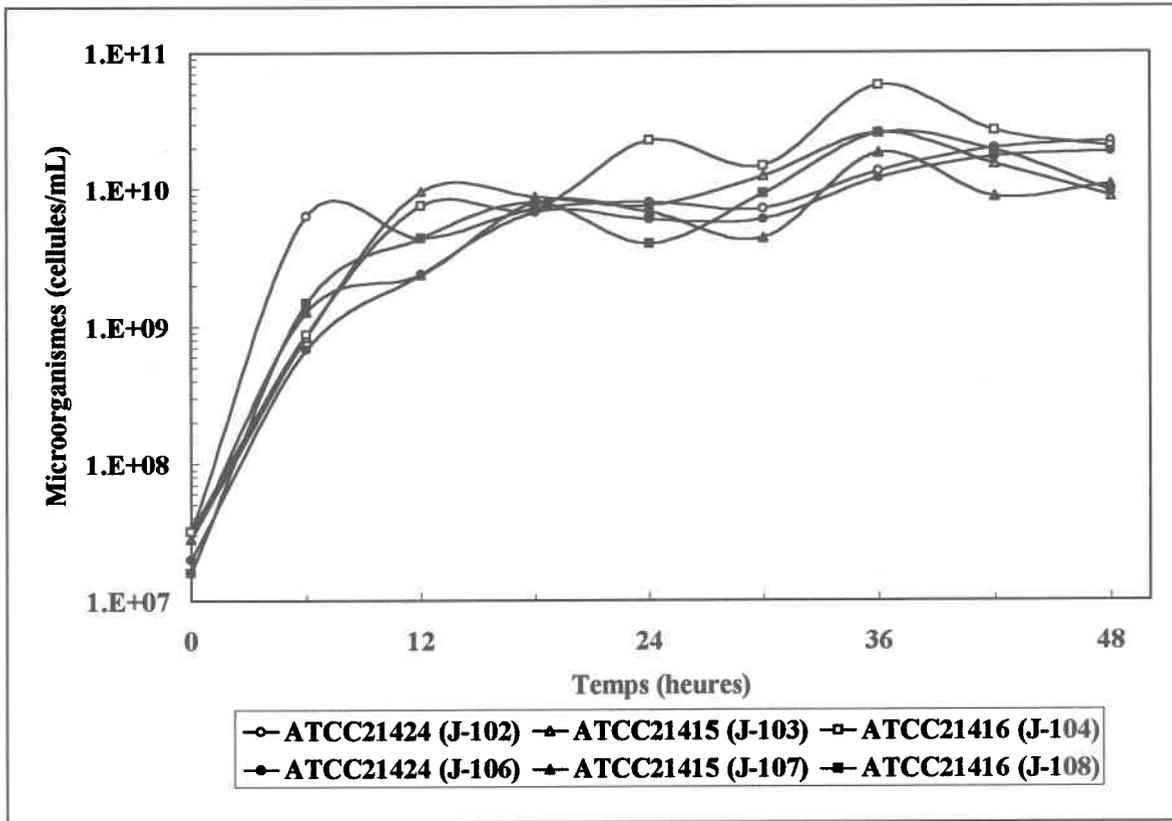


Figure 8 Croissance des microorganismes lors de la production de protéases en milieu synthétique et en milieu de boues de la CUQ avec dextrine et tampon PBS 0,1M

5,3 Étude de l'effet de la composition du milieu

L'effet de la composition du milieu sur la production de protéases est donc évalué par un troisième groupe d'expériences car un milieu de culture qui favorise la croissance d'un microorganisme n'est pas nécessairement celui qui assurera le plus haut rendement en produits métabolisés (Simon et Meunier, 1970). En fait, les milieux adéquats pour la croissance ne sont pas nécessairement assez riches pour permettre la synthèse de certaines enzymes (Pardee, 1961). Cependant, la relation entre le cycle de croissance et la production enzymatique est toujours dépendante des ingrédients du milieu (Boïing, 1982).

Le Tableau 28 montre les résultats de production enzymatique lorsqu'une petite quantité de boues secondaires de Valcartier est mélangée au milieu synthétique de base, soit dans une proportion de 25 ou 50 %. Ainsi, avec la souche ATCC 21424, la production maximale de protéases est obtenue en milieu synthétique (8,89 U.I./mL en 72 heures) alors que le milieu contenant 25 % de boues ne synthétise que 2,71 U.I./mL en 48 heures et que le milieu avec 50 % de boues ne produit que 2,14 U.I./mL pour la même période. Ces résultats sont divergents pour la souche ATCC 21415. En effet, il n'y a pas de différences significatives entre la production de protéases en milieu synthétique (4,51 U.I./mL) et en milieu composé de 25 % de boues secondaires de Valcartier sur une période de 48 heures (4,26 U.I./mL) alors qu'il faut 24 heures de plus pour produire une quantité équivalente de protéinases lorsque le milieu contient 50 % de boues d'épuration (3,99 U.I./mL). Enfin, pour la souche ATCC 21416, la production de protéases est supérieure lorsque le milieu de culture contient de 25 à 50 % de boues (5,21 U.I./mL et 5,65 U.I./mL respectivement) mais le temps requis pour atteindre ces sommets est de 72 heures au lieu de 48 heures pour le milieu synthétique (3,15 U.I./mL). Il semble donc que selon la souche étudiée, l'ajout de boues secondaires de Valcartier influe sur la production d'enzymes protéolytiques.

Tableau 28 Production maximale de protéases en milieu synthétique et en milieux composés de 25 à 50% de boues secondaires de Valcartier

Souches	Tampon	Milieu	Groupe	Essais	Temps (heures)	Protéases (U.I./mL)
ATCC 21424	Aucun	Synt. + dextrine	E	32	72	8,89
	Aucun	VALC (25%) + dextrine	E	33	48	2,71
	Aucun	VALC (50%) + dextrine	E	34	72	2,14
ATCC 21415	Aucun	Synt. + dextrine	E	35	48	4,51
	Aucun	VALC (25%) + dextrine	E	36	48	4,26
	Aucun	VALC (50%) + dextrine	E	37	72	3,99
ATCC 21416	Aucun	Synt. + dextrine	E	38	48	3,15
	Aucun	VALC (25%) + dextrine	E	39	72	5,21
	Aucun	VALC (50%) + dextrine	E	40	72	5,65

Une autre série d'expériences a été effectuée afin de vérifier l'effet des divers constituants des milieux de production. Ainsi, le milieu synthétique a été comparé avec un milieu composé uniquement de boues (CUQ ou Valcartier) et aussi avec un milieu contenant l'une ou l'autre de ces boues et de la dextrine et enfin, un milieu contenant des boues, de la dextrine et de la farine de soya. Les résultats de cet essai sont présentés au Tableau 29.

Pour la souche ATCC 21424, les meilleurs résultats sont obtenus avec le milieu synthétique après une période de 24 heures (0,73 U.I./mL). Les milieux composés uniquement de boues de la CUQ ou de Valcartier ne montrent qu'une très faible activité enzymatique après une période de 36 et 48 heures (0,00 et 0,08 U.I./mL respectivement). Lorsque la dextrine est ajoutée à ces boues, la production de protéases s'élève à 0,75 U.I./mL pour les boues de la CUQ et 0,42 U.I./mL pour celles de Valcartier après respectivement 24 et 36 heures ce qui s'approche des résultats obtenus en milieu synthétique. Par contre, l'ajout de dextrine et de farine de soya ne permet pas d'améliorer les performances atteintes avec le simple ajout de dextrine. En fait,

l'activité enzymatique est de 0,24 U.I./mL pour les boues de la CUQ et 0,18 U.I./mL pour les boues de Valcartier après 24 heures. Il semble donc que pour cette souche le simple ajout de dextrine aux boues d'épuration soit suffisant pour induire une production de protéases similaires à celle obtenue en milieu synthétique et qu'un apport supplémentaire de protéines sous la forme de farine de soja provoque plutôt une inhibition de l'activité enzymatique.

Dans le cas de la souche ATCC 21415, la production enzymatique en milieu synthétique est de 1,13 U.I./mL après 48 heures alors qu'en milieu composé de boues de la CUQ, elle est de 1,29 U.I./mL et de 0,39 U.I./mL pour celui avec des boues de Valcartier. En présence de dextrine, l'activité enzymatique dans les boues de la CUQ est de 0,91 U.I./mL alors qu'elle est de 1,02 U.I./mL pour les boues de Valcartier. Enfin, avec de la dextrine et de la farine de soya, la quantité de protéinases est de 1,49 U.I./mL dans les boues de la CUQ et de 1,11 U.I./mL dans les boues de Valcartier. Dès lors, pour cette souche, le milieu composé de boues de la CUQ est suffisant pour produire une quantité de protéases similaires à celle retrouvée dans le milieu synthétique. L'ajout subséquent de dextrine ne favorise pas un accroissement de production tandis qu'un ajout de farine de soja induit une augmentation de l'activité. Cependant, pour les boues de Valcartier, l'ajout de dextrine et/ou de farine de soja semble nécessaire pour atteindre des productions enzymatiques similaires à celle du milieu synthétique.

Enfin, pour la souche ATCC 21416 l'activité enzymatique en milieu de boues de la CUQ est de 1,06 U.I./mL après 36 heures et de 0,45 U.I./mL après 24 heures en milieu de boues de Valcartier, ce qui dans les deux cas est supérieur à celle obtenue en milieu synthétique (0,15 U.I./mL en 36 heures). Lors de l'ajout de dextrine aux boues de la CUQ la quantité de protéinases est de 0,36 U.I./mL après 48 heures alors qu'elle est de 0,22 U.I./mL avec les boues de Valcartier. Par ailleurs, avec une supplémentation en dextrine et en farine de soya, l'activité enzymatique s'élève à 0,69 U.I./mL après 48 heures pour les boues de la CUQ et à 2,42 U.I./mL après 24 heures pour les boues de Valcartier. La production de protéases par cette souche est donc favorisée lorsque le milieu est composé de boues d'épuration de la CUQ ou de Valcartier. Par contre, en présence de dextrine cette activité est réduite mais un ajout protéinique sous la forme de farine de soja favorise la formation de protéinases particulièrement dans le cas du milieu composé de boues de Valcartier.

Tableau 29 Production maximale de protéases en milieu synthétique, de boues secondaires de Valcartier ou de boues de la CUQ avec ou sans suppléments carbonés et protéiniques

Souches	Tampon	Milieu	Groupe	Essais	Temps (heures)	Protéases (U.L./mL)
ATCC 21424	PBS 0,1M	Synt. + dextrine	I	78	24	0,73
	PBS 0,1M	CUQ	I	81	48	0,00
	PBS 0,1M	CUQ + dextrine	I	84	24	0,75
	PBS 0,1M	CUQ + dext. et soya	I	88	24	0,24
	PBS 0,1M	VALC	I	91	36	0,08
	PBS 0,1M	VALC + dextrine	I	94	36	0,42
	PBS 0,1M	VALC + dext. et soja	I	98	24	0,18
ATCC 21415	PBS 0,1M	Synt. + dextrine	I	79	48	1,13
	PBS 0,1M	CUQ	I	82	48	1,29
	PBS 0,1M	CUQ + dextrine	I	85	48	0,91
	PBS 0,1M	CUQ + dext. et soya	I	89	24	1,49
	PBS 0,1M	VALC	I	92	36	0,39
	PBS 0,1M	VALC + dextrine	I	95	24	1,02
	PBS 0,1M	VALC + dext. et soja	I	99	12	1,11
ATCC 21416	PBS 0,1M	Synt. + dextrine	I	80	36	0,15
	PBS 0,1M	CUQ	I	83	36	1,06
	PBS 0,1M	CUQ + dextrine	I	86	48	0,36
	PBS 0,1M	CUQ + dext. et soya	I	90	48	0,69
	PBS 0,1M	VALC	I	93	24	0,45
	PBS 0,1M	VALC + dextrine	I	96	12	0,22
	PBS 0,1M	VALC + dext. et soja	I	100	24	2,42

Ces divers résultats montrent donc qu'il est difficile d'établir des conditions générales pour la production de protéases en se basant sur la composition du milieu seulement. Ainsi, selon la souche étudiée, il peut être nécessaire d'ajouter une source de carbone et/ou de protéines afin d'enrichir les boues d'épuration afin de favoriser la production d'enzymes protéolytiques.

5,4 Étude de l'effet de la source de carbone

Afin d'obtenir une production maximale de protéases, il est également important de fournir aux microorganismes une source de carbone adéquate car les sucres assimilables sont indispensables. Habituellement, dans le cas des hétérotrophes, le carbone nécessaire à la croissance est surtout apporté par des hydrates de carbone, la quantité de carbone à fournir variant avec les microorganismes. Ainsi, dans le cas d'un germe hautement aérobique jusqu'à 50 % du carbone du substrat est utilisé, tandis que dans le cas d'un aérobique facultatif, cette utilisation n'est que d'environ 10 % (Simon et Meunier, 1970).

Les glucides agissent également comme inducteurs dans la production enzymatique comme l'amidon (amylase), le dextrane (dextranase), le maltose (maltase) et le xylane (xylanase). Le glucose est utilisé plus rapidement que n'importe quelle autre source de carbone et produit une plus grande variété d'intermédiaires métaboliques. Ces derniers peuvent alors agir comme répresseur de la production enzymatique (Pardee, 1961). L'inhibition par l'effet glucose existe aussi pour la chitinase de *Streptomyces griseus*, la hyaluronidase de *Clostridium perfringens* et l'invertase de *Saccharomyces fragilis*. Les protéinases sont en général inhibées par la présence de sucres fermentescibles mais beaucoup d'exceptions existent : subtilisin, protéinase alcaline de *Bacillus natto*, collagénase de *Clostridium histolyticum*, gélatinase de *Bacillus amyloliquefaciens*, gélatinase de *Pseudomonas myxogenes* (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1975).

Le Tableau 30 montre la production de protéases par la souche ATCC 21424 lorsque des sources de carbone différentes, dextrine ou glucose, sont ajoutées aux boues de la CUQ et de Valcartier ou aux surnageants de boues de la CUQ et de Valcartier. Dans les milieux constitués

de boues totales, la production de protéases est maximale lorsque du glucose est ajoutée aux boues de la CUQ avec 2,60 U.I./mL après 72 heures de fermentation alors qu'elle est quatre fois plus faible quand la dextrine est utilisée (0,64 U.I./mL après 48 heures). Avec les boues totales de Valcartier, il y a aussi une plus grande activité enzymatique avec l'utilisation du glucose (1,56 U.I./mL après 96 heures) qu'avec la dextrine (0,79 U.I./mL après 48 heures). Lorsque les surnageants de boues de la CUQ sont utilisés, l'activité enzymatique est plus forte quand la dextrine est ajoutée au milieu (1,52 U.I./mL) qu'avec le glucose (1,03 U.I./mL) mais il faut alors deux fois plus de temps pour qu'elle s'exprime (96 heures au lieu de 48 heures). Des résultats similaires sont obtenus quand le surnageant de boues de Valcartier est utilisé. Ainsi, après 48 heures de fermentation avec du glucose, l'activité enzymatique est de 0,43 U.I./mL alors qu'elle est de 0,75 U.I./mL avec la dextrine après 96 heures. Il semble donc que l'utilisation de glucose avec des boues complètes soit plus adéquate que celle de la dextrine mais avec des surnageants de boues il est plus difficile de choisir entre les deux sources de carbone car l'une induit un accroissement de la production de protéases mais requiert un plus long temps de fermentation alors que l'autre donne moins de protéases mais ne requiert que deux fois moins de temps.

Tableau 30 Production maximale de protéases avec des sources de carbone différentes

Souches	Tampon	Milieu	Groupe	Essais	Temps (heures)	Protéases (U.I./mL)
ATCC 21424	PBS 0,1M	CUQ+ glucose	L	123	72	2,60
	PBS 0,1M	CUQ+ dextrine	L	124	48	0,64
	PBS 0,1M	Valc. + glucose	L	126	96	1,56
	PBS 0,1M	Valc. + dextrine	L	127	48	0,79
	PBS 0,1M	Surn. CUQ + glucose	L	129	48	1,03
	PBS 0,1M	Surn. CUQ + dextrine	L	130	96	1,52
	PBS 0,1M	Surn. VALC + glucose	L	131	48	0,43
	PBS 0,1M	Surn. VALC + dextrine	L	132	96	0,75

Par ailleurs, de fortes concentrations en source de carbone conduisent en une production excessive d'acides organiques et mènent à une réduction du pH et conséquemment à une baisse de la production de protéases alcalines (Boïing, 1982). D'ailleurs, la Figure 9 montre que le pH est plus difficilement maintenu quand les boues totales servent de milieu de culture malgré l'utilisation du tampon PBS 0,1M. Avec les surnageants de boues, le pH se maintient beaucoup plus aisément dans la gamme de pH cible, soit entre 7,2 et 7,8.

D'autre part, Keay *et al.* (1972) ont montré que la production enzymatique peut être grandement augmentée quand la synthèse des protéases s'accompagne d'un accroissement du pH de la culture. Un tel accroissement du pH peut être atteint, par exemple, en utilisant des acides organiques ou des sels comme source principale de carbone (Dion, 1950 ; Kline, 1944 ; Maxwell, 1952 ; Niwa, 1971).

