

Institut National de la Recherche Scientifique

INRS – Centre Eau, Terre et Environnement

**ÉTUDE DE PRODUCTION DE PROTÉASES ALCALINES PAR *BACILLUS LICHENIFORMIS*
EN UTILISANT DES BOUES D'ÉPURATION MUNICIPALES COMME SUBSTRAT**

Par
Mathieu Drouin
B.Sc. Microbiologie

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

Jury d'évaluation

Examineur externe

M. Jean-Charles Côté
Agriculture et Agroalimentaire Canada

Examineur interne

M. Claude Guertin
INRS, Institut Armand-Frappier

Directeur de recherche

M. Rajeswar Dayal Tyagi
INRS-ETE



REMERCIEMENTS

De sincères remerciements se doivent d'être adressés à mon directeur de recherche, le professeur R.D. Tyagi, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser des études de second cycle. Son expertise et son support tout au long de mes travaux ont été grandement profitables. Je tiens aussi à remercier chaleureusement mes coéquipiers de laboratoire, particulièrement Simon Barnabé et Islem Yezza, pour leurs précieux conseils et leur support tout au long de mes travaux.

Également, je tiens à remercier les techniciens et les employés de l'INRS-ETE pour l'aide offerte lors des différentes étapes de la réalisation de ces travaux.

Finalement, je tiens à exprimer ma reconnaissance à tous mes proches pour le support moral, l'encouragement et la compréhension qu'ils m'ont offerts tout au long de mes études.

RÉSUMÉ

Les protéases alcalines produites par *Bacillus licheniformis* comptent actuellement parmi les enzymes les plus utilisées au niveau industriel. Par contre, l'emploi des protéases et des autres enzymes est actuellement limité par leurs coûts de production élevés. Afin d'abaisser ces coûts de production, les producteurs d'enzymes et la communauté scientifique effectuent des recherches afin de trouver des substrats de production moins dispendieux et capable de supporter la production de protéases. À ce propos, les boues d'épuration sont un substrat prometteur. Des travaux antérieurs, effectués en erlenmeyer, ont démontré que les boues d'épuration municipales peuvent soutenir la croissance de *Bacillus licheniformis* et présentent un potentiel intéressant pour la production de protéases. L'intérêt d'employer des boues d'épuration est double puisque qu'il s'agit, dans un premier temps, de produire des protéases à des coûts moindres en utilisant un substrat économique qui stimule la production de protéases. En second lieu, il favorise la valorisation d'un sous-produit issu du traitement des eaux usées et dont l'élimination est coûteuse et problématique. Le but de ce travail consiste donc à accroître le rendement de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis*, sous des conditions contrôlées de pH et d'oxygène dissous, en utilisant les boues d'épuration municipales comme substrat de fermentation.

De nombreuses stratégies ont été utilisées dans ce travail et ont permis d'améliorer les performances du procédé. En premier lieu, une étude a été entreprise en erlenmeyer afin d'évaluer l'effet des caractéristiques de l'inoculum (physiologie, âge et volume) sur la croissance de *Bacillus licheniformis* lors de fermentations dans les boues d'épuration. Ces travaux ont permis de déterminer qu'un inoculum préparé en deux étapes, comprenant une étape de pré-culture en boue, permet d'obtenir un nombre maximum de cellules ($2,73 \times 10^9$ UFC/mL) et de spores ($3,77 \times 10^7$ UFC/mL) lors de la fermentation dans des boues contenant 25 g/L de matières en suspension (MES).

Les expériences en bioréacteur ont démontré que des conditions contrôlées de pH et d'oxygène dissous permettent d'obtenir des comptes de cellules et de spores et des valeurs d'activité protéolytique plus élevées que des conditions non contrôlées (erlenmeyer). L'optimisation de la concentration des boues en MES a permis d'améliorer la croissance et l'activité protéolytique obtenue. Ainsi, un nombre maximum de cellules ($8,57 \times 10^9$ UFC/mL) a été atteint dans des boues concentrées à 25 g/L de MES. L'activité protéolytique maximale (11,2 U.I./mL) a été obtenue dans les boues à 35 g/L de MES. En comparaison avec les résultats obtenus dans les boues, la fermentation en milieu synthétique a permis d'atteindre un nombre maximum de cellules inférieur ($1,06 \times 10^9$ UFC/mL), mais une activité protéolytique maximale supérieure (12,5 U.I./mL).