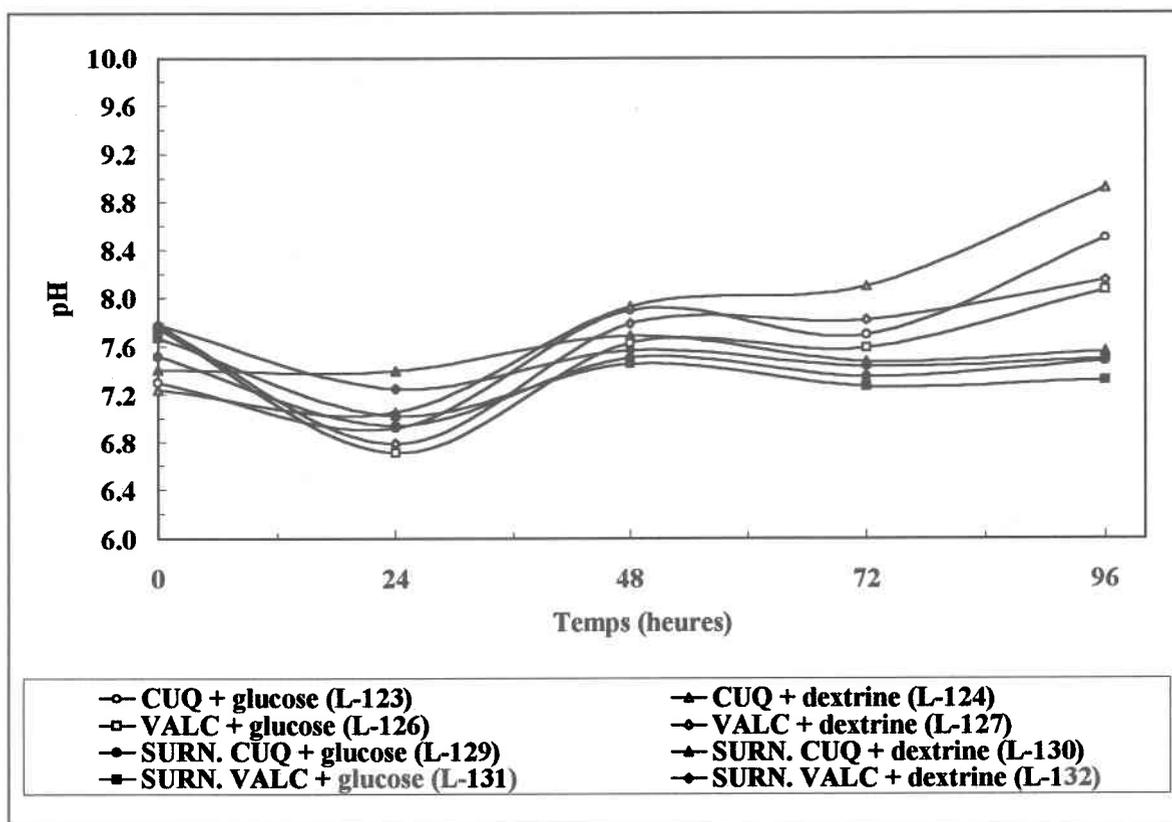


Figure 9 Variation du pH avec des sources de carbone différentes

Enfin, il existe très peu de variations dans la croissance des microorganismes eux-mêmes (Figure 10) et ce peu importe le milieu choisi. En fait, dans tous les cas la phase stationnaire est atteinte après 24-48 heures de fermentation.

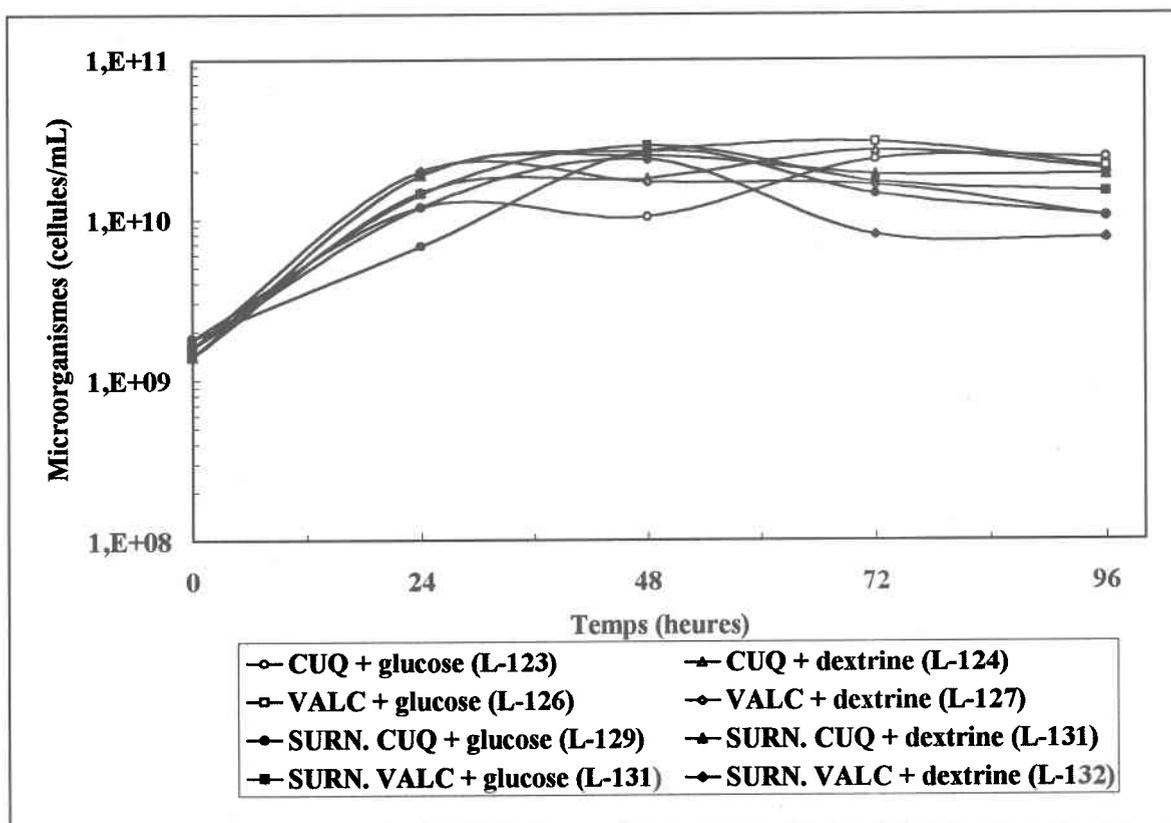


Figure 10 Croissance des microorganismes avec des sources de carbone différentes

Pour sa part, le Tableau 31 montre la composition finale en éléments nutritifs des milieux de culture étudiés lors de cet essai. Au niveau du contenu en azote, l'azote total final varie entre 0,7 et 2,2 % alors qu'au départ dans les boues de la CUQ il y en avait 3,1 % et 6,8 % dans celles de Valcartier. Il y a donc une utilisation relative de l'azote pendant la période de fermentation. Pour sa part, l'azote ammoniacal est beaucoup plus variable d'un milieu de culture à l'autre. Ainsi, plus de la moitié de l'azote ammoniacal disponible au départ dans les boues de la CUQ (236 mg/L) est consommé pendant la période de fermentation soit entre 99 et 130 mg/L et ce, peu importe la source de carbone utilisée. Cette utilisation est tout aussi forte dans le cas des boues de Valcartier où la concentration ammoniacale initiale passe de 135 mg/L

à respectivement 18,9 mg/L avec le glucose et 63,8 mg/L avec la dextrine à la fin des essais. Enfin, lorsque les surnageants de boues de la CUQ ou de Valcartier sont utilisés comme milieu de production, les concentrations finales en azote ammoniacal sont très faibles par rapport à celles retrouvées dans les boues totales. Ainsi, pour les essais avec les surnageants de boues de la CUQ les concentrations en NH_4^+ varient entre 8,3 et 22,5 mg/L alors que pour ceux de Valcartier elles sont quasi nulles avec moins de 1 mg/L. Dès lors, il est possible qu'une certaine carence en azote ammoniacal ait contribué à limiter la production enzymatique et ce, plus particulièrement dans le cas des surnageants de boues de Valcartier.

D'autre part, les teneurs en carbone total retrouvées à la fin des essais indiquent une forte consommation de celui-ci lors des fermentations car malgré des concentrations de 41,5 % de carbone dans les boues de Valcartier et de 32,7 % dans celles de la CUQ, et l'ajout de 3 % (p/v) de glucose ou de dextrine, les concentrations finales varient entre 13,3 et 24,8 %. De plus, la consommation est plus forte dans le cas des boues de la CUQ avec du glucose qu'avec les boues de Valcartier avec dextrine. D'ailleurs, les concentrations en carbone organique total dissous (COT) sont cohérentes avec ces résultats puisqu'elles montrent également une plus forte consommation dans le cas des boues de la CUQ avec glucose que dans celui des boues de Valcartier avec dextrine. En effet, la concentration initiale en COT dans le milieu synthétique avec dextrine est de 13 182 mg/L alors qu'à la fin des fermentations elle varie entre 2 620 et 8 672 mg/L.

Par ailleurs, les fortes teneurs en ortho-phosphates retrouvées dans ces essais sont majoritairement apportées par les concentrations élevées en phosphore que contient le tampon PBS 0,1M. Il est donc difficile d'estimer la consommation potentielle des microorganismes durant la période de fermentation.

Tableau 31 Composition finale des milieux de culture avec diverses sources de carbone lors des essais avec *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Paramètre	CUQ+ glucose (L-123)	CUQ+ dextrine (L-124)	Valc. + glucose (L-126)	Valc. + dextrine (L-127)	Surn. CUQ + glucose (L-129)	Surn. CUQ + dextrine (L-130)	Surn. VALC + glucose (L-131)	Surn. VALC + dextrine (L-132)
Solides Totaux (g/L)	31,0	37,0	24,6	32,0	30,0	35,7	33,5	38,6
Solides Volatils (g/L)	13,9	19,6	10,2	17,6	9,1	20,3	16,0	22,8
Azote (% p/p)	0,9	1,3	2,2	1,6	1,5	0,7	0,7	0,8
Carbone (% p/p)	13,3	23,1	20,2	24,5	14,9	23,1	20,0	24,8
Soufre (% p/p)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Carbonique organique total (mg/L)	2 972	6 166	2 620	4 824	5 473	7 393	6 036	8 672
Azote ammoniacal (mg/L)	106	137	18,9	63,8	22,50	8,30	0,94	0,90
Ortho-phosphate (mg/L)	2 567	2 559	2 656	2 460	3 994	2 611	3 398	3 149

Enfin, le Tableau 32 montre les teneurs finales en métaux solubles et totaux pour les milieux contenant du glucose ou de la dextrine. Ainsi, les teneurs en cadmium solubilisé sont similaires d'un milieu de culture à l'autre tandis que celles du chrome sont quatre fois plus élevées dans les milieux constitués de boues de la CUQ avec glucose et dextrine. D'autre part, les concentrations en cuivre dans les milieux à base de boues totales sont de dix fois supérieures à celles retrouvées dans les milieux à base de surnageant de boues. Cette variation est moins importante entre ces divers milieux pour le manganèse et le plomb. Les quantités de nickel soluble sont similaires dans tous les milieux. Enfin, il y a environ trois fois plus de zinc dans les milieux à base de boues totales de la CUQ que dans l'ensemble des autres milieux. Toutefois, ces variations ne semblent pas s'accroître avec l'utilisation préférentielle d'une source de carbone ou l'autre.

Pour sa part, le Tableau 33 présente la variation finale des teneurs en métaux totaux pour les milieux de cultures contenant diverses sources de carbone. Il faut cependant mentionner que même si des différences importantes sont retrouvées selon le métal et le milieu de culture étudié, c'est tout d'abord aux métaux solubles que les organismes hétérotrophes sont exposés et sensibilisés. Ainsi, selon Metcalf et Eddy inc. (1991), les concentrations des substances inhibitrices des procédés biologiques aérobies sont pour le Cd de 0,5-10 mg/L, le Cr de 0,1-20 mg/L, le Cu de 0,1-20 mg/L, le Mn de 10 mg/L, le Ni de 1-5 mg/L, le Pb de 0,1-10 mg/L et le Zn de 0,3-20 mg/L. Il semble donc qu'à l'exception du cadmium, tous les autres éléments pris individuellement ou séparément pourraient avoir des effets inhibiteurs sur la croissance des microorganismes et donc sur la production de protéases. Cependant, il faudrait effectuer des études plus élaborées pour vérifier l'impact réel des métaux solubles dans la production de protéases.

Tableau 32 Teneurs finales en métaux solubles avec diverses sources de carbone pour *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Paramètre (mg/L)	CUQ+ glucose (L-123)	CUQ+ dextrine (L-124)	Valc. + glucose (L-126)	Valc. + dextrine (L-127)	Surn. CUQ + glucose (L-129)	Surn. CUQ + dextrine (L-130)	Surn. VALC + glucose (L-131)	Surn. VALC + dextrine (L-132)
Cd	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05
Cr	0,46	0,45	0,11	0,10	0,11	0,12	0,11	0,11
Cu	1,97	1,99	2,11	2,41	0,28	0,28	0,11	0,14
Mn	1,32	1,17	0,64	0,51	0,19	0,46	0,22	0,25
Ni	0,30	0,30	0,22	0,23	0,25	0,24	0,23	0,23
Pb	0,87	0,84	0,53	0,50	0,55	0,54	0,52	0,52
Zn	4,94	4,71	1,82	1,47	1,09	1,22	1,04	1,15

Tableau 33 Variation finale des teneurs en métaux totaux avec diverses sources de carbone pour *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Paramètre	CUQ+ glucose	CUQ+ dextrine	Valc. + glucose	Valc. + dextrine	Surn. CUQ + glucose	Surn. CUQ + dextrine	Surn. VALC + glucose	Surn. VALC + dextrine
(mg/kg)	(L-123)	(L-124)	(L-126)	(L-127)	(L-129)	(L-130)	(L-131)	(L-132)
Cd	0,97	1,08	1,63	1,25	1,33	0,56	0,90	0,52
Cr	16,8	15,9	17,5	10,3	11,7	8,13	8,67	7,25
Cu	51,6	42,7	137	118	8,00	4,77	2,99	2,59
Mn	41,3	32,7	78,2	59,7	26,0	13,5	5,38	4,66
Ni	8,38	7,29	24,0	6,88	7,33	4,49	5,68	4,40
Pb	28,4	23,2	29,3	22,5	22,0	14,3	15,8	13,5
Zn	107	88,8	72,9	59,4	27,0	15,4	17,0	9,84

5,5 Étude de l'effet de l'apport d'azote

Un autre élément important dans la croissance microbienne et la production enzymatique est la source d'azote. Les sources d'azote sont constituées habituellement dans l'industrie par l'ammoniaque et les sels ammoniacaux quoique, en général, on obtienne une croissance plus rapide en s'adressant à des sources riches en azote organique. Toutefois, certains microorganismes exigent exclusivement pour leur développement de l'azote organique dont les composés sont relativement coûteux. Les sources organiques les plus utilisés sont les farines de soja, d'arachide, de viande ou de poisson, l'extrait de malt, l'extrait de levure, le lactosérum, la caséine ainsi que des extraits enzymatiques de divers produits riches en protéines (Simon et Meunier, 1970). Par contre, la synthèse enzymatique est parfois stimulée par des formes complexes d'azote qui peuvent ne pas stimuler la croissance. Par exemple, la synthèse de la hyaluronidase de *Clostridium septicum* et de *Staphylococcus aureus* augmente avec la peptone et le digestat papaïque du muscle de cheval, celle de la pentosanase de *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* et *Trichoderma viridae* est stimulée par la liqueur de trempage du maïs (corn steep liquor). La protéinase de *B. subtilis* voit sa synthèse augmenter avec le son de riz délipidé (Larpent et Larpent-Gourgau, 1975).

Quelques essais ont donc été effectués afin de vérifier l'effet de l'apport en ions NH_4^+ sur la production de protéases. Ainsi, le Tableau 34 présente la production enzymatique lors de divers essais avec des milieux de culture supplémentés ou non en ions ammoniacaux pour la souche ATCC 21424. Ces résultats montrent que lorsque les boues de la CUQ ou de Valcartier sont supplémentés avec du glucose, il y a une forte production enzymatique respectivement de 2,60 U.I./mL et 1,56 U.I./mL après 72 et 96 heures de fermentation. Par contre, si des ions NH_4^+ sont ajoutés à ces boues, il n'y a pas de synthèse de protéases. D'autre part, dans les milieux synthétiques contenant la même quantité d'ions ammoniacaux qui a été ajoutées aux boues d'épuration, les rendements de production enzymatiques très inférieurs à ceux obtenus avec les milieux de boues d'épuration sans ajout de NH_4^+ . Ainsi, sur une période de 72 heures de fermentation, il y a production de 0,78 U.I./mL de protéases pour le milieu synthétique avec glucose alors qu'en 24 heures, on n'en retrouve que 0,43 U.I./mL.

Tableau 34 Effet de l'addition d'ions NH_4 sur la production enzymatique de *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Tampon	Milieu	Azote (%)	Groupe	Essais	Temps (heures)	Protéases (U.I./mL)
PBS 0,1M	Synt. + glucose	1	L	121	72	0,78
PBS 0,1M	Synt. + dextrine	1	L	122	24	0,43
PBS 0,1M	CUQ + glucose	0	L	123	72	2,60
PBS 0,1M	CUQ + glucose	1	L	125	96	0,00
PBS 0,1M	VALC + glucose	0	L	126	96	1,56
PBS 0,1M	VALC + glucose	1	L	128	96	0,00

Ces résultats sont néanmoins conformes avec ceux observés par Boïng (1982) qui a démontré que les ions NH_4^+ inhibent la production de protéases alors que les nitrates et les sels de sodium des acides aspartique et glutamique favorisent leur production. Les sels de sodium des acides organiques ont le même effet (Boïng, 1982). Dès lors, il serait sans doute profitable d'employer des boues secondaires âgées, donc ayant subi une nitrification importante, de

manière à réduire les teneurs en azote ammoniacal dans le milieu et à hausser les concentrations en nitrate bénéfiques au procédé de production de protéases à partir de boues d'épuration.

D'autre part, la Figure 11 montre que le pH varie énormément durant ces essais malgré l'utilisation du tampon PBS 0,1M. Ainsi, les pH initiaux entre 7,2 et 7,8 s'acidifient rapidement sur une période de 24 heures puis remontent après 48 heures vers des valeurs beaucoup plus alcalines qu'au départ.

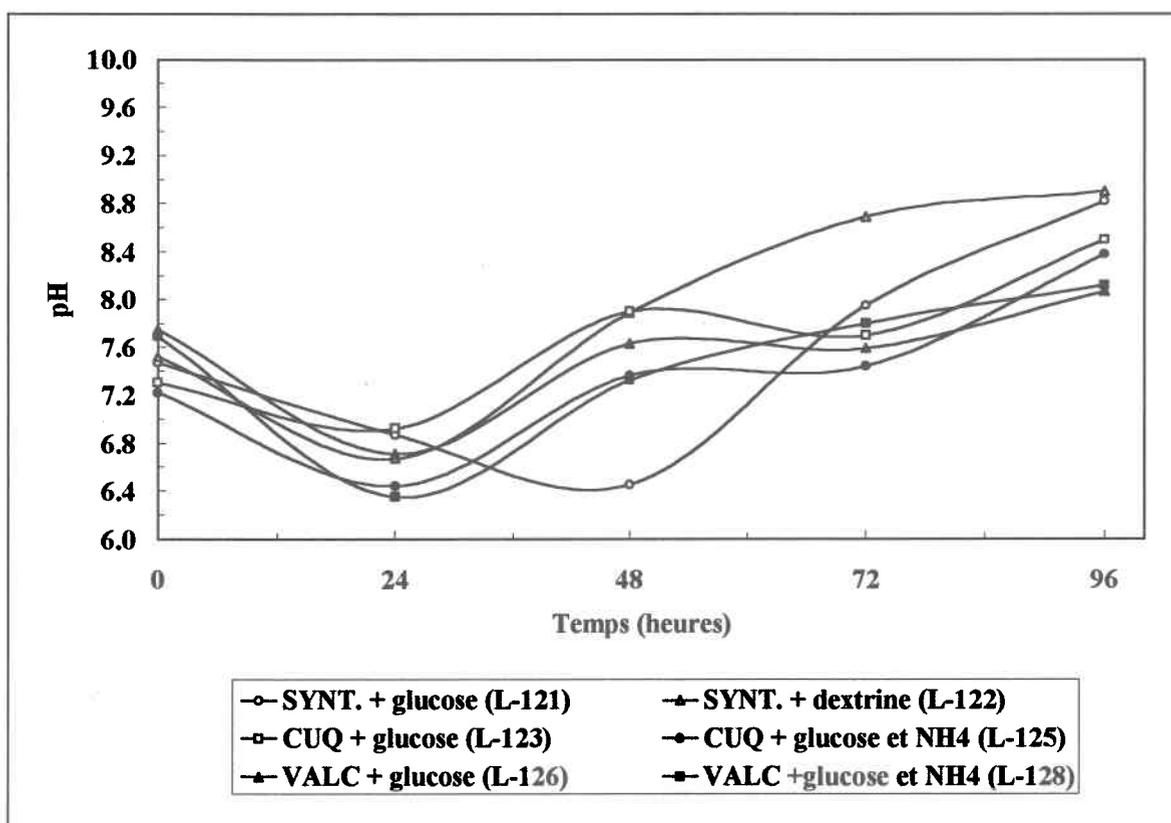


Figure 11 Variation du pH lors d'ajout d'ions NH_4^+ pour *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

La Figure 12 présente la croissance des microorganismes durant la période de fermentation. Cette croissance devient stationnaire après une période de 24-48 heures et il n'existe pas de différences significatives entre les essais supplémentés ou non en ions NH_4^+ . L'ajout d'ions ammoniacaux n'influerait donc pas sur la croissance des microorganismes mais plutôt sur la production elle-même de protéases.

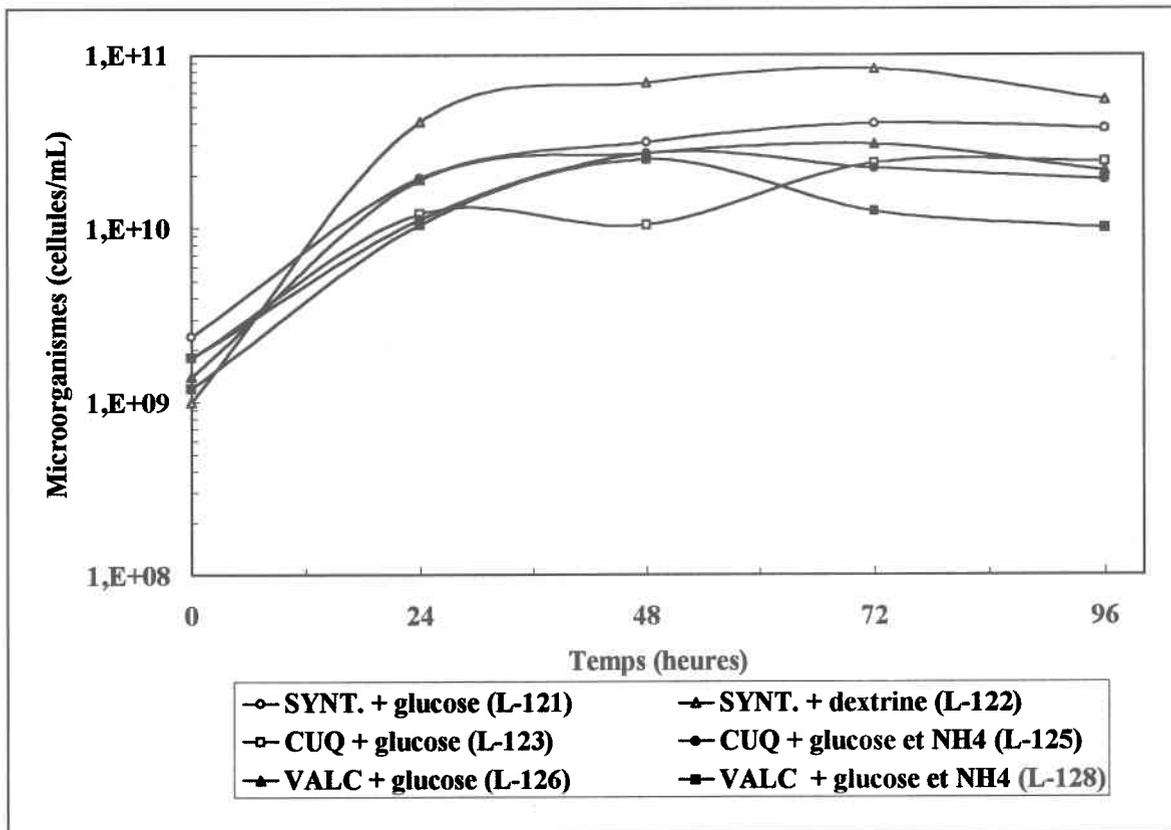


Figure 12 Croissance des microorganismes lors d'ajout d'ions NH_4^+ pour *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

D'autre part, le Tableau 35 montre la variation de la composition nutritionnelle lors d'ajout d'ions NH_4^+ et ce, à la fin de la période de fermentation. Ces résultats montrent que l'azote total final varie entre 0,9 et 5,6 % et que les valeurs les plus faibles sont retrouvées là où la production enzymatique est la plus élevée, soit avec les milieux de boues avec glucose mais sans supplément azoté. Par ailleurs, les teneurs en azote ammoniacal montrent clairement la présence de quantité plus qu'excédentaire dans les milieux synthétiques et de boues supplémentés en azote. Par contre, dans les milieux de boues avec glucose mais sans apport externe d'azote, les concentrations retrouvées sont très faibles, soit entre 18,9 et 106 mg/L. Il est fort possible que la non-disponibilité d'ions ammoniacaux dans ces milieux ait induit la production de protéases afin de briser les molécules de substrat (biodégradation des protéines) et ainsi d'obtenir les quantités d'azote nécessaire à la reproduction des microorganismes. Dans les autres milieux riches en azote ammoniacal, il n'aurait donc pas été nécessaire de fabriquer des protéases car

les besoins en éléments nutritifs auraient été comblés grâce aux composés déjà solubles.

Du côté du carbone, les teneurs en carbone totale et en carbone organique dissous retrouvées à la fin des essais sont relativement peu variables d'un milieu de culture à l'autre. Ainsi, pour le carbone total, les concentrations se situent entre 13,3 % (milieu boues CUQ avec glucose) et 28,7 % (milieu synthétique avec glucose). Cependant, il est extrêmement difficile sur la base de ce simple critère de déterminer le mécanisme d'utilisation du carbone selon les teneurs en azote ammoniacal ajoutées aux divers milieux. De même, le carbone organique dissous varie entre 2 134 mg/L (milieu boues Valcartier avec glucose et NH_4^+) à 9 708 mg/L (milieu synthétique avec dextrine). Il est donc également mal-aisé de discerner une voie d'utilisation préférentielle du carbone organique dissous quoiqu'il semble que les quantités finales présentes dans le milieu synthétique avec dextrine demeure élevées par rapport au contenu initial de ce type de milieu de culture (13 182 mg/L).

Tableau 35 Variation de la composition nutritionnelle lors d'ajout d'ions NH_4^+ pour *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Paramètre	Synt. + glucose (L-121)	Synt. + dextrine (L-122)	CUQ + glucose (L-123)	CUQ + NH_4 + glucose (L-125)	VALC + glucose (L-126)	VALC + NH_4 + glucose (L-128)
Solides Totaux (g/L)	49,1	57,3	31,0	32,3	24,6	30,5
Solides Volatils (g/L)	27,3	32,7	13,9	9,4	10,2	9,9
Azote (% p/p)	5,6	4,6	0,9	1,8	2,2	3,1
Carbone (% p/p)	28,7	27,5	13,3	17,5	20,2	15,2
Soufre (% p/p)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Carbonique organique total (mg/L)	5 922	9 708	2 972	2 845	2 620	2 134
Azote ammoniacal (mg/L)	1 611	1 531	106	1 697	18,9	1 765
Ortho-phosphate (mg/L)	3 252	4 420	2 567	5 481	2 656	4 687

D'autre part, les fortes teneurs en ortho-phosphates sont causées par l'utilisation du tampon PBS 0,1M, fortement chargé en ions phosphores. Il devient donc impossible d'estimer la consommation potentielle des microorganismes pendant ces fermentations.

Enfin, les Tableaux 36 et 37 montrent les teneurs finales en métaux solubles et totaux lors d'ajout d'ions ammoniacaux. À l'exception du Cadmium, les milieux à base de boues présentent des concentrations plus élevées en métaux solubles que les milieux synthétiques. Il est cependant difficile d'évaluer l'effet réel de ces concentrations légèrement supérieures sur la production de protéases sans des études plus approfondies. Cependant, l'ajout d'ions NH_4^+ ne semble pas avoir une influence importante sur la quantité de métaux solubilisés.

Tableau 36 Variation des teneurs en métaux solubles lors d'ajout d'ions NH_4^+ pour *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Paramètre (mg/L)	Synt. + glucose (L-121)	Synt. + dextrine (L-122)	CUQ + glucose (L-123)	CUQ + NH_4 + glucose (L-125)	VALC + glucose (L-126)	VALC + NH_4 + glucose (L-128)
Cd	0,06	0,06	0,05	0,07	0,05	0,05
Cr	0,10	0,10	0,46	0,38	0,11	0,11
Cu	0,25	0,28	1,97	2,04	2,11	3,29
Mn	0,33	0,23	1,32	1,08	0,64	0,72
Ni	0,56	0,49	0,30	0,31	0,22	0,25
Pb	0,54	0,53	0,87	0,87	0,53	0,61
Zn	3,26	2,76	4,94	4,03	1,82	2,02

Tableau 37 Variation des teneurs en métaux totaux lors d'ajout d'ions NH_4^+ pour *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Paramètre	Synt. + glucose	Synt. + dextrine	CUQ + glucose	CUQ + NH_4 + glucose	VALC + glucose	VALC + NH_4 + glucose
(mg/Kg)	(L-121)	(L-122)	(L-123)	(L-125)	(L-126)	(L-128)
Cd	0,61	0,52	0,97	1,24	1,63	1,31
Cr	5,90	4,53	16,8	23,8	17,5	10,2
Cu	6,31	5,58	51,56	36,8	137	96,1
Mn	10,8	12,6	41,3	29,7	78,2	48,9
Ni	5,90	5,23	8,38	8,05	24,0	7,22
Pb	11,8	11,7	28,4	27,2	29,3	22,6
Zn	22,6	20,1	107	81,1	72,9	49,2

5,6 Étude de l'effet du tampon

Les résultats des expériences précédentes montrent que le maintien des conditions alcalines des divers milieux de culture est difficile à obtenir. En effet, la formation de CO_2 et d'acides organiques acidifie progressivement le milieu et empêche le développement des microorganismes. Cette variation du pH provoque alors une altération dans la conformation de la structure protéinique et/ou une ionisation du site actif ou du substrat. D'autre part, un certain pH peut être optimal pour assurer la croissance bactérienne mais produire des protéases ayant une activité spécifique inférieure à celle retrouvée pour un pH moins favorable à la reproduction bactérienne (Pardee, 1961). Il devient donc essentiel au cours de la majorité des fermentations industrielles de réguler en continu le pH avec des électrodes fiables et aussi par l'ajout de tampons appropriés (Margot *et al.*, 1994 ; Simon et Meunier, 1970).

En fait, il existe une zone de pH pour laquelle l'activité enzymatique est maximale. Cette zone de pH est la résultante de plusieurs paramètres : température, force ionique, concentration en substrat qui sont des paramètres extérieurs mais aussi la nature même de l'enzyme. Ainsi, parmi les résidus d'acides aminés de la molécule enzymatique qui possèdent des groupements ionisables, certains vont lier et positionner le substrat, d'autres participer à la réaction, et la plupart servir au maintien de la conformation de l'enzyme. Ces résidus, comme le substrat dans

bien des cas, sont sensibles au pH et possèdent des états d'ionisation différents selon la valeur du pH. Dès lors, quand un groupement -COO^- du site actif est nécessaire à la fixation du substrat, l'abaissement du pH du milieu entraîne sa transformation en -COOH qui ne permet plus à ce moment la fixation du substrat et supprime donc l'activité de l'enzyme (Arnaud *et al.*, 1993).

Il devient donc nécessaire de choisir adéquatement la composition du système tampon nécessaire pour maintenir la valeur du pH du milieu de culture. Ainsi des tampons tels que les phosphates, mais dont le coût en limite l'emploi, ou le carbonate de calcium sont largement utilisés dans les industries de fermentation (Margot *et al.*, 1994 ; Simon et Meunier, 1970). De même, des agents neutralisants peu coûteux tels que les alcalis (soude, potasse, ammoniac, etc.) ou les acides minéraux (phosphorique, sulfurique, etc.) peuvent aussi être utilisés (Aviron-Violet *et al.*, 1982 ; Simon et Meunier, 1970). Pour des valeurs de pH de l'ordre de 9,0 à 10,0, l'utilisation de systèmes à base de borates est recommandée. Cependant, ces composants peuvent avoir un effet négatif en agissant comme inhibiteurs réversibles des protéases. Une alternative est le système carbonate-bicarbonate de sodium ou bicarbonate-hydroxyde de sodium qui néanmoins peut aussi provoquer une perte d'activité enzymatique dans les milieux liquides (Argüello *et al.*, 1998). Enfin, dans certains cas, une correction spontanée du pH est préférable à condition de tamponner suffisamment le milieu (phosphates ou carbonate de calcium). Une autre approche consiste à ajouter des substances dont la métabolisation provoquera des changements de pH dans la direction désirée (Atkinson et Mavituna, 1983).

Le Tableau 38 montre la production maximale de protéases de la souche ATCC 21424 lorsque le tampon PBS 0,1M ou le tampon borate sont utilisés pour maintenir le pH des milieux de culture avec le glucose comme source de carbone (synthétique, boues totales CUQ, boues totales Valcartier, surnageant de boues CUQ et surnageant de boues Valcartier). Ces résultats montrent qu'avec le milieu synthétique, l'activité enzymatique est d'environ 2,5 fois plus élevée quand le tampon utilisé est le PBS 0,1M (0,41 U.I./mL) que lorsqu'il s'agit du borate (0,17 U.I./mL). D'autre part, la différence de production de protéases est beaucoup plus marquée avec les milieux à base de boues totales. Ainsi, avec les boues de la CUQ, les protéinases sont de 2,15 U.I./mL avec le tampon à base de phosphore alors qu'elles sont

indétectables en présence de borate. De même, avec les boues de Valcartier, il y a une absence de protéases avec le tampon borate et une quantité importante de celles-ci avec le tampon au phosphore (2,37 U.I./mL). D'autre part, les surnageants de boues de la CUQ et de Valcartier ne sont pas aussi efficaces que les milieux à base de boues totales pour produire des enzymes protéolytiques quand le tampon PBS 0,1M est utilisé avec respectivement 0,44 U.I./mL et 0,64 U.I./mL mais ils favorisent quand même mieux cette synthèse qu'en présence du tampon borate (0,06 U.I./mL et 0,09 U.I./mL).

Tableau 38 Production maximale de protéases lors d'utilisation de divers tampons avec *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Souches	Tampon	Milieu	Groupe	Essais	Temps (heures)	Protéases (U.I./mL)
ATCC 21424	PBS 0,1M	Synt. + glucose	K	109	24	0,41
	Borate	Synt. + glucose	K	110	96	0,17
	PBS 0,1M	CUQ + glucose	K	112	96	2,15
	Borate	CUQ + glucose	K	113	96	0,00
	PBS 0,1M	VALC + glucose	K	115	96	2,37
	Borate	VALC + glucose	K	116	96	0,01
	PBS 0,1M	Surn. CUQ + glucose	K	117	72	0,44
	Borate	Surn. CUQ + glucose	K	118	96	0,06
	PBS 0,1M	Surn. VALC + glucose	K	119	48	0,64
	Borate	Surn. VALC + glucose	K	120	24	0,09

Par ailleurs, la Figure 13 présente l'évolution du pH durant les différentes fermentations avec le tampon PBS 0,1M et le tampon borate. Ces résultats montrent qu'après la stérilisation des milieux, soit au temps 0, les milieux à base de borate sont déjà plus acidifiés que ceux à base de tampon PBS 0,1M. Ainsi, les milieux à base de boues totales et de tampon borate sont très

acides au départ avec des pH inférieurs à 6,0 et même s'ils s'alcalinisent légèrement avec le temps, ils demeurent sous 7,0. Ces pH peuvent expliquer l'absence totale de protéases dans ces milieux. Le pH du milieu synthétique avec tampon borate reste quant à lui dans les valeurs optimales de production de protéinases mais la synthèse n'y est pas aussi forte que pour le milieu synthétique avec tampon phosphoré. Enfin, les milieux à base de boues totales et de tampon PBS 0,1M ont des pH qui s'acidifient légèrement après 24 heures mais qui remontent rapidement dans les valeurs optimales de production.