Finale­ment, un pré-traitement thermo-­alcalin appliqué aux boues avant la fermentation a permis d'augmenter l'activité protéolytique respectivement de 20,2 % et de 27,2 % dans les boues à 25 g/L de MES (11,9 U.I./mL) et à 35 g/L de MES (14,3 U.I./mL). Les travaux réalisés au cours de cette étude démontrent donc le plein potentiel des boues d'épuration comme substrat pour la production de protéases.

Mathieu Drouin
Étudiant

Prof. R.D. Tyagi
Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XV
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1: GÉNÉRALITÉS ET APPLICATIONS DES PROTÉASES.....	3
1.1 RÔLE ET ACTIONS DES ENZYMES.....	3
1.2 ORIGINE DES ENZYMES INDUSTRIELLES.....	4
1.3 ENZYMES PROTÉOLYTIQUES.....	4
1.3.1 Exopeptidases.....	6
1.3.1.1 Aminopeptidases.....	6
1.3.1.2 Carboxypeptidases.....	7
1.3.2 Endopeptidases.....	7
1.3.2.1 Protéases cystéines.....	7
1.3.2.2 Métallo-protéases.....	7
1.3.2.3 Protéases aspartiques.....	8
1.3.2.4 Protéases sérines.....	8
1.4 APPLICATIONS INDUSTRIELLES DES PROTÉASES.....	9
1.4.1 Industrie alimentaire.....	9
1.4.1.1 Préparation du fromage.....	9
1.4.1.2 Boulangerie.....	9
1.4.1.3 Produits à base de soja.....	9
1.4.1.4 Synthèse de l'aspartame.....	10
1.4.2 Domaine pharmaceutique et médical.....	10
1.4.3 Tanneries.....	10
1.4.4 Détergents.....	11
1.4.5 Traitement des eaux usées industrielles.....	12
1.5 MARCHÉ DES PROTÉASES.....	13
1.6 TENDANCES EN RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT POUR LA PRODUCTION DE PROTÉASES.....	14
1.6.1 Nouvelles souches productrices de protéases.....	14
1.6.2 Production de protéases dans les milieux de culture alternatifs.....	15
CHAPITRE 2: PRODUCTION DE PROTÉASES ALCALINES PAR <i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i>	17
2.1 <i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i>	17
2.1.1 Caractéristiques générales.....	17
2.1.2 Croissance et métabolisme.....	18
2.2 PROTÉASES DE <i>B. LICHENIFORMIS</i>	19
2.3 FACTEURS BIOTIQUES INFLUENÇANT LA PRODUCTION DE PROTÉASES.....	21
2.3.1 Influence de la source de carbone.....	21