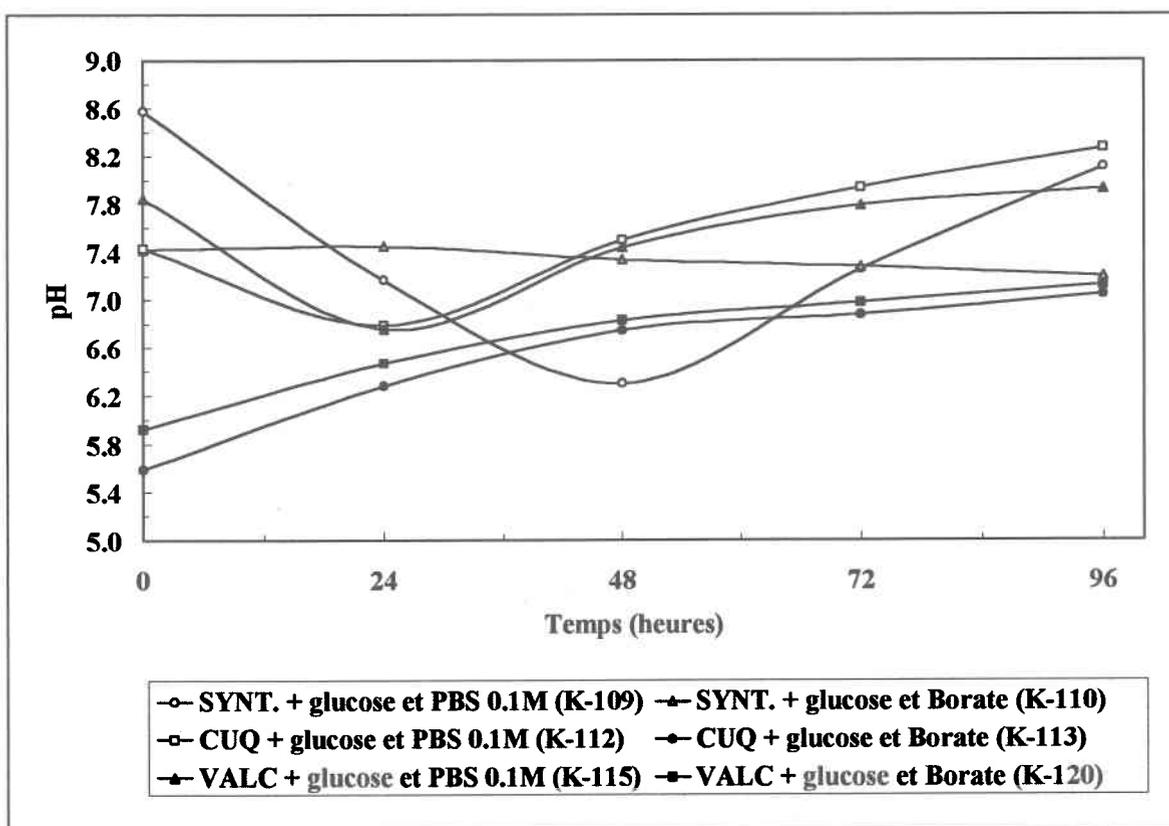


Figure 13 Variation du pH lors d'utilisation de divers tampons avec *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Quant à elle, la croissance des microorganismes (Figure 14) est similaire dans presque tous les milieux étudiés. En fait, celle-ci est légèrement inférieure pour le milieu synthétique avec tampon borate et plus lente dans celui à base de boues totales de Valcartier (tampon borate).

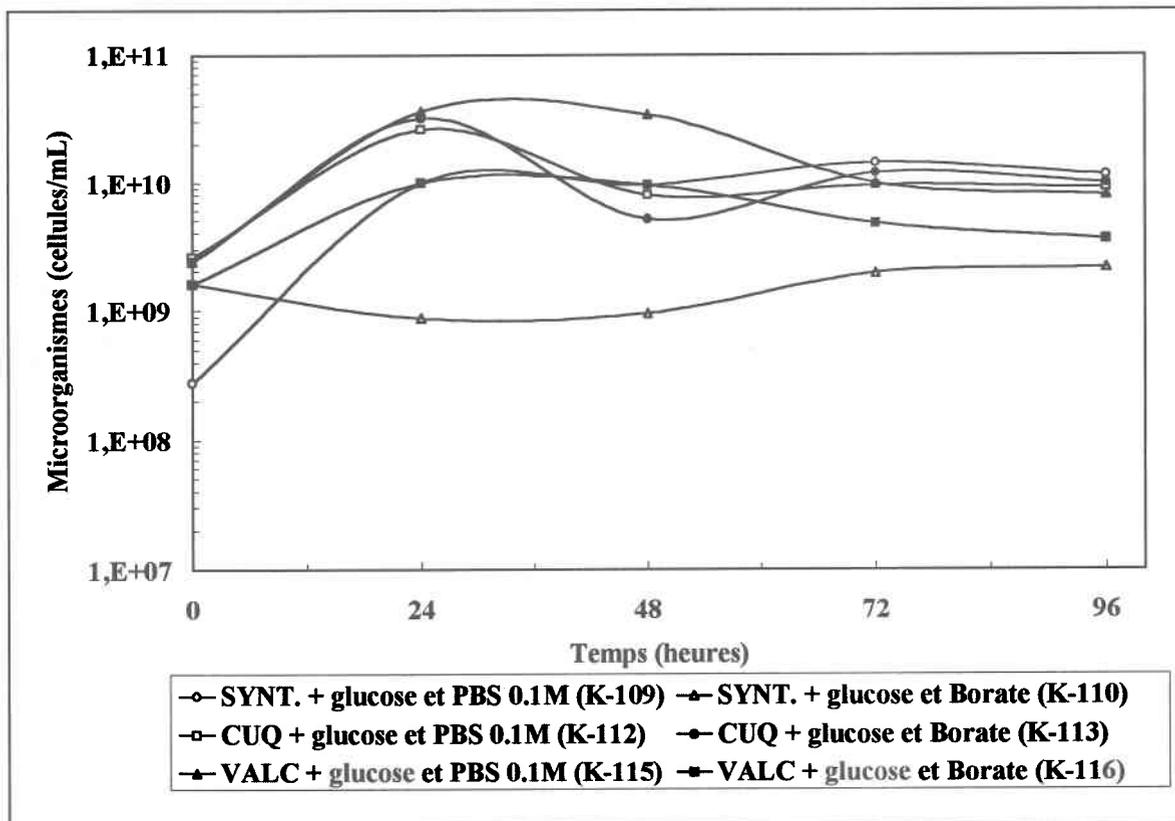


Figure 14 Croissance des microorganismes lors d'utilisation de divers tampons avec *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Enfin, la variation de la composition du milieu lors de l'utilisation de divers tampons est présentée au Tableau 39. Ces résultats montrent une plus faible teneur en azote total pour les milieux à base de boues totales, soit entre 0,1 et 2,1 % que les milieux synthétiques, entre 4,8 et 6,1 %. De même, les concentrations en azote ammoniacal sont aussi très faibles dans les milieux de boues avec des variations entre 10,2 et 119 mg/L. Quant à lui, le carbone total est en quantité la plus faible avec le milieu de boues totales de la CUQ (tampon PBS 0,1M) avec 20,7 % et celui de Valcartier (tampon PBS 0,1M) avec 18,3 %. Le carbone organique dissous est également plus faible dans ces deux milieux avec respectivement 2 798 et 2 022 mg/L. D'autre part, les teneurs en ortho-phosphates sont assez élevées dans les deux milieux synthétiques et dans les milieux de boues avec du tampon PBS 0,1M alors qu'elles sont faibles dans ceux avec le tampon borate.

Tableau 39 Variation de la composition du milieu lors de l'utilisation de divers tampons avec *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Paramètre	Synt. + glucose + PBS 0,1M (K-109)	Synt. + glucose + Borate (K-110)	CUQ + glucose + PBS 0,1M (K-112)	CUQ + glucose + Borate (K-113)	VALC + glucose + PBS 0,1M (K-115)	VALC + glucose + Borate (K-116)
Solides Totaux (g/L)	51,9	90,9	31,7	50,2	26,2	36,3
Solides Volatils (g/L)	30,9	43,2	14,0	17,5	10,1	12,3
Azote (% p/p)	4,8	6,1	1,7	0,9	2,1	1,1
Carbone (% p/p)	24,7	33,8	20,7	27,5	18,3	26,5
Soufre (% p/p)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Carbonique organique total (mg/L)	7 290	13 804	2 798	13 676	2 020	11 868
Azote ammoniacal (mg/L)	1 662	988	90,0	106	10,2	119
Ortho-phosphate (mg/L)	4 173	1 538	3 594	166	2 758	91,8

Par ailleurs, pour les milieux à base de surnageant de boues, la composition finale des milieux est présentée au Tableau 40. L'azote total est en quantité très faible dans les milieux avec le tampon PBS 0,1M, soit 0,5 % pour la CUQ et 0,4 % pour Valcartier, et nul dans ceux avec le tampon borate. Par contre, il y a plus d'azote ammoniacal dans les milieux avec tampon borate, soit pour la CUQ de 51,0 mg/L et pour Valcartier de 55,0 mg/L, alors qu'il y en a moins quand le tampon PBS est utilisé (respectivement 1,80 et 0,39 mg/L). Au niveau du carbone, le carbone total est presque le même d'un milieu à l'autre avec des variations entre 20,7 et 26,1 %. Par contre, on retrouve deux fois moins de carbone organique dissous dans le milieu surnageant boues CUQ avec tampon PBS (6 508 mg/L) qu'avec le tampon borate (13 346 mg/L) et 40 % de moins pour celui de Valcartier avec tampon PBS (8 816 mg/L) qu'avec le tampon borate (13 126 mg/L). Finalement, il y a très peu de phosphates solubles dans les milieux à base de surnageant de boues et de tampon borate avec respectivement

188 mg/L pour la CUQ et 335 mg/L pour Valcartier.

Tableau 40 Variation de la composition du milieu lors de l'utilisation de divers tampons avec *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Paramètre	Surn. CUQ + glucose + PBS 0,1M (K-117)	Surn. CUQ + glucose + Borate (K-118)	Surn. VALC + glucose + PBS 0,1M (K-119)	Surn. VALC + glucose + Borate (K-120)
Solides Totaux (g/L)	27,4	42,5	30,5	42,4
Solides Volatils (g/L)	12,7	13,4	16,0	12,8
Azote (% p/p)	0,5	0,0	0,4	0,0
Carbone (% p/p)	20,7	26,1	24,0	25,9
Soufre (% p/p)	0,0	0,0	0,0	0,0
Carbonique organique total (mg/L)	6 508	13 346	8 816	13 126
Azote ammoniacal (mg/L)	1,80	51,0	0,39	55,0
Ortho-phosphate (mg/L)	2 812	188	2 992	335

D'autre part, les Tableaux 41 et 42 présentent la variation des teneurs en métaux solubles selon les divers tampons ajoutés aux milieux de culture. Tel que vu précédemment, c'est dans les milieux à base de boues totales que les concentrations en métaux solubles sont les plus grandes. Néanmoins, encore une fois, le choix du tampon ne semble pas influencer sur ces teneurs finales en métaux solubles. Cependant, en raison de la variation des pH observée durant le déroulement des essais selon le type de tampon utilisé, il est possible qu'une libération accrue de métaux solubles se soient produite à un moment spécifique des essais. En fait, la variation du pH est le principal facteur qui influera la libération des métaux liés aux biosolides. Il est donc primordial de bien contrôler celui-ci afin de prévenir une trop grande solubilisation des métaux pouvant constituer des facteurs inhibants la reproduction cellulaire et conséquemment la production de protéases.

Tableau 41 Variation des teneurs en métaux solubles lors d'utilisation de divers tampons avec *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Paramètre (mg/L)	Synt. + glucose + PBS 0,1M (K-109)	Synt. + glucose + Borate (K-110)	CUQ + glucose + PBS 0,1M (K-112)	CUQ + glucose + Borate (K-113)	VALC + glucose + PBS 0,1M (K-115)	VALC + glucose + Borate (K-116)
Cd	0,06	0,04	0,07	0,03	0,04	0,03
Cr	0,10	0,09	0,52	0,15	0,10	0,11
Cu	0,05	0,30	2,34	1,05	1,48	2,32
Mn	0,11	0,14	1,51	0,34	0,38	0,42
Ni	0,85	0,60	0,33	0,50	0,22	0,13
Pb	1,10	1,05	0,87	0,57	0,47	0,35
Zn	3,20	2,40	5,39	1,70	1,64	1,10

Tableau 42 Variation des teneurs en métaux solubles lors d'utilisation de divers tampons avec *Bacillus licheniformis* ATCC 21424

Paramètre (mg/L)	Surn. CUQ + glucose + PBS 0,1M (K-117)	Surn. CUQ + glucose + Borate (K-118)	Surn. VALC + glucose + PBS 0,1M (K-119)	Surn. VALC + glucose + Borate (K-120)
Cd	0,04	0,03	0,04	0,03
Cr	0,09	0,11	0,10	0,12
Cu	0,15	0,05	0,05	0,05
Mn	0,28	0,23	0,21	0,20
Ni	0,21	0,45	0,55	0,45
Pb	0,46	0,52	0,66	0,54
Zn	1,05	1,05	1,50	1,05

Tableau 43 Variation des teneurs en métaux lors d'utilisation de divers tampons avec *Bacillus lichenformis* ATCC 21424

Paramètre (mg/Kg)	Synt. + glucose + PBS 0,1M (K-109)	Synt. + glucose + Borate (K-110)	CUQ + glucose + PBS 0,1M (K-112)	CUQ + glucose + Borate (K-113)	VALC + glucose + PBS 0,1M (K-115)	VALC + glucose + Borate (K-116)
Cd	0,58	0,22	0,63	0,80	1,15	0,83
Cr	5,01	2,64	14,8	9,57	11,1	8,27
Cu	4,82	2,97	32,8	21,1	102	84,7
Mn	8,67	5,72	21,7	18,3	80,3	48,0
Ni	5,59	2,75	6,30	4,19	7,65	6,07
Pb	11,4	5,39	22,7	13,8	23,7	17,9
Zn	17,5	12,0	69,3	48,2	48,2	45,2

Tableau 44 Variation des teneurs en métaux lors d'utilisation de divers tampons avec *Bacillus lichenformis* ATCC 21424

Paramètre (mg/Kg)	Surn. CUQ + glucose + PBS 0,1M (K-117)	Surn. CUQ + glucose + Borate (K-118)	Surn. VALC + glucose + PBS 0,1M (K-119)	Surn. VALC + glucose + Borate (K-120)
Cd	1,10	0,24	0,98	0,47
Cr	10,6	6,35	8,52	7,55
Cu	4,38	1,88	2,62	1,89
Mn	13,5	8,00	4,59	3,07
Ni	8,40	3,76	5,90	3,07
Pb	24,1	11,3	17,4	10,9
Zn	22,7	11,3	11,8	19,1

6 ÉVALUATION TECHNICO-ÉCONOMIQUE DE LA PRODUCTION DE PROTÉASES

Ce chapitre intègre les connaissances scientifiques et technologiques issues des divers travaux de recherche, de développement et d'évaluation technico-économique réalisés au cours des dernières années par la communauté scientifique et par l'industrie de la production de protéases. Ce chapitre a été conçu de manière à faciliter les démarches de développement, de transfert technologique et de mise en commerce de la technologie proposée de production de protéases alcalines.

Dans le but d'analyser l'intérêt économique de la production d'enzymes protéolytiques, un modèle simple de simulation informatique a été développé sur le logiciel Microsoft Excel version 7,0. Ce programme permet, une fois certains paramètres économiques et critères de design définis, d'évaluer de manière préliminaire la rentabilité d'une usine de fermentation pour l'obtention de protéases alcalines.

Le modèle a été élaboré en bonne partie à partir des informations techniques disponibles dans les brevets portant sur la production de ces protéases (Horikoshi et Ykeda, 1977 ; Fukumoto *et al.*, 1974 ; Murao, 1971 ; Viccaro, 1973). De plus, plusieurs documents de base en fermentation et génie chimique ont été consultés (Bailey et Ollis, 1986 ; Bartholomew et Reisman, 1979 ; Chauvel *et al.*, 1981 ; Crueger et Crueger, 1982 ; Datar et Rosen, 1990 ; Kalk et Langlykke, 1986 ; Perry *et al.*, 1984 ; Peters et Timmerhaus, 1980 ; Ulrich, 1984).

La première section de ce chapitre décrit sommairement les diverses variantes employées actuellement pour la production industrielle des protéases, ainsi que celle préconisée pour la technologie proposée de production de ces enzymes à partir de boues d'épuration. La deuxième section présente de manière détaillée les variables d'exploitation et de marché employées pour les diverses simulations. La troisième section expose les divers scénarios de simulation testés. La quatrième section regroupe l'ensemble des relations mathématiques utilisées pour établir les bilans massiques et volumiques des diverses étapes de production, alors que la cinquième fait état de l'ensemble des équations servant à déterminer la capacité des

divers équipements et infrastructures nécessaires. Les sixième et septième sections décrivent respectivement les formules mathématiques intégrées dans le modèle qui servent à déterminer les coûts en capitaux et les coûts de production inhérents aux projets considérés lors des simulations informatiques. La dernière section traite spécifiquement de l'analyse du flux monétaire effectuée par le modèle au terme de chaque simulation informatique. Cette section décrit l'ensemble des calculs effectués pour l'établissement d'un flux monétaire annuel réparti sur une durée d'exploitation de 10 années en tenant compte des revenus d'opération, des coûts d'opération, de l'imposition et des coûts en capitaux.

6,1 Description des procédés de production de protéases

La section suivante décrit les différentes étapes de production de protéases pour un procédé conventionnel de production de protéases alcalines (Brevet américain No 3 838 009 de Fukumoto *et al.*, 1974), ainsi que pour le procédé anticipé de production d'enzymes protéolytiques à partir de boues d'épuration. Pour les besoins de simplification, les initiales " CONV " ont été utilisées pour désigner le procédé conventionnel, alors que l'abréviation " BOUE " identifie le procédé de production de protéases à partir de boues. À moins d'avis contraire, les étapes de production des protéases sont similaires ; la principale différence entre les deux technologies réside dans l'utilisation de boues d'épuration en remplacement du milieu de culture synthétique.

6,1,1 Étape de fermentation

La Figure 15 présente un schéma simplifié des diverses étapes de procédé inhérentes à la production, à l'échelle industrielle, de protéases alcalines du type *Subtilisin Carlsberg*. Le procédé comprend, dans un premier temps, une étape de fermentation pour la production de *Subtilisin Carlsberg* à partir de culture de la bactérie *Bacillus licheniformis*.

Dans le cas du procédé CONV, le milieu de culture employé pour la croissance de *B. licheniformis* est composé des produits suivants (en pourcentage p/v) : 5 % d'extrait de farine de soya, 6 % de mélasse (contient 50 % de carbohydrates), 1 % de phosphate d'ammonium, 0,03 % de KCl et 0,02 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Dans le cas du procédé **BOUE**, le milieu de culture est constitué de boues d'épuration secondaires contenant approximativement 20 g/L de solides totaux, ainsi que de 6 % de mélasse. Les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave ou encore dans les fermenteurs avant d'être inoculés avec *B. licheniformis*.

L'inoculum primaire est préparé par incubation à 35°C durant 48 heures dans des fioles agitées. Les inoculums plus importants sont préparés à partir de l'inoculum primaire en ajoutant une proportion de 5 % (v/v) de la pré-culture précédente et en utilisant le même milieu de culture. Lors de l'étape de fermentation principale, laquelle est opérée en mode cuvée, le fermenteur est agité, aéré et maintenu à 37°C.

Après 20 heures d'incubation avec le procédé **CONV**, les protéases alcalines commencent à être produites et atteignent un maximum de 6,0 U.I./mL (basé sur les résultats des essais G-54 et G-58) après 48 heures. Dans le milieu de culture, une faible quantité d'amylase est retrouvée, de même qu'une très petite quantité d'hémicellulase avec les protéases alcalines. Cependant, il n'y a pas d'activités de protéases neutres ni de cellulase mesurées.

Pour ce qui est du procédé **BOUE**, les scénarios retenus pour les besoins des simulations correspondent à une production maximale de protéases alcalines de 6,0 U.I./mL (basé sur les résultats des essais G-59 et G-64), lesquelles seraient atteintes également après 48 heures de fermentation. De même, les simulations considèrent que l'activité spécifique et la pureté des enzymes sont équivalentes à celles des protéases produites avec le procédé **CONV**.

L'effet du rendement enzymatique (activité enzymatique dans le milieu de culture après fermentation) sur la rentabilité d'une usine de production de protéases utilisant le procédé **BOUE** sera également examiné dans le cadre de cette étude.

6,1,2 Étape de séparation de la biomasse

Il est prévu que la biomasse produite lors de la fermentation serait séparée du milieu de culture par centrifugation. Cette pratique devrait permettre l'obtention d'un concentré de biomasse ayant approximativement 50 % de solides, tout en conservant un taux de capture de l'ordre de 92 % des solides. Un apport de polymère organique est prévu pour la floculation de la

biomasse avant l'étape de déshydratation par centrifugation.

6,1,3 Étape d'extraction et de récupération des protéases

La chaîne d'extraction et de récupération des protéines est basée sur le procédé décrit par Kalk et Langlykke (1986). Cette chaîne a toutefois été modifiée de manière à éliminer les étapes de lyse cellulaire et d'élimination des acides nucléiques, puisque les procédés étudiés correspondent à une production de protéines extracellulaires.

La chaîne d'extraction et de récupération comprend d'abord deux étapes de fractionnement des protéines par ultrafiltration pour éliminer, dans un premier temps, les débris non enlevés par la centrifugation et les molécules de poids moléculaires élevés (> 300 000 P.M.) et, par la suite les particules de faibles poids moléculaires (<20 000 P.M.). Ces étapes permettent de concentrer par un facteur d'environ 20, les teneurs en protéines dans le milieu tout en réduisant d'autant le volume de solution à traiter.

Après ultrafiltration, les protéines sont extraites dans un circuit de précipitation à froid avec de l'éthanol 95 %. Le circuit comprend par la suite des étapes de purification avec deux systèmes de résines échangeuses d'ions et un système de chromatographie sur gel. Les protéines subissent finalement une dernière étape de concentration (facteur d'environ 30) avec le système d'ultrafiltration (<20 000 P.M.) décrit précédemment, puis la solution finale est filtrée stérilement et embouteillée.

Le taux de récupération final basé sur la quantité d'unités enzymatiques par rapport à celle du bouillon de culture après fermentation se situe entre 80 et 95 %. L'éthanol est recyclé par distillation pour des étapes ultérieures de précipitation des protéines enzymatiques.

6,1,4 Étape de gestion de la biomasse

La biomasse générée lors de la fermentation est transportée et enfouie, ou encore est recyclée à d'autres fins. L'effluent final est retourné dans le réseau de traitement des eaux usées municipales.

Tableau 45 Paramètres d'exploitation de base

Variabes	Unités	Code	Valeurs
Période d'opération	jrs/an	FJOA	350
Capacité de production d'unités enzymatiques	M.U.I./an	FCAJ	55 000
			165 000
			555 000
Facteur d'efficacité d'opération	%	FEFF	90
Activité enzymatique du milieu de culture après fermentation	U.I./mL	FCOP	6,0
Activité spécifique des protéases	U.I./mg	FASP	1,10

Tableau 46 Paramètres de marché

Variabes	Unités	Code	Valeurs
Taux d'inflation annuel	%	FINF	2
Taux d'intérêt annuel	%	FINT	8
Taux d'escompte annuel	%	FTES	10
Imposition sur le revenu	%	FIMP	30
Crédit d'impôt de R&D	%	FCIM	60
Taux d'échange	\$US/\$Can	FTAC	1,50
Augmentation annuelle du prix des protéases	%	FPRI	2
Indice - Marshall and Swift Equipment	-	MSECI	1061,8

Tableau 47 Paramètres de capitalisation

Variables	Unités	Code	Valeurs
Frais d'installation et isolation des équipements	% équip. livrés	FIIE	47
Frais d'instrumentation et de contrôle	% équip. livrés	FICE	18
Frais de conduites et tuyauterie	% équip. livrés	FCTY	66
Frais du système électrique	% équip. livrés	FSEL	11
Frais des bâtiments de procédés et services	% équip. livrés	FBPS	18
Frais d'aménagement du terrain	% équip. livrés	FATE	10
Frais de facilités et services	% équip. livrés	FFSE	70
Frais d'acquisition du terrain	% équip. livrés	FACT	6
Frais d'ingénierie et supervision	% équip. livrés	FDIN	33
Frais de dépenses de construction	% équip. livrés	FDCO	41
Frais de gestion de la construction	% capital	FGCO	5
Frais contingents	% capital	FCON	10
Période d'amortissement	années	FAMO	10
Durée de vie moyenne des équipements	années	FVIE	20
Fonds de roulement	mois d'opération	FROP	3
Gestion de l'inventaire	mois d'opération	FGIN	3

Tableau 48 Paramètres d'opération

Variables	Unités	Code	Valeurs
Coût unitaire de la vapeur	\$Can/kg	FVAP	0,015
Coût unitaire de l'électricité	\$Can/kWh	FCUE	0,050
Coût unitaire de l'eau de procédé	\$Can/m ³	FEAU	0,50
Coût unitaire du gaz	\$Can/m ³	FGAZ	0,09
Coût unitaire de transport des boues	\$Can/m ³	FTRA	6
Coût unitaire d'enfouissement	\$Can/m ³	FENF	30
Coût unitaire de la main-d'œuvre	\$Can/h	FTMO	20,5
Frais de supervision et main-d'œuvre de bureau	% M.O. opér.	FSUB	15
Frais d'entretien et de réparation	% capital	FMAI	6
Frais des matériaux courants	% entr. et répar.	FMCO	15
Frais de laboratoire	% M.O. opér.	FLAB	15
Taxes	% capital	FTAX	1,5
Assurances	% capital	FASS	0,5
Dépenses générales	% M.O.	FDEG	60
Administration	% M.O.	FADM	15
Distribution et ventes	% coût dir./indir.	FDVE	10
Recherche et développement	% coût dir./indir.	FRDE	5
Royautés	\$Can/t.m.	FCUR	0

Tableau 49 Consommation de matériaux bruts (produits chimiques)

Variabes	Unités	Code	Valeurs
Farine de soya	kg/m ³	FCDA	50,0
Mélasse	kg/m ³	FCDB	60,0
Phosphate d'ammonium	kg/m ³	FCDC	10,0
Sulfate de magnésium	kg/m ³	FCDD	0,20
Chlorure de potassium	kg/m ³	FCDK	0,30
Antimousse A	L/m ³	FCDL	0,50

Tableau 50 Coût unitaire des matériaux bruts (produits chimiques)

Variabes	Unités	Code	Valeurs
Farine de soya	\$Can/kg	FCPA	0,41
Mélasse	\$Can/kg	FCPB	0,20
Phosphate d'ammonium	\$Can/kg	FCPC	7,20
Sulfate de magnésium	\$Can/kg	FCPD	1,87
Chlorure de potassium	\$Can/kg	FCPK	8,00
Antimousse A	\$Can/L	FCPL	28,77

Tableau 51 Critères de design pour les diverses étapes de production

Variables	Unités	Code	Valeurs
Temps de rétention hydraulique de la fermentation	jours	FTRH	2,0
Temps entre les périodes de fermentation	jours	FDCF	0,25
Solides totaux après fermentation	kg/m ³	FSOL	30
Solides totaux de la biomasse déshydratée	%	FSTB	50,0
Taux de capture lors de la déshydratation	%	FTCD	92,0
Taux de récupération des protéases	%	FRPR	80,0

6,3 Description des scénarios de simulation

Dans le cadre de cette étude, l'évaluation de l'intérêt technico-économique de la production des protéases a été réalisée à partir d'une série de six scénarios de simulation, soit trois simulations pour chacun des deux procédés (**CONV** et **BOUE**). Ces scénarios tiennent compte de trois capacités de production de l'usine, soit 55 000 M.U.I./an, 165 000 M.U.I./an et 550 000 M.U.I./an. L'ensemble des autres variables de simulation ont été gardées constantes avec les valeurs décrites à la section précédente. Le Tableau 52 décrit les six scénarios de simulation analysés. Le scénario de référence qui servira d'exemple dans les prochaines sections correspond au scénario **CONV-B**, soit une capacité de production de 165 000 M.U.I./an avec un rendement de production de 6,0 unités internationales par millilitre de milieu de culture après fermentation.

En considérant les capacités de production mentionnées ci-dessus et une activité spécifique des protéases de 1,10 unités internationales par milligramme d'enzyme, les capacités de production exprimées en terme de masse de protéases produites correspondent à 50 000 kg/an, 150 000 kg/an et 500 000 kg/an. La production actuelle mondiale de protéases pouvant être estimée à environ 3 000 t.m., ces capacités de production représentent respectivement 1,7, 5,0 et 16,7 % de la production réalisée à travers le monde.

6,4 Bilans massiques et volumiques

Une fois les variables de simulation définies, le modèle établit les bilans massiques et volumiques de chaque étape de production des protéases. Le Tableau 53 fait état des divers éléments qui sont pris en compte dans le calcul des bilans massiques et volumiques. Les valeurs obtenues pour le scénario de référence (CONV-B) sont également présentées.

Tableau 52 Description des scénarios de simulation employés pour l'analyse technico-économique de la production de protéases

Scénarios	Capacité de production (M.U.L/an)	Capacité de production (kg protéases/an)
CONV-A	55 000	50 000
CONV-B	165 000	150 000
CONV-C	550 000	500 000
BOUE-A	55 000	50 000
BOUE-B	165 000	150 000
BOUE-C	550 000	500 000

Tableau 53 Bilan massique et volumique des diverses étapes pour le scénario de référence de production de protéases

Variables	Unités	Code	Valeurs
<i>Fermentation</i>			
Culture - 1 ^{er} ferm. Ensemencement	m ³ /jr	QVMD	0,273
Culture - 2 ^e ferm. Ensemencement	m ³ /jr	QVME	5,456
Culture - fermenteurs de production	m ³ /jr	QVMC	109,1
<i>Séparation de la biomasse</i>			
Biomasse déshydratée	m ³ /jr	QSSA	60,24
Filtrat de déshydratation	m ³ /jr	QSSB	48,89

Les relations mathématiques employées pour la détermination du bilan volumique des diverses étapes de production des protéases sont décrites ci-dessous.

6,4,1 Étape de fermentation

$$QVMD = 10\ 000 \times FCAJ \times 0,0025 / (FJOA \times FCOP \times FEFF \times FRPR)$$

$$QVME = 10\ 000 \times FCAJ \times 0,05 / (FJOA \times FCOP \times FEFF \times FRPR)$$

$$QVMC = 10\ 000 \times FCAJ / (FJOA \times FCOP \times FEFF \times FRPR)$$

6,4,2 Séparation de la biomasse

$$QSSA = QVMC \times FSOL \times FTCD / (FSTB \times 100)$$

$$QSSB = QVMC - QSSA$$

6,5 Dimensionnement des équipements

Le Tableau 54 présente les divers calculs effectués pour le dimensionnement et la détermination de la capacité des principaux équipements impliqués dans la chaîne de production des protéases, laquelle comprend les étapes de **fermentation**, de **séparation de la biomasse** et d'**extraction et de récupération des protéases**.

Tableau 54 Dimensionnement des principaux équipements pour le scénario de référence de production de protéases

Équipements	Calcul	Nombre	Capacité totale
<i>Fermentation</i>			
Unités de fermentation - inoc. primaire (QVFF)	$QVMD \times (FTRH + FDCF) \times 1,2$	2	0,74 m ³
Unités de fermentation - inoc. secondaire (QVFE)	$QVME \times (FTRH + FDCF) \times 1,2$	2	14,7 m ³
Unités de fermentation - production (QVUF)	$QVMC \times (FTRH + FDCF) \times 1,2$	2	295 m ³
<i>Séparation de la biomasse</i>			
Unités de centrifugation (QSSC)	$2 \times 1\,000 \times QVMC / 8$	2	27 282 L/h
<i>Extraction et récupération</i>			
Circuit d'extraction et récupération (QTTA)	QSSB	1	48,9 m ³ /jr

6,6 Coûts en capitaux

Pour l'établissement du flux monétaire, les coûts en capitaux du projet d'exploitation étudié sont calculés en tenant compte de l'**investissement total**, de la **valeur résiduelle des équipements** au terme du projet, de la **dotation à l'amortissement**, de la **gestion de l'inventaire** et du **fonds de roulement** d'exploitation. La présente section présente donc l'ensemble des relations mathématiques utilisées pour l'estimation de l'investissement total requis pour la réalisation du projet. L'investissement total, appelé aussi coûts fixes en capitaux, comprend le montant d'investissement de base (**coûts directs**), les frais d'ingénierie et de supervision ainsi que les dépenses de construction (**coûts indirects**), de même que les **frais de gestion de construction** et les **frais contingents**.

6,6,1 Coûts directs

Les coûts directs en capitaux comprennent les dépenses liées à l'**acquisition et l'installation des équipements** (achat et transport, installation et isolation, instrumentation et contrôle, conduites et tuyauterie, système électrique), des **bâtiments de procédés et services**, l'**acquisition et l'aménagement du terrain**, ainsi que les **facilités et services**.

Dans le cadre d'une évaluation préliminaire, il est fréquent d'estimer les coûts en capitaux à partir du concept des facteurs de Lang (Kalk et Langlykke, 1986). Le point de départ de tous les estimés par cette technique est la préparation de la liste de tous les équipements majeurs requis incluant leur coût d'achat et de transport. Les coûts d'acquisition (achat et transport) des principaux équipements requis ont été établis à partir de différentes sources et ont été modélisés, de manière à pouvoir être estimés, par rapport à diverses conditions d'exploitation de l'usine de production des protéases. Les lignes suivantes décrivent les relations mathématiques et les sources d'informations employées pour le calcul des coûts d'acquisition des principaux équipements, alors que le Tableau 55 montre l'estimation de ces coûts pour les équipements requis pour le scénario de référence (CONV-B).

6,6,1,1 *Fermentation*

Le coût des fermenteurs est basé sur le graphique du coût d'achat en fonction du volume total des réacteurs présenté dans le document préparé par Kalk et Langlykke (1986). Le coût d'achat a été augmenté de 5 % pour tenir compte des frais de transport. Les coûts ont aussi été transformés en dollars canadiens (taux de change de 1,50 \$Can/\$US), puis actualisés à l'aide de l'indice *Marshall & Swift Equipment* (MSECI). La valeur de l'indice était de 797,6 en 1986 et de 1061,8 au second trimestre 1998. La relation mathématique suivante a donc été employée pour déterminer le coût d'acquisition de chaque fermenteur :

$$\text{FERM} = (\text{MSECI}_f / \text{MSECI}_i) \times 144\,941 \times \text{CAP}^{0,3153}$$

FERM : Coût d'acquisition de chaque fermenteur (\$Can)

CAP : Capacité des fermenteurs (m³)

Le coût des équipements afférents au procédé de fermentation (pompes, générateur de vapeur, etc.) a été estimé comme étant égal à 33 % du coût des fermenteurs (Datar et Rosen, 1990).

6,6,1,2 *Séparation de la biomasse*

Le coût des centrifugeuses est basé sur le graphique du coût d'achat en fonction de la capacité des centrifugeuses (L/h) présenté dans le document préparé par Kalk et Langlykke (1986). Le

coût d'achat a été augmenté de 5 % pour tenir compte des frais de transport. Les coûts ont aussi été transformés en dollars canadiens (taux de change de 1,50 \$Can/\$US) et actualisés à l'aide de l'indice *Marshall & Swift Equipment*. La valeur de l'indice était de 789,6 en 1985. Un coefficient d'ajustement (facteur multiplicatif) de 3,4 a été appliqué pour tenir compte de l'acquisition de centrifugeuses construites en acier inoxydable (Ulrich, 1984). La relation mathématique décrite ci-dessous a été utilisée pour déterminer le coût d'acquisition de chaque unité de centrifugation :

$$\text{CENT} = (\text{MSECI}_f / \text{MSECI}_i) \times 276,97 \times \text{CAP}^{0,7419}$$

CENT : Coût d'acquisition de chaque centrifugeuse (\$Can)

CAP : Capacité de la centrifugeuse (L/h)

6,6,1,3 *Extraction et récupération*

De même, le coût du système d'extraction et de récupération des protéases a été estimé à partir de la même source d'information. Le système comprend deux unités d'ultrafiltration (>300 000 P.M. et <20 000 P.M.), le circuit de précipitation à l'éthanol (trois cuves agitées en acier inoxydable, isolées et refroidies, une centrifugeuse pour la séparation des protéines, un réservoir en acier inoxydable, isolé et refroidi pour conserver l'éthanol 95 %, une unité de distillation pour l'éthanol), deux systèmes de résines échangeuses d'ions, un système de chromatographie sur gel et un système de filtration stérile et d'embouteillage. La relation présentée ci-dessous a été employée pour estimer le coût du système d'extraction et de récupération des protéases.