2.3.2 Influence de la source d'azote.....	22
2.3.3 Influence des éléments traces.....	23
2.4 FACTEURS ABIOTIQUES INFLUENÇANT LA PRODUCTION DE PROTÉASES.....	23
2.4.1 pH.....	23
2.4.2 Aération et agitation.....	24
2.5 PRODUCTION DE PROTÉASES DANS LES BOUES D'ÉPURATION.....	24
2.5.1 Problématique de la gestion des boues.....	24
2.5.2 Les boues d'épuration comme milieu de production de protéases.....	26
CHAPITRE 3: OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	27
3.1 OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	27
3.2 HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	28
CHAPITRE 4: DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE.....	29
4.1 PROCÉDURE DE PRODUCTION DE PROTÉASES PAR <i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i>	29
4.1.1 Préparation du milieu de culture.....	29
4.1.1.1 Échantillonnage et préparation des substrats de fermentation.....	29
4.1.1.2 Analyses physiques des boues.....	29
4.1.1.3 Analyses chimiques des boues.....	30
4.1.2 Préparation de l'inoculum.....	31
4.1.2.1 Souche bactérienne employée.....	31
4.1.2.2 Culture de départ.....	31
4.1.2.3 Pré-culture.....	32
4.1.3 Essais de fermentation.....	32
4.1.3.1 Fermentations en erlenmeyers.....	32
4.1.3.2 Fermentations en bioréacteurs.....	33
4.1.3.2.1 Description des bioréacteurs.....	33
4.1.3.2.2 Stérilisation et hydrolyse des milieux de culture.....	34
4.1.3.2.3 Inoculation des bioréacteurs.....	34
4.1.3.2.4 Paramètres des fermentations.....	34
4.1.3.2.5 Échantillonnage.....	35
4.1.4 Analyse des échantillons recueillis.....	35
4.1.4.1 Compte de cellules et de spores.....	35
4.1.4.2 Détermination de l'activité protéolytique.....	36
4.1.4.3 Calcul du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène ($K_L a$).....	37
4.2 MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE.....	40
4.2.1 Comparaison de la croissance de <i>B. licheniformis</i> et des activités protéolytiques obtenues en erlenmeyer et en bioréacteur (expériences préliminaires).....	40
4.2.2 Optimisation de l'inoculum.....	41
4.2.2.1 Croissance de <i>B. licheniformis</i> dans les boues à 15 et 25 g/L de MES lors d'une inoculation en une étape (inoculum sans pré-culture).....	41
4.2.2.2 Croissance de <i>B. licheniformis</i> dans les boues à 25 g/L de MES lors d'une inoculation en deux étapes : influence de l'âge de la pré-culture.....	41
4.2.2.3 Croissance de <i>B. licheniformis</i> dans les boues à 25 g/L de MES lors d'une inoculation en deux étapes : influence du volume d'inoculation des milieux de fermentation.....	42
4.2.3 Comparaison de l'activité protéolytique dans les boues secondaires de la CUQ et dans le milieu synthétique.....	42
4.2.4 Optimisation de la concentration en matière en suspension (MES) des boues secondaires employées pour les fermentations.....	43
4.2.5 Évaluation de l'effet d'un pré-traitement d'hydrolyse alcaline des boues sur le transfert d'oxygène, la croissance de <i>B. licheniformis</i> et l'activité protéolytique.....	43
CHAPITRE 5: RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	45
5.1 ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES BOUES.....	45

5.2 COMPARAISON DE LA CROISSANCE DE <i>B. LICHENIFORMIS</i> ET DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE EN ERLLENMEYER ET EN BIORÉACTEUR (EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES).....	46
5.3 ÉTUDE DE L'INOCULUM	51
5.3.1 Croissance de <i>B. licheniformis</i> dans les boues après une inoculation en une étape (sans pré-culture en boues).....	51
5.3.2 Croissance de <i>B. licheniformis</i> dans les boues à 25 g/L de MES après une inoculation en deux étapes ..	56
5.3.2.1 Influence de l'âge de la pré-culture	56
5.3.2.2 Influence du volume d'inoculation	59
5.4 COMPARAISON DE LA CROISSANCE DE <i>B. LICHENIFORMIS</i> ET DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DANS LES BOUES À 25 G/L ET DANS LE MILIEU SYNTHÉTIQUE	62
5.5 EFFET DE LA CONCENTRATION EN MES DES BOUES D'ÉPURATION SUR LA CROISSANCE DE <i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i> ET SUR L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE.....	70
5.6 EFFET DU PRÉ-TRAITEMENT HYDROLYTIQUE DES BOUES D'ÉPURATION SUR LA CROISSANCE DE <i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i> ET SUR L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE.....	80
CONCLUSIONS.....	91
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	95

ANNEXE 1 DONNÉES SUR LA COMPARAISON DE LA CROISSANCE ET DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE *B. LICHENIFORMIS* EN ERLLENMEYER ET EN BIORÉACTEUR