Le coût d'achat est basé sur un circuit d'extraction et de purification de protéines présenté par Kalk et Langlykke (1986). Le coût de ce circuit d'une capacité de traitement de 27,9 m³/jr est de 1 766 000 \$US (1986). Ce prix a été augmenté de 5 % pour tenir compte des frais de transport. Les coûts ont aussi été transformés en dollars canadiens (taux de change de 1,50 \$Can/\$US) et actualisés à l'aide de l'indice *Marshall & Swift Equipment*. La valeur de l'indice était de 797,6 en 1986. La relation mathématique suivante a donc été employée pour déterminer le coût d'acquisition du circuit pour différentes capacités de traitement :

$$\text{EXTR} = (\text{MSECI}_f / \text{MSECI}_i) \times 243\,559 \times \text{CAP}^{0,700}$$

EXTR : Coût d'acquisition des unités d'extraction et de récupération
(\$Can)

CAP : Capacité de l'unité d'extraction (m³/jr)

Tableau 55 Coût d'acquisition des principaux équipements associés au scénario de référence (CONV-B) de production de protéases

Items	Coût (\$Can)
<i>Fermentation</i>	
Unités de fermentation - inoculum primaire	281 646
Unités de fermentation - inoculum secondaire	724 300
Unités de fermentation - production	1 862 658
Équipements afférents	946 639
<i>Séparation de la biomasse</i>	
Unités de centrifugation	870 438
<i>Extraction et récupération</i>	
Unités d'extraction et de récupération	4 935 247
Total du coût d'acquisition des équipements	9 620 927

Tableau 56 Répartition des facteurs de Lang pour une usine à procédé liquide

Items	% du coût des équipements livrés
Achat et transport des équipements	100
Installation des équipements	47
Instrumentation et contrôle	18
Conduites et tuyauterie	66
Système électrique	11
Bâtiments (inclant les services et l'administration)	18
Aménagement du terrain	10
Facilités et service	70
Achat du terrain	6
Total du coût d'investissement de base	346

La portion des coûts associés aux bâtiments inclut les dépenses reliées à la conception des bâtiments de procédés (fondations, infrastructures, plateformes, escaliers, ascenseurs, voies d'accès, etc.), des bâtiments auxiliaires (administration et bureaux, local de premiers soins, cafétéria, garage, entrepôts de produits et de pièces, sécurité, station de feu, bureau des achats, locaux du personnel, laboratoires de recherche et de contrôle, etc.), des locaux d'entretien (électricité, plomberie, soudure, menuiserie, instruments et machines, etc.), ainsi que des bâtiments de service (chauffage, ventilation, collection de poussière, air conditionné, éclairage, téléphones et communications, peintures, systèmes d'alarme et de feu, etc.).

Le coût d'aménagement du terrain comprend le déboisement et le nivellement du site, la construction des routes, l'aire de stationnement et les voies piétonnières, la mise en place des clôtures, l'élaboration des lieux de récréation, ainsi que l'aménagement paysager.

L'item facilités et services regroupe l'ensemble des coûts associés à la mise en place des équipements et des infrastructures pour les diverses utilités (vapeur, eau de procédé, énergie électrique, réfrigération, air comprimé, carburants, gestion des déchets) et facilités (incinérateur, puits, approvisionnement en eau, tours de refroidissement, stockage de l'eau, protection environnementale, protection contre le feu, etc.), les équipements hors procédés (mobilier et fournitures de bureau, cafétéria, sécurité et médical, matériels d'entretien intérieur et extérieur, laboratoire, vestiaires et lockers, garage, station de chargement, extincteurs, etc.) et de distribution et emballage des produits (équipements de stockage et de manutention des produits bruts et finis, équipements d'emballage et de mélange, etc.).

Les facteurs de Lang décrit précédemment (Tableau 56) ont été utilisés pour l'estimation des coûts fixes directs de capitalisation. Le Tableau 57 montre la répartition des coûts en capitaux prévus pour les divers scénarios d'exploitation. Des coûts fixes en capitaux de 25,9, 46,5 et 92,6 millions \$Can (M\$Can) sont respectivement estimés pour des usines produisant 55 000, 155 000 et 550 000 M.U.I./an. De même, il faut noter que les coûts fixes en capitaux sont similaires pour les deux procédés étudiés dans les conditions de simulation testées.

Tableau 57 Coûts en capitaux (\$Can) pour les scénarios d'exploitation des procédés CONV et BOUE

Items	CONV-A et BOUE-A	CONV-B et BOUE-B	CONV-C et BOUE-C
<i>Coûts directs</i>			
Équipements			
<i>Achat et transport des équipements</i>	5 370 844	9 620 927	19 166 969
<i>Installation et isolation des équipements</i>	2 524 297	4 521 836	9 008 475
<i>Instrumentation et contrôle</i>	966 752	1 731 767	3 450 054
<i>Conduites et tuyauterie</i>	3 544 757	6 349 812	12 650 200
<i>Système électrique</i>	590 793	1 058 302	2 108 367
Bâtiments de procédés et services	966 752	1 731 767	3 450 054
Aménagement du terrain	537 084	962 093	1 916 697
Facilités et services	3 759 591	6 734 649	13 416 878
Acquisition du terrain	322 251	577 256	1 150 018
Total des coûts directs	18 583 120	33 288 408	66 317 713
<i>Coûts indirects</i>			
Ingénierie et supervision	1 772 378	3 174 906	6 325 100
Dépenses de construction	2 202 046	3 944 580	7 858 457
Total des coûts indirects	3 974 424	7 119 486	14 183 357
Frais de gestion de construction	1 127 877	2 020 395	4 025 063
Frais contingents	2 255 754	4 040 789	8 050 127
Grand Total	25 941 176	46 469 078	92 576 460

6,6,2 Coûts indirects

Les coûts indirects des coûts en capitaux comprennent les frais associés à l'**ingénierie et la supervision** des travaux, ainsi que les **dépenses de construction**. Ces deux éléments sont estimés à l'aide d'un facteur multiplicatif appliqué sur le coût total d'acquisition des équipements.

Les coûts d'ingénierie et de supervision comprennent les frais administratifs d'ingénierie, les coûts d'ingénierie de procédés et de design, les frais d'architecture, de communications, de reproduction, les frais de consultations externes, les frais de voyages et représentation, ainsi que les coûts de supervision et d'inspection.

D'autre part, les dépenses de construction tiennent compte des coûts de construction, d'opération et d'entretien des facilités temporaires, des bureaux, des routes, des aires de stationnement, du système électrique d'appoint, de communications et d'installation temporaire de clotûres. De plus, cet item comptable prend en considération le coût des outils et équipements de construction, les frais de supervision de la construction, les frais d'achat et d'expédition, les frais de sécurité et médical, le personnel et les frais d'entretien, les bénéfices marginaux, les coûts des permis et licences, ainsi que les taxes et assurances de chantier.

Pour les besoins de cette étude, un facteur de 33 % à été utilisé pour les frais d'ingénierie et de supervision et un de 41 % pour les dépenses de construction. Ils correspondent aux facteurs de Lang employés couramment pour estimer ces deux éléments économiques dans le cas d'une usine de production à procédé liquide (Kalk et Langlykke, 1986).

6,6,3 Frais de gestion de construction et frais contingents

Les autres items comptables à considérer pour l'établissement des coûts en capitaux comprennent les **honoraires de gestion de construction**, ainsi que les **frais contingents**. Il faut noter que les autres éléments comptables (fonds de roulement, valeur résiduelle des équipements, gestion de l'inventaire et dotation à l'amortissement) sont pris en considération lors de la préparation du flux monétaire d'exploitation de l'usine.

Les honoraires de gestion de la construction et les frais contingents sont estimés à l'aide de facteurs multiplicatifs appliqués sur la somme des coûts en capitaux directs et indirects. Un facteur de 5 % a été utilisé dans le cas des honoraires de gestion de la construction, alors qu'un facteur de 10 % a été employé pour l'estimation des frais contingents. Encore une fois, ces facteurs d'estimation correspondent aux facteurs de Lang utilisés régulièrement dans le cas d'une usine de production à procédé liquide (Kalk et Langlykke, 1986).

6,7 Coûts de production

L'évaluation des coûts de production comprennent les **coûts directs** d'exploitation, les **coûts indirects**, les **coûts généraux**, les **frais de financement** (intérêt sur le capital investi), l'**amortissement** sur le capital et les **royautés**. Les sections suivantes décrivent de façon détaillée les formules mathématiques utilisées pour l'estimation de ces coûts.

6,7,1 Coûts directs

Les coûts directs d'opération incluent l'ensemble des frais et dépenses liés de manière étroite à la production des protéases à l'usine, soit les coûts de **matériaux bruts** (produits chimiques), la **main-d'œuvre d'opération**, la **main-d'œuvre de supervision et de bureau**, les **utilités** (vapeur, électricité, eau de procédé, disposition des déchets), l'**entretien et la réparation** des installations et des équipements, les **matériaux courants**, ainsi que les **frais de laboratoire**.

Les Tableaux 58 et 59 montrent la répartition des coûts directs d'opération et des autres coûts de production prévus pour les divers scénarios d'exploitation. Au niveau du bilan du flux monétaire, les coûts directs annuels d'opération calculés par le modèle sont indexés par rapport au taux d'inflation annuel (%) défini par l'analyste.

Tableau 58 Coûts de production (\$Can/an) pour les scénarios d'exploitation du procédé CONV

Items	CONV-A	CONV-B	CONV-C
<i>Coûts directs</i>			
Matériaux bruts (produits chimiques)	1 394 009	4 182 028	13 940 094
Main-d'œuvre d'opération	1 388 146	1 930 063	2 769 715
Supervision et main-d'œuvre de bureau	208 222	289 509	415 457
Utilités			
<i>Vapeur</i>	116 576	349 728	1 165 759
<i>Électricité</i>	76 720	230 161	767 202
<i>Eau de procédé</i>	8 911	26 733	89 109
<i>Disposition de la biomasse</i>	253 000	759 000	2 530 000
Entretien et réparation	1 556 471	2 788 145	5 554 588
Matériaux courants	233 471	418 222	833 188
Frais de laboratoire	208 222	289 509	415 457
Total des coûts directs	5 443 747	11 263 098	28 480 570
<i>Coûts indirects</i>			
Taxes	389 118	697 036	1 388 647
Assurances	129 706	232 345	462 882
Dépenses générales	1 891 703	3 004 630	5 243 856
Total des coûts indirects	2 410 527	3 934 012	7 095 385
<i>Coûts généraux</i>			
Administration	472 926	751 158	1 310 964
Distribution et ventes	785 427	1 519 711	3 557 595
Recherche et développement	392 714	759 855	1 778 798
Total des coûts généraux	1 651 067	3 030 724	6 647 357
Financement	2 075 294	3 717 526	7 406 117
Amortissement	2 594 118	4 646 908	9 257 646
Royautés	0	0	0
Grand Total	14 174 752	26 592 268	58 887 075

Tableau 59 Coûts de production (\$Can/an) pour les scénarios d'exploitation du procédé BOUE

Items	BOUE-A	BOUE-B	BOUE-C
<i>Coûts directs</i>			
Matériaux bruts (produits chimiques)	302 328	906 984	3 023 281
Main-d'œuvre d'opération	1 388 146	1 930 063	2 769 715
Supervision et main-d'œuvre de bureau	208 222	289 509	415 457
Utilités			
<i>Vapeur</i>	116 576	349 728	1 165 759
<i>Électricité</i>	76 720	230 161	767 202
<i>Eau de procédé</i>	8 911	26 733	89 109
<i>Disposition des déchets</i>	253 000	759 000	2 530 000
Entretien et réparation	1 556 471	2 788 145	5 554 588
Matériaux courants	233 471	418 222	833 188
Frais de laboratoire	208 222	289 509	415 457
Total des coûts directs	4 352 066	7 988 054	17 563 757
<i>Coûts indirects</i>			
Taxes	389 118	697 036	1 388 647
Assurances	129 706	232 345	462 882
Dépenses générales	1 891 703	3 004 630	5 243 856
Total des coûts indirects	2 410 527	3 934 012	7 095 385
<i>Coûts généraux</i>			
Administration	472 926	751 158	1 310 964
Distribution et ventes	785 427	1 519 711	3 557 595
Recherche et développement	392 714	759 855	1 778 798
Total des coûts généraux	1 651 067	3 030 724	6 647 357
Financement	2 075 294	3 717 526	7 406 117
Amortissement	2 594 118	4 646 908	9 257 646
Royautés	0	0	0
Grand Total	13 083 071	23 317 223	47 970 263

6,7,1,1 Matériaux bruts (produits chimiques)

La consommation de produits chimiques nécessaires à l'opération du procédé CONV de fermentation constitue une fraction notable du coût de production. Le Tableau 60 regroupe les consommations et coûts en produits chimiques prévus pour le scénario de référence (CONV-B). Pour le procédé BOUE, les coûts en produits chimiques sont restreints à l'utilisation de la mélasse et de l'antimousse.

Tableau 60 Consommation et coûts des produits chimiques pour le scénario de référence (CONV-B) de production de protéases

Produits chimiques	Consommation (kg/jr)	Coût unitaire (\$Can/kg)	Coût (\$Can/an)
Farine de soya	4 910	0,410	704 688
Mélasse	5 893	0,200	412 500
Phosphate d'ammonium	982,1	7,200	2 475 000
Sulfate de magnésium	19,64	1,870	12 856
Polymères	0	5,00	0
Chlorure de potassium	29,46	8,000	82 500
Antimousse A	49,11	29,770	494 484
Grand Total	11 883	60,26	4 182 028

6,7,1,2 Main-d'œuvre d'opération

La main-d'œuvre nécessaire à l'opération du procédé de fermentation a été évaluée dans un premier temps pour le cas du scénario de référence (Tableau 61), soit pour une capacité de production de 155 000 M.U.I./an. Afin d'être en mesure d'estimer les besoins en main-d'œuvre d'opération pour les autres cas étudiés, les valeurs retenues de chaque étape de production sont ajustées selon la formule décrite ci-dessous.

$$MO = A \times (CAP/1,0 \times 10^8)^{0,300}$$

MO : Besoins en main-d'œuvre d'opération pour une capacité donnée (hrs/jr)

A : Besoins en main-d'œuvre d'opération pour une capacité de 155 000 M.U.I./an (hrs/jr)

CAP : Capacité de production des protéases (M.U./an)

Tableau 61 Besoins et coûts de la main-d'œuvre d'opération pour le scénario de référence (CONV-B) de production de protéases

Items	Besoins (hrs/jr)	Coût (\$Can/an)
<i>Opération</i>		
Fermentation	98	701 841
Séparation de la biomasse	49	350 921
Extraction et récupération	122	877 301
Grand Total	269	1 930 063

6,7,1,3 *Supervision et main-d'œuvre de bureau*

Les coûts inhérents à la supervision et main-d'œuvre de bureau sont estimés par rapport aux coûts imputables à la main-d'œuvre d'opération. Ainsi, dans le présent cas, un facteur multiplicatif de 15 % est appliqué au coût de la main-d'œuvre d'opération pour obtenir cet estimé. Ce facteur correspond aux valeurs habituellement employées pour ce genre d'évaluation (Peters et Timmerhaus, 1980 ; Ulrich, 1984).

6,7,1,4 *Utilités*

Les utilités pris en compte dans l'évaluation sont la vapeur, l'électricité, l'eau de procédé, ainsi que l'élimination des déchets de production. Le Tableau 62 fait état des consommations ou production, ainsi que des coûts de ces items pour le cas du scénario de référence.

Le coût unitaire de la vapeur, soit 0,015 \$Can/kg, est basé sur une production à partir de gaz naturel, selon les informations fournies dans le document préparé par Kalk et Langlykke (1986). Cette même source a d'ailleurs été utilisée pour le choix du coût de l'eau de procédé obtenu du réseau municipal, lequel a été fixé à 0,50 \$Can/m³.

La consommation de vapeur a été approximée à partir de l'exemple de fermentation proposée par Bailey et Ollis (1986). Ainsi, la quantité de vapeur est établie par rapport à la charge hydraulique appliquée aux fermenteurs de production (débit volumique de la culture), selon la relation mathématique suivante :

$$\text{VAP} = \text{QVMC} \times 610,43$$

VAP : Consommation de vapeur nécessaire (kg/jr)

QVMC : Charge hydraulique totale appliquée aux fermenteurs de production (m³/jr)

L'exemple de fermentation décrit par Bailey et Ollis (1986) a également été employé pour évaluer les besoins en énergie électrique. Encore une fois, la consommation énergétique a été estimée par rapport à la charge hydraulique appliquée aux fermenteurs de production. La relation suivante est utilisée pour obtenir la consommation énergétique :

$$\text{CE} = \text{QVMC} \times 120,52$$

CE : Consommation électrique (kWh/jr)

QVMC : Charge hydraulique totale appliquée aux fermenteurs de production (m³/jr)

De la même manière, la consommation d'eau de procédé a été estimée par rapport à la charge hydraulique totale des fermenteurs d'ensemencement et de production. Un facteur multiplicatif de sécurité de 1,33 a été appliqué à la charge hydraulique totale des fermenteurs.

Les coûts des autres utilités, soit ceux inhérents à la disposition des déchets de production, sont calculés par rapport aux volumes de déchets produits déterminés au niveau du bilan massique et volumique, multipliés par le coût unitaire de transport et incinération de ces matières.

Tableau 62 Description des coûts des utilités pour le scénario de référence (CONV-B) de production de protéases

Items	Consommation ou production	Coût unitaire (\$Can/kg, kWh ou m ³)	Coût (\$Can/an)
Vapeur (kg/jr)		0,015	349 728
Électricité (kWh/jr)		0,050	230 161
Eau de procédé (m ³ /jr)		0,500	26 733
Transport de la biomasse (m ³ /jr)		6,00	126 500
Enfouissement de la biomasse (m ³ /jr)		30,00	632 500
Grand Total	-	-	1 365 622

6,7,1,5 *Entretien et réparation*

Les coûts d'entretien et de réparation sont déterminés par rapport aux coûts fixes en capitaux discutés précédemment. Dans cette étude, un facteur multiplicatif de 6 % est appliqué au montant total d'investissement (coûts fixes en capitaux) pour obtenir cet estimé. Cette valeur correspond aux facteurs utilisés couramment dans ce genre d'usine, pour estimer les coûts d'entretien et de réparation (Bailey et Ollis, 1986 ; Peters et Timmerhaus, 1980 ; Ulrich, 1984).

6,7,1,6 *Matériaux courants*

Les dépenses liées aux matériaux courants sont évaluées en multipliant le coût d'entretien et de réparation par un facteur multiplicatif. Une valeur de 15 % du facteur a été retenue dans la présente analyse, ce qui correspond à la gamme de valeurs utilisées normalement pour ce genre d'évaluation (Peters et Timmerhaus, 1980 ; Ulrich, 1984).

6,7,1,7 *Frais de laboratoire*

Les frais de laboratoire sont estimés par rapport au coût de la main-d'œuvre directe d'opération. Un facteur multiplicatif de 15 % a été appliqué au coût de la main-d'œuvre d'opération pour estimer cet item comptable. Cette valeur est issue de la consultation des documents préparés par Peters et Timmerhaus (1980), ainsi que par Ulrich (1984).

6,7,2 Coûts indirects

Les coûts indirects comprennent les **frais généraux** de l'usine, ainsi que les **taxes** et les **assurances**. Au niveau du flux monétaire, les coûts indirects annuels d'opération calculés par le modèle sont indexés par rapport au taux d'inflation annuel.

6,7,2,1 *Taxes et assurances*

Le coût annuel des taxes et des assurances est estimé en multipliant le montant total de capitaux fixes par des facteurs multiplicatifs définis par l'utilisateur du modèle. Des valeurs de 1,5 % et de 0,5 % ont été employées dans la présente étude, respectivement pour les frais de taxes et d'assurances (Ulrich, 1984).

6,7,2,2 *Dépenses générales*

Les dépenses générales de l'usine ou frais généraux, tiennent compte de l'ensemble des coûts associés aux activités périphériques de l'exploitation, telles que la restauration, les services médicaux, la sécurité et protection, les laboratoires, l'entretien général de l'usine, l'emballage des produits et les facilités de stockage. De plus, les frais généraux considèrent les avantages sociaux payés au personnel.

L'évaluation des frais généraux s'effectue par rapport aux coûts de la main-d'œuvre d'opération et de supervision et aux frais d'entretien et de réparation. Un facteur multiplicatif de 60 % a été retenu pour cette analyse, ce qui correspond aux valeurs employées normalement pour l'estimation des frais généraux dans ce type d'usine (Peters et Timmerhaus, 1980 ; Ulrich, 1984).

6,7,3 Coûts généraux

Les coûts généraux retrouvés au niveau du flux monétaire tiennent compte des coûts associés à l'**administration**, des frais de **distribution et ventes**, ainsi que des dépenses de **recherche et développement**. Les coûts généraux sont indexés par rapport au taux d'inflation annuel.

6,7,3,1 Administration

De manière similaire aux frais généraux de l'usine, les coûts d'administration sont évalués en appliquant un facteur multiplicatif (15 % dans cette étude) sur les coûts de la main-d'œuvre d'opération et de supervision et sur les frais d'entretien et de réparation (Peters et Timmerhaus, 1980).

6,7,3,2 Distribution et ventes

Les coûts inhérents aux activités de distribution et de ventes du produit fini sont estimés à l'aide d'un facteur multiplicatif appliqué sur le total des coûts directs et indirects d'opération. En accord avec Peters et Timmerhaus (1980) et Ulrich (1984), une valeur de 10 % a été utilisée comme facteur d'évaluation.

6,7,3,3 Recherche et développement

Les frais de R&D sont également évalués par rapport au total des coûts directs et indirects d'opération. Une valeur de 5 % a été employée comme facteur multiplicatif telle que recommandée par Peters et Timmerhaus (1980) et Ulrich (1984).

6,7,4 Autres coûts de production

Les autres éléments considérés dans le calcul du coût de production sont les frais de **financement**, l'**amortissement** du capital fixe investi, ainsi que les **royautés** payables. Les sections suivantes décrivent l'approche méthodologique employée pour estimer ces items comptables.

6,7,4,1 Financement

Les coûts de financement comprennent le remboursement des intérêts sur le capital investi. Le remboursement annuel des intérêts est calculé en tenant compte du taux d'intérêt annuel (10 % dans la présente étude) et d'un capital décroissant linéairement sur la période d'exploitation. Une période d'exploitation de 10 années est retenue pour cette analyse technico-économique.

6,7,4,2 *Amortissement*

Du point de vue comptable, le capital investi initialement en début de projet (total des capitaux fixes) est amorti linéairement sur la durée de l'exploitation.

6,7,4,3 *Royautés*

Les coûts indirects annuels associés au paiement de royautés sont établis à partir de la valeur de la royauté (\$Can/tonne de protéases), laquelle est définie par l'analyste, multipliée par le tonnage annuel de protéases produit. Une valeur de 0,00 \$/tonne de protéases a été retenue comme royautés payables.

6,8 Flux monétaire

L'information obtenue de l'évaluation des coûts en capitaux et de production décrits précédemment est employée par le modèle pour préparer l'analyse du flux monétaire du projet de production industrielle de protéases. Les différents éléments intégrés au tableau de flux monétaire sont présentés aux sections suivantes.

6,8,1 Production et durée d'opération

Les premiers éléments présentés dans le tableau de flux monétaire portent sur la période d'opération annuelle de l'usine, ainsi que sur les tonnages annuels et cumulatifs de protéases produits à l'usine (unités enzymatiques et masse de protéases). Dans le cadre de la présente étude, une période annuelle d'opération de 350 jours a été utilisée pour les diverses analyses.

6,8,2 Revenus d'opération

Les revenus annuels d'opération (\$Can/an) sont calculés à partir du prix de vente des protéases (\$Can/M.U.), multiplié par le nombre d'unités enzymatiques de protéases. Dans le cas présent, le prix de vente initial des protéases a été fixé comme étant égal à 1,3 fois le coût total de production des protéases. Il faut de plus noter que les revenus annuels d'exploitation sont indexés par rapport à l'augmentation annuelle du prix de vente des protéases (%). Une hausse annuelle de 2 % du prix de vente a été retenue pour l'ensemble des analyses.

6,8,3 Coûts de production

Les coûts de production des protéases présentés dans l'analyse de flux monétaire comprennent les coûts **directs** d'exploitation, les coûts **indirects**, les coûts **généraux**, les coûts de **financement**, l'**amortissement** sur le capital, ainsi que les **royautés**.

En ce qui concerne le procédé **CONV**, des coûts totaux de production de 14,2, 26,6 et 58,9 M \$Can/an sont respectivement estimés pour des usines produisant 55 000, 165 000 et 550 000 M.U.I./an. Pour le procédé **BOUE**, des valeurs de 13,1, 23,3 et 48,0 M \$Can/an ont été estimées, ce qui correspond respectivement à une réduction des coûts de production de 7,7, 12,3 et 18,5 % par rapport au procédé **CONV**. Cette baisse des coûts est attribuable principalement à la diminution des besoins en produits chimiques pour le procédé **BOUE**. Ainsi, pour les trois capacités de production, soit 55 000, 165 000 et 550 000 M.U.I./an, le procédé **BOUE** permet une réduction des coûts en produits chimiques de 78,3 % par rapport au procédé **CONV**.

6,8,4 Revenu net avant imposition

Le revenu net annuel avant imposition est déterminé directement par la soustraction des coûts annuels de production à partir des revenus annuels d'exploitation.

6,8,5 Imposition

L'impôt sur le revenu est calculé en multipliant le taux d'imposition sur le revenu défini par l'analyste (30 % dans cette étude), par le revenu net annuel. Aucun impôt sur le revenu n'est retenu pour les années d'exploitation présentant un revenu brut déficitaire. De plus, les revenus bruts déficitaires sont reportés à l'année suivante de manière à réduire la charge fiscale des années d'exploitation rentables.

La valeur annuelle en crédit d'impôt est déterminée en multipliant le pourcentage de crédits d'impôt (60 % dans cette étude), par les frais de recherche et développement calculés au niveau des coûts d'opération. Aucun crédit d'impôt de R&D n'est retenu pour les années d'exploitation présentant un revenu brut déficitaire. Dans ce cas, les frais de recherche et

développement servant aux calculs de crédit d'impôt sont reportés à l'année suivante, mais dans une proportion de seulement 50 %.

6,8,6 Revenu net total

Le revenu annuel net total est simplement obtenu en soustrayant la valeur annuelle d'imposition du revenu net avant imposition et en additionnant la valeur annuelle en crédits d'impôt.

6,8,7 Coûts en capitaux

Les coûts en capitaux pour le projet étudié, sont calculés en tenant compte de l'**investissement total**, de la **valeur résiduelle** des équipements au terme du projet, de la **dotation à l'amortissement**, de la **gestion de l'inventaire** et du **fonds de roulement**.

6,8,7,1 *Investissement total*

L'investissement total pour le projet considéré est calculé en additionnant les coûts en capitaux **directs** (équipements, bâtiments, acquisition et aménagement du terrain, facilités et services), les coûts **indirects** (ingénierie et supervision ainsi que dépenses de construction), de même que les frais d'honoraires de **gestion de la construction** et les **frais contingents**. Au niveau du flux monétaire, ce coût est appliqué à la première année d'exploitation.

6,8,7,2 *Valeur résiduelle des équipements*

La valeur marchande des équipements au terme du projet considéré est calculée à partir de la durée de vie des équipements définie par l'utilisateur du modèle et tient compte d'une décroissance linéaire de la valeur des équipements sur leur période de vie. Une durée de vie moyenne des équipements de 20 années a été sélectionnée dans cette étude.

6,8,7,3 *Dotation à l'amortissement*

Au niveau comptable, la dotation à l'amortissement vient contrebalancer les coûts associés à l'amortissement du capital investi. Les valeurs annuelles de cet item comptable sont donc similaires, mais de signe opposé, aux coûts associés à l'amortissement.

6,8,7,4 *Gestion de l'inventaire*

Cet item tient compte du coût en capital attribuable à l'inventaire des réserves de produits chimiques et de matériaux courants qu'il est nécessaire d'acquérir au début du projet. Le coût de gestion de l'inventaire est calculé à partir de la période de couverture définie (nombre de mois d'opération). La valeur du coût de gestion de l'inventaire est obtenue en multipliant les nombres de mois d'opération de couverture par les coûts mensuels moyens des coûts de produits chimiques et de matériaux courants. Ce coût est appliqué sur la première année d'opération, mais est remboursé au terme de la période d'exploitation de l'usine. Une période de trois mois d'opération a été retenue dans le cadre de cette analyse.

6,8,7,5 *Fonds de roulement*

Le fonds de roulement est déterminé à partir de la période de couverture désirée (nombre de mois d'opération), laquelle est définie par l'utilisateur du modèle. La valeur du fonds de roulement est obtenue en multipliant le nombre de mois d'opération de couverture par le coût mensuel moyen des coûts d'opération (directs, indirects et généraux). Il faut noter que cet item comptable est appliqué sur la première année d'opération, mais est remboursé au terme de la période d'exploitation de l'usine. Une période d'opération de trois mois a été sélectionnée pour la détermination du fonds de roulement.

6,8,8 **Flux monétaire net et rendement interne sur l'investissement**

La soustraction des coûts en capitaux du revenu annuel net total permet d'obtenir le **flux monétaire net annuel**, ainsi que le **flux monétaire net cumulatif** pour le projet. Les Tableaux 63 et 64 d'analyse de flux monétaire présente également les valeurs concernant le **coût global de production des protéases** (\$Can/M.U.I. et \$Can/kg), le **prix initial de vente des protéases** (\$Can/M.U.I. et \$Can/kg), la **période de remboursement sur l'investissement** (années), le **profit net total** (\$Can), le **profit net actualisé** (\$Can) ainsi que le **rendement interne sur l'investissement** (%).

Tableau 63 Bilan de flux monétaire sur une période de 10 années pour les scénarios d'exploitation du procédé CONV

Items	Unités	CONV-A	CONV-B	CONV-C
Période d'opération	jrs	350	350	350
Production totale de protéases	kg	500 000	1 500 000	5 000 000
Production totale d'unités enzymatiques	M.U.	550 000	1 650 000	5 500 000
Revenus d'opération	\$Can	20 177 246	37 853 128	83 823 615
Coûts d'opération	\$Can			
Coûts directs		5 960 751	12 332 778	31 185 429
Coûts indirects		2 639 459	4 307 633	7 769 249
Coûts généraux		1 807 872	3 318 558	7 278 671
Coûts de financement		1 141 412	2 044 639	4 073 364
Amortissement		2 594 118	4 646 908	9 257 646
Royautés		0	0	0
Revenu brut (avant imposition)	\$Can	6 033 634	11 202 612	24 259 256
Imposition	\$Can	1 552 084	2 861 571	6 109 137
Revenu net total	\$Can	4 481 550	8 341 041	18 150 120
Coûts en capitaux	\$Can			
Investissement total				
Valeur résiduelle		2 685 422	4 810 464	9 583 484
Dotation à l'amortissement		2 594 118	4 646 908	9 257 646
Coût global de production d'unités enz.	\$Can/M.U.	257,16	161,52	108,30
Coût global de production de protéases	\$Can/kg	282,87	177,67	119,13
Prix de vente initial d'unités enzymatiques	\$Can/M.U.	335,04	209,52	139,19
Prix de vente initial de protéases	\$Can/kg	368,54	230,47	153,11
Période de remboursement	années	4,55	4,51	4,37
Profit net total	\$Can	47 500 921	88 220 871	191 084 682
Profit net actualisé	\$Can	18 114 501	33 965 909	75 435 310
Taux de rendement interne	%	26,93	27,44	28,88

Tableau 64 Bilan de flux monétaire sur une période de 10 années pour les scénarios d'exploitation du procédé BOUE

Items	Unités	BOUE-A	BOUE-B	BOUE-C
Période d'opération	jrs	350	350	350
Production totale de protéases	kg	500 000	1 500 000	5 000 000
Production totale d'unités enzymatiques	M.U.	550 000	1 650 000	5 500 000
Revenus d'opération	\$Can	18 623 277	33 191 222	68 283 928
Coûts d'opération	\$Can			
Coûts directs		4 765 391	8 746 696	19 231 824
Coûts indirects		2 639 459	4 307 633	7 769 249
Coûts généraux		1 807 872	3 318 558	7 278 671
Coûts de financement		1 141 412	2 044 639	4 073 364
Amortissement		2 594 118	4 646 908	9 257 646
Royautés		0	0	0
Revenu net (avant imposition)	\$Can	5 675 026	10 126 787	20 673 175
Imposition	\$Can	1 444 501	2 538 824	5 033 312
Revenu net total	\$Can	4 230 524	7 587 963	15 639 863
Coûts en capitaux	\$Can			
Investissement total				
Valeur résiduelle		2 685 422	4 810 464	9 583 484
Dotation à l'amortissement		2 594 118	4 646 908	9 257 646
Coût global de production d'unités enz.	\$Can/M.U.	235,42	139,78	86,57
Coût global de production de protéases	\$Can/kg	258,97	153,76	95,22
Prix de vente initial d'unités enzymatiques	\$Can/M.U.	309,24	183,71	113,38
Prix de vente initial de protéases	\$Can/kg	340,16	202,08	124,72
Période de remboursement	années	4,64	4,64	4,57
Profit net total	\$Can	44 990 666	80 690 096	165 982 113
Profit net actualisé	\$Can	16 881 403	30 266 608	63 104 318
Taux de rendement interne	%	26,12	26,11	26,75

6,9 Comparaison technico-économique des procédés de production de protéases alcalines

La meilleure approche pour examiner l'intérêt technico-économique des procédés de production de protéases est de comparer les coûts globaux de production de protéases, soit en termes de coût par millions d'unités enzymatiques (\$Can/M.U.) ou de coût par masse de protéases produites (\$Can/kg). En effet, compte-tenu que le prix de vente des protéases a été fixé par rapport au coût de production des enzymes, il n'est pas pertinent de comparer entre eux les paramètres économiques que sont la période de remboursement sur l'investissement, le profit net total ou actualisé, ou encore le taux de rendement interne sur l'investissement. Il serait toutefois possible d'utiliser ces paramètres économiques dans la mesure où le prix de vente des protéases serait gardé fixe pour l'ensemble des simulations.

Dans le cas du procédé **CONV**, les coûts globaux de production de protéases ont été évalués respectivement à 257,16, 161,52 et 108,30 \$Can/M.U.I. pour les capacités de production de 55 000, 165 000 et 550 000 M.U.I./an. Pour ce qui est du procédé **BOUE**, les coûts de production ont été estimés à 235,42, 139,78 et 86,57 \$Can/M.U.I. En terme de coûts globaux de production par masse de protéines produites, des coûts de 282,87, 177,67 et 119,13 \$Can/kg ont été mesurés pour le procédé **CONV**, alors que pour le procédé **BOUE**, ceux-ci ont été établis à respectivement 258,97, 153,76 et 95,22 \$Can/kg.

Ainsi, la comparaison des coûts de production à l'aide des deux procédés, aux capacités d'obtention de 55 000, 165 000 et 550 000 M.U.I./an, témoignent que le procédé **BOUE** montre une économie de respectivement 7,7, 12,3 et 18,5 % par rapport au procédé **CONV**. La différence entre les deux procédés est davantage ressentie au niveau des coûts directs d'opération, pour lesquels le procédé **BOUE** présente une économie de 20,1, 29,1 et 38,3 % par rapport au procédé **CONV**.

Évidemment, ces comparaisons sont basées sur les scénarios de simulation utilisés, pour lesquels des rendements de production d'enzymes identiques (6,0 unités enzymatiques par millilitre de milieu de culture après fermentation) ont été employés. Dans la mesure où le

procédé **BOUE**, permettrait un rendement différent de production, les économies réalisées seraient inévitablement modifiées. Ainsi, en utilisant le modèle, il est possible d'évaluer le rendement minimal de production d'unités enzymatiques pour que le procédé **BOUE** soit plus économique que le procédé **CONV**.

Par exemple, pour des usines produisant respectivement 55 000, 165 000 et 550 000 M.U.I./an, des rendements de production (activité enzymatique dans le milieu de culture après fermentation) minimaux de 5,54, 5,26 et 4,89 U.I./mL sont requis. Ces valeurs montrent que pour être plus économique que le procédé **CONV**, le procédé **BOUE** doit permettre d'atteindre un rendement de production supérieur ou équivalent, selon les cas, de 82 à 92 % de celui du procédé employé couramment dans l'industrie.