ANNEXE 2 DONNÉES SUR L'ÉTUDE DE L'INOCULUM

ANNEXE 3 DONNÉES SUR LA COMPARAISON DE LA CROISSANCE ET DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE *B. LICHENIFORMIS* DANS LES BOUES À 25 g/L DE MES ET DANS LE MILIEU SYNTHÉTIQUE

ANNEXE 4 DONNÉES SUR L'EFFET DE LA CONCENTRATION EN MES DES BOUES D'ÉPURATION SUR LA CROISSANCE DE *BACILLUS LICHENIFORMIS* ET SUR L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE

ANNEXE 5 DONNÉES SUR L'EFFET DU PRÉ-TRAITEMENT HYDROLYTIQUE DES BOUES D'ÉPURATION SUR LA CROISSANCE DE *BACILLUS LICHENIFORMIS* ET SUR L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Principales classes d'enzymes selon meunier (1999).	5
Tableau 2	Classification des protéases (Rao <i>et al.</i> , 1998).	6
Tableau 3	Distribution des ventes d'enzymes par secteurs industriels en 1995 (Godfrey et West, 1996).	13
Tableau 4	Nouveaux microorganismes producteurs de protéases aux propriétés intéressantes faisant l'objet de travaux de recherche.	14
Tableau 5	Substrats alternatifs pour la production de protéases faisant l'objet de travaux de recherche.	15
Tableau 6	Métabolites d'intérêt commercial produits par <i>Bacillus licheniformis</i>	17
Tableau 7	Caractéristiques physico-chimiques des boues secondaires de la CUQ.	45
Tableau 8	Valeurs des différents paramètres lors des fermentations en erlenmeyer et en bioréacteur dans les boues secondaires de la CUQ (25 g/L de MES).....	48
Tableau 9	Moyenne des nombres maximums de cellules et de spores et des taux de croissance spécifiques maximums obtenus pour les fermentations effectuées dans les boues à 25 g/L de MES et inoculées avec des pré-cultures d'âges variables.	58
Tableau 10	Moyenne des nombres maximums de cellules et de spores et des taux de croissance spécifiques maximums obtenus pour les fermentations effectuées dans les boues à 25 g/L avec différents volumes d'inoculation.	61
Tableau 11	Comparaison du μ_m , du nombre maximum de cellules et de spores et de l'activité protéolytique obtenus lors de fermentations dans les boues à différentes concentrations en MES	72
Tableau 12	Comparaison des μ_m et du nombre maximum de cellules et de spores obtenus lors des fermentations dans les boues hydrolysées et non hydrolysées.	82
Tableau 13	Activités protéolytiques maximums obtenues lors des fermentations dans les boues hydrolysées et non-hydrolysées	85
Tableau 14	Valeurs maximums des paramètres associés au transfert d'oxygène lors de différents essais de fermentation dans les boues.	88