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Ces expériences de production de protéases ont démontré que la croissance des microorganismes producteurs de protéases dans les boues d'épuration est comparable à celle obtenue en milieu synthétique. De plus, les boues contiennent l'ensemble des éléments nutritifs requis pour la production de protéases. Toutefois, un apport exogène de source de carbone facilement assimilable, tels que la dextrine, le glucose ou la mélasse, permet d'accroître les rendements de production des enzymes protéolytiques.

Les caractéristiques des boues utilisées pour la production de protéases semblent également être un paramètre de première importance. Ainsi, il semble préférable d'opter pour des boues présentant un contenu en solides plus élevé (environ 20 g/L de solides totaux) que celui des boues secondaires employées (boues de Valcartier à 6 g/L de solides totaux) et ce, afin de ne pas avoir de carence en nutriments et en substrats organiques pour une croissance microbienne optimale. De plus, il est suggéré d'éviter les boues primaires ou mixtes (primaires et secondaires), lesquelles contiennent une proportion importante de matières non-utilisables (non-biodégradables) par la biomasse produisant des enzymes protéolytiques. L'application d'un pré-traitement visant à accroître la disponibilité des nutriments et substrats dans les boues utilisées pour la production de protéases, pourrait aussi être une avenue d'intérêt à explorer.

Ces travaux ont également démontré qu'un apport externe d'azote ammoniacal inhibe la production des protéases, alors qu'une addition d'une source protéique (farine de soya) aux boues n'influence pas significativement la production des enzymes protéolytiques. Ces résultats sont conformes avec ceux observés par Boïing (1982) qui a démontré que les ions NH_4^+ inhibent la production de protéases alors que les nitrates et les sels de sodium des acides aspartique et glutamique favorisent leur production. Les sels de sodium des acides organiques ont le même effet (Boïing, 1982). Dès lors, il serait sans doute profitable d'employer des boues secondaires âgées, donc ayant subi une nitrification importante, de manière à réduire les teneurs en azote ammoniacal dans le milieu et à augmenter les concentrations en nitrate, bénéfiques au procédé de production de protéases à partir de boues d'épuration.

Le maintien adéquat du pH du milieu dans les gammes optimales de production des protéases par les microorganismes représente certainement l'une des principales difficultés rencontrées dans cette étude. L'addition d'un tampon fort, tel que le tampon phosphate (PBS 0,1M), a permis de résoudre en partie ce problème. L'utilisation du tampon borate est déconseillée, puisque les résultats obtenus suggèrent que celui-ci affecte négativement la production des protéases. Finalement, il est suggéré, lors d'études ultérieures, d'effectuer les essais de production de protéases en fermenteurs équipés d'un contrôle automatisé du pH par addition de solutions acides et caustiques.

L'utilisation du modèle informatisé d'évaluation technico-économique développé dans le cadre de ce projet a permis d'évaluer l'intérêt financier de produire des protéases à partir des boues d'épuration municipales (**BOUE**) en comparaison à un procédé conventionnel de production utilisant un milieu synthétique (**CONV**). Dans le cas du procédé **CONV**, le milieu de culture employé pour la croissance de *B. licheniformis* est composé des produits suivants (en pourcentage p/v) : 5 % d'extrait de farine de soya, 6 % de mélasse (contient 50 % de carbohydrates), 1 % de phosphate d'ammonium, 0,03 % de KCl et 0,02 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Dans le cas du procédé **BOUE**, le milieu de culture est constitué de boues d'épuration secondaires contenant approximativement 20 g/L de solides totaux, ainsi que 6 % de mélasse.

Les simulations effectuées considèrent, pour les deux procédés, une production maximale de 6,0 U.I./mL après 48 heures de fermentation. Il est également prévu que la biomasse produite lors de la fermentation serait séparée du milieu de culture par centrifugation. Cette pratique devrait permettre l'obtention d'un concentré de biomasse ayant approximativement 50 % de solides.

La chaîne d'extraction et de récupération des protéines est basée sur le procédé décrit par Kalk et Langlykke (1986). Ce procédé a toutefois été simplifié afin d'éliminer les étapes de lyse cellulaire et d'élimination des acides nucléiques, puisque les procédés étudiés correspondent à une production de protéines extracellulaires.

La chaîne d'extraction et de récupération comprend d'abord deux étapes de fractionnement des protéines par ultrafiltration. Par la suite, les protéines sont extraites dans un circuit de

précipitation à froid avec de l'éthanol 95 %. Le circuit comprend par la suite des étapes de purification avec deux systèmes de résines échangeuses d'ions et un système de chromatographie sur gel. Les protéines subissent finalement une dernière étape de concentration avec le système d'ultrafiltration, puis la solution finale est filtrée stérilement et embouteillée.

La meilleure approche pour examiner l'intérêt technico-économique des procédés de production de protéases est de comparer les coûts globaux de production de protéases, soit en termes de coût par millions d'unités enzymatiques (\$Can/M.U.) ou de coût par masse de protéases produites (\$Can/kg).

Dans le cas du procédé **CONV**, les coûts globaux de production de protéases ont été évalués respectivement à 257, 162 et 108 \$Can/M.U.I. pour des capacités de production de 55 000, 165 000 et 550 000 M.U.I./an. Pour ce qui est du procédé **BOUE**, les coûts de production ont été estimés à 235, 140 et 87 \$Can/M.U.I. En terme de coûts globaux de production par masse de protéines produites, des coûts de 283, 178 et 119 \$Can/kg ont été mesurés pour le procédé **CONV**, alors que pour le procédé **BOUE**, ceux-ci ont été établis respectivement à 259, 154 et 95 \$Can/kg.

Ainsi, la comparaison des coûts de production des deux procédés, aux capacités de production de 55 000, 165 000 et 550 000 M.U.I./an, témoigne que le procédé **BOUE** montre une économie, respectivement de 7,7, 12,3 et 18,5 % par rapport au procédé **CONV**. La différence entre les deux procédés est davantage ressentie au niveau des coûts directs d'opération, pour lesquels le procédé **BOUE** présente une économie de 20,1, 29,1 et 38,3 % par rapport au procédé **CONV**.

Évidemment, ces comparaisons sont basées sur les scénarios de simulation utilisés, pour lesquels des rendements de production d'enzymes identiques (6,0 unités enzymatiques par millilitre de milieu de culture après fermentation) ont été employés. Dans la mesure où le procédé **BOUE**, permettrait un rendement de production différent, les économies réalisées seraient inévitablement modifiées. Ainsi, en utilisant le modèle il est possible d'évaluer le rendement minimal de production d'unités enzymatiques pour que le procédé **BOUE** soit plus

économique que le procédé **CONV**.

Par exemple, pour des usines produisant respectivement 55 000, 165 000 et 550 000 M.U.I./an, des rendements de production (activité enzymatique dans le milieu de culture après fermentation) minimaux de 5,54, 5,26 et 4,89 U.I./mL sont requis. Ces valeurs montrent que pour être plus économique que le procédé **CONV**, le procédé **BOUE** doit permettre d'atteindre un rendement de production supérieur ou équivalent, selon les cas, de 82 à 92 % de celui du procédé employé couramment dans l'industrie.

Cette étude démontre bien la possibilité de produire des protéases alcalines à partir de boues d'épuration et l'intérêt économique associé à cette pratique. Les efforts ultérieurs de recherche devraient donc porter sur l'optimisation des conditions de production afin de hausser et de stabiliser les rendements de production. Cette optimisation devrait s'inspirer des orientations et paramètres établis dans le cadre de la présente recherche.

BIBLIOGRAPHIE

- Aehle, W., H. Sobek, A. Amory, R. Vetter, D. Wilke et D. Schomburg (1993). Rational protein engineering and industrial application : structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved « washing-performance » - The alkaline protease from *Bacillus alcalophilus*. *J. Biotechnol.*, **28** : 31-40.
- Anson, M.L. (1939). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, **22** : 79-89.
- APHA (1989). *Standards Methods for Examination of Water and Wastewaters*. 17^e éd., Am. Public Health Assoc., Washington, DC, États-Unis.
- Argüello, M.A., D. Elzo, F.A. Riera et R. Alvarez (1998). Utilisation des détergents commerciaux enzymatiques et non-enzymatiques. *Can. J. Chem. Eng.*, **76** : 276-280.
- Arnaud, A., C. Berset, J. Bocquet, M. Bouix, Y. Cerisier, G.F. Cuvellier, D. De Nettancourt, J.M. Engasser, P. Galzy, J. Goursaud, M. Guerrini, J.P. Guiraud, A. Iwena, C. Jupin, J.-M. Lebeault, J.-Y. Leveau, J. Martial, C. Mawas, F. Normand-Plessier, S. Pierrard, J. Pourquoi, P.-J. Raugel, H. Richard, H. Steenbrugge, E. Teoule, D. Thomas et J.-P. Vandecasteele (1993). *Biotechnologies*. 4^{ième} éd., Scriban R. (éd), Technique et Documentation Lavoisier, Paris, France, 904 pages.
- Atkinson, B. et F. Mavituna (1983). *Biochemical engineering and biotechnology handbook*. The Nature Press (éd.), Macmillan Publishers Ltd, Surrey, Angleterre, 1119 pages.
- Aunstrup, K., O. Andersen, E.A. Falch et T.K. Nielsen (1979). Economics of fermentation process. Dans : *Microbial Technology, Fermentation Technology, Vol. 2*. Pepler H.J. et D. Perlman (éds), Academic Press, New York, NY, États-Unis.
- Aunstrup, K., S.A. Barker, J. Eriksen, W.F. Fogerty, J. Goksoyr, K. Kieslich, W. Pilnik, F.M. Rombouts, A.H. Rose, O.K. Sebek, J. Shirley, E.J. Vandamme et L.C. Vinning (1980).

- Microbial enzymes and bioconversions. Dans : *Economics microbiology, Vol. 5*. Rose A.H. (éd.), Academic Press, Londres, Grande-Bretagne.
- Aviron-Violet, P., J.L. Baret, C. Bertrand, B. Blazy, F. Bouvier, M. Comtat, P.R. Coulet, P. Dupuy, J.F. Hervagault, A. Joyeaux, J. Laurent, P. Monsan, D. Thomas, P. Sicard et G.M.A. Van Beynum (1982). *Les enzymes. Production et utilisation industrielles*. Durand G. et P. Monsan (éds), Bordas, Paris, France, 349 pages.
- Bailey, J.E. et D.F. Ollis (1986). *Biochemical engineering fundamentals*. 2^{ième} éd., McGraw-Hill Inc., New York, NY, Etats-Unis, 984 pages.
- Bartholomew, W.H. et H.B. Reisman (1979). Economics of fermentation processes. Dans : *Microbial Technology, Fermentation Technology, Vol. 2*. Pepler H.J. et D. Perlman (éds), Academic Press, New York, NY, États-Unis, Chap 18.
- Boiling, J.T.P. (1982). Enzyme production. Dans : *Prescott et Dunn's industrial microbiology*. Reed G. (éd.), AVI Publishing Company, Westport, Connecticut, États-Unis, 883 pages.
- Chauvel, A., P. Leprince, Y. Barthel, C. Rimbault et J.P. Arlie (1981). *Manual of economic analysis of chemical processes*. McGraw-Hill Book Company, New York, NY, Etats-Unis, 462 pages.
- China West International, Inc. (1994). *China West International Inc. : Annual Report 1996*. 26 pages.
- Crueger, W. et A. Crueger (1982). *Biotechnology - a textbook of industrial microbiology*. Science Tech. Inc., Madison, WI, Etats-Unis, 308 pages.
- Datar, R. et C.G. Rosen (1990). Downstream process economics. Dans : *Separation processes in biotechnology*. Asenjo J.A. (éd.), Marcel Dekker Inc., New York, NY, États-Unis, Chap. 20, 801 pages.
- Dion, W.M. (1950). The proteolytic enzymes of microorganisms. II. Factors affecting the

- production of proteases in submerged culture. *Can. J. Res.*, **28C** : 586-599.
- Dudley, D.J., M.N. Guentzel, M.J. Ibarra, B.E. Moore et B.P. Sagik (1980). Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39** : 118-126.
- Ellwood, P. (1968). Will enzymes trigger a detergent revolution ?. *Chem. Eng.*, **75(20)** : 108-110.
- Fukumoto, J., T. Takarazuka, T. Yamamoto, Y. Amagasaki et D. Tsuru (1974). *Process for producing detergent resisting alkaline protease*. Brevet américain no. 3 838 009. 5 pages.
- Güntelberg, A.V. (1954). Comptes rendus des travaux de laboratoire Carlsberg. *Series Chimie*, **29** : 27.
- Hagiwara, B., H. Matsubara, M. Nakai et K. Okunuki (1958). Crystalline bacterial proteinase. I. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.*, **45** : 185-194.
- Hashimoto, H., T. Iwaasa et R. Yokotsuka (1972). Thermostable acid protease produced by *Penicillium duponti* K1014 a true thermophilic fungus newly isolated from compost. *Appl. Microbiol.*, **24** : 986-992.
- Horikoshi, K. et Y. Ikeda (1977). *Preparation of an alkaline protease*. Brevet américain no. 4 052 262. 13 pages.
- Jensen, D.E. (1972). Continuous production of extracellular protease by *Bacillus subtilis* in a two-stage fermentor. *Biotechnol. Bioeng.*, **14** : 647-662.
- Kalk, J.P. et A.F. Langlykke (1986). Cost estimation for biotechnology projects. Dans : *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. Demain A.L. et N.A. Solomon (éds), American Society for Microbiology, Washington, DC, États-Unis, Chap 26, pp. 363-388.

- Keay, L., M.H. Moseley, R.G. Anderson, R.J. O'Connor et B.S. Wildi (1972). Production and isolation of microbial proteases. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **3** : 63-92 .
- Keay, L. et P.W. Moser (1969). Differentiation of alkaline proteases from *Bacillus* species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34** : 600-604.
- Kline, L., L.R. MacDonnell et H. Lineweaver (1944). Bacterial proteinase from waste *Asparagus butts*. *Ind. Eng. Chem.*, **36** : 1162-1158.
- Kunitz, H. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen. Physiol.*, **30** : 291-310.
- Larpent, J.-P. et M. Larpent-Gourgaud (1975). *Mémento technique de microbiologie*. Techniques et documentation - Lavoisier, Paris, France, 269 pages.
- Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Dans : *Methods in enzymology, Vol. III*. Colowick S.P. et N.O. Kaplan (éds), Academic Press Inc, New-York, NY, États-Unis, pp. 447-454.
- Lehmann, R., H.F. Pfeiffer, J. Schindler et W. Schreiber (1977). Process of producing acid stable protease. Brevet américain no. 4 062 732.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr et R.J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275.
- Margot, A., E. Flaschel et A. Renken. (1994). Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis. Correlation of base consumption with soluble nitrogen content. *Proc. Biochem.*, **29** : 257-262.
- Maxwell, M.E. (1952). Enzymes of *Aspergillus oryzae*. I. The development of a culture medium yielding high protease activity. *Aust. J. Sci. Res. Ser.*, **B5** : 43-55.
- McKane, L. et J. Kandel (1996). *Microbiology : essentials and applications*. McGraw-Hill, New-York, NY, États-Unis, 843 pages.

- Metcalf & Eddy inc. (1991). *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal and Reuse*. 3^e Édition, McGraw-Hill, New-York, NY, Etats-Unis, 1334 pages.
- Michaelis, L. et M.L. Menten (1913). The kinetics of invertin action. *Biochem. Z.*, **49** : 333-369.
- Murao, S. (1971a). *Alkaline proteinase*. Brevet américain no. 3 576 719. 3 pages.
- Murao, S. (1971b). *Production of a new protease*. Brevet américain no. 3 622 458. 10 pages.
- Niwa, K. (1971). *Microbial protease by fermentation in an acid medium*. Brevet allemand no. 2 048 811. 7 pages.
- Novo Nordsik (1997). *Novo Nordsik Annual Report 1996 : Enzyme Business*. 31 pages.
- Ottensen, M. et A. Spector (1960). Comptes rendus des travaux du laboratoire Carlsberg. *Series Chimie*, **32** : 63.
- Pardee, A.B. (1961). Response on enzyme synthesis and activity to environment. Dans : *Microbial reaction to environment*. Eleventh symposium of the society for general microbiology, Royal Institution, Londres, The Syndics of the Cambridge University Press, Cambridge, Angleterre, pp. 19-40.
- Pelczar, M.J. et E.C.S. Chan (1981). *Éléments de microbiologie*. Traduit et adapté par J. Fontaine., Les Éditions HRW Ltée, Montréal, Canada, 515 pages.
- Perry, R.H., D.W. Green et J.O. Maloney (1984). *Perry's chemical engineers' handbook*. 6^{ième} éd., McGraw-Hill Inc., New York, NY, Etats-Unis.
- Peters, M.S. et K.D. Timmerhaus (1980). *Plant design and economics for chemical engineers*. 3^{ième} éd., McGraw-Hill Book Company, New York, NY, Etats-Unis, 973 pages.
- Reed, G. (1966) *Enzymes in food processing*. G. Reed Éd., Academic Press, New-York, États-Unis, 483 pages.

- Rivière, J. (1975). *Les applications industrielles de la microbiologie*. Masson et Cie, Collection Sciences Agronomiques, Paris, France, 197 pages.
- Rose, A.H. (1961). *Industrial Microbiology*. Butterworth & Co. Ltd., Londres, Grande-Bretagne, pp. 242-255.
- Simon, P. et R. Meunier (1970). *Microbiologie industrielle et génie biochimique*. Masson et Cie, Paris, France, 567 pages.
- Spies, J.R. (1957). Colorimetric procedures for amino acids. Dans : *Methods in enzymology*, Vol. III. Colowick S.P. et N.O. Kaplan (éds), Academic Press Inc., New-York, États-Unis, pp. 467-468.
- Swisher, R.D. (1969). Detergent enzymes : biodegradation and environmental acceptability. *Bio. Sci.*, **19(12)** : 1093-1094.
- Ulrich, G.D. (1984). *A guide to chemical engineering process design and economics*. John Wiley & Sons, New York, NY, États-Unis, 472 pages.
- Viccaro, J.P. (1973). *Alkaline protease, methode for its production, and detergent composition*. Brevet américain no. 3 748 233. 5 pages.
- Yagi, J., T. Yano, Y. Kubochi, S. Hattori, M. Ohashi, H. Sakai, J. Jomon et M. Ajisaka (1972). Studies on alkaline proteinase from *Cephalosporium*. I. Purification on the enzyme. *J. Ferment. Technol.*, **50(9)** : 592-599.