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Courbe de croissance microbienne en mode discontinu.	19
Figure 2	Évaluation de la vitesse de consommation d'oxygène (Q_{O_2X}) à partir de la pente de la courbe d'évolution de l'oxygène dissous en fonction du temps.	39
Figure 3	Estimation du coefficient de transfert d'oxygène (K_La) à partir de la pente de la courbe de l'évolution de l'oxygène dissous en fonction de ($dC/dt + Q_{O_2X}$).	39
Figure 4	Évolution du nombre de cellules de <i>B. licheniformis</i> en fonction du temps lors de deux fermentations en erlenmeyer et en bioréacteur dans les boues à 25 g/L de MES ayant été inoculées à 3 % (v/v) avec une pré-culture en boue âgée de 12 h. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 7 %.	47
Figure 5	Évolution du nombre de cellules de <i>B. licheniformis</i> en fonction du temps lors d'une fermentation effectuée en erlenmeyer, dans les boues à 25 g/L de MES ayant été inoculées à 3 % (v/v) avec une culture de départ en bouillon nutritif âgée de 12 h.	52
Figure 6	Évolution du nombre de cellules de <i>B. licheniformis</i> en fonction du temps lors d'une fermentation effectuée en erlenmeyer, dans les boues à 15 g/L de MES ayant été inoculées à 3% (v/v) avec une culture de départ en bouillon nutritif âgée de 12h.	54
Figure 7	Évolution du nombre moyen de cellules (a) et de spores (b) de <i>B. licheniformis</i> lors de fermentations en erlenmeyer dans les boues secondaires de la CUQ (25 g/L de MES). Boues inoculées à 3% (v/v) avec des pré-cultures en boue (15 g/L de MES) âgées de 9 h, 12 h ou 15 h. Essais effectués en triplicata. Les écarts-types ont été déterminés à partir des valeurs obtenues lors des trois essais.....	57
Figure 8	Évolution du nombre moyen de cellules (a) et de spores (b) de <i>B. licheniformis</i> obtenues lors de fermentations effectuées en erlenmeyer, dans les boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES. Boues inoculées avec différents volumes d'une pré-culture préparée dans des boues à 15 g/L de MES et âgée de 12 h. Essais effectués en triplicata. Les écarts-types ont été déterminés à partir des valeurs obtenues lors des trois essais.	60
Figure 9	Évolution du nombre de cellules et de spores viables de <i>B. licheniformis</i> en fonction du temps lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues à 25 g/L de MES et dans un milieu synthétique de référence ayant été inoculés avec un inoculum amélioré. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 7 %.	64
Figure 10	Évolution de l'activité protéolytique lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues à 25 g/L de MES et dans le milieu synthétique ayant été inoculés avec un inoculum amélioré. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 5 %.	66
Figure 11	Relation entre la concentration de spores et l'activité protéolytique obtenue pour le milieu synthétique et les boues à 25 g/L de MES.	69
Figure 12	Évolution du nombre de cellules (a) et de spores (b) de <i>B. licheniformis</i> lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues secondaires de la CUQ à différentes concentrations en MES ayant été inoculées avec un inoculum amélioré. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 7 %.	71
Figure 13	Évolution de l'activité enzymatique lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues à différentes concentrations en MES ayant été inoculées avec un inoculum amélioré. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 5 %.	73

Figure 14	Évolution de K_{La} , de l'OTR de l'OUR (a) et de l'agitation et de l'aération (b) lors d'une fermentation en bioréacteur effectuée dans les boues à 25 g/L de MES.	75
Figure 15	Évolution de K_{La} , de l'OTR de l'OUR (a) et de l'agitation et de l'aération (b) lors d'une fermentation en bioréacteur effectuée dans les boues à 35 g/L de MES.	76
Figure 16	Relation entre la concentration de spores et l'activité protéolytique obtenue pour les différents essais réalisés dans les boues à différentes concentrations en MES.....	79
Figure 17	Évolution du nombre de cellules et de spores viables de <i>B. licheniformis</i> en fonction du temps lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues hydrolysées à 25 et 35 g/L de MES. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 7 %.....	81
Figure 18	Évolution de l'activité enzymatique lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans des boues à 25 g/L et 35 g/L de MES hydrolysées et non hydrolysées. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 5 %.....	83
Figure 19	Relation entre la concentration de spores et l'activité protéolytique obtenue dans les boues hydrolysées et non-hydrolysées à 25 et 35 g/L de MES.....	84
Figure 20	Évolution de K_{La} , de l'OTR, de l'OUR (a) et de l'agitation et de l'aération (b) lors d'une fermentation en bioréacteur effectuée dans les boues à 25 g/L de MES hydrolysées.	86
Figure 21	Évolution de K_{La} , de l'OTR, de l'OUR (a) et de l'agitation et de l'aération (b) lors d'une fermentation en bioréacteur effectuée dans les boues à 35 g/L de MES hydrolysées.	87

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CUQ	Communauté urbaine de Québec
DO	Oxygène dissous (<i>Dissolved Oxygen</i>)
K_{La}	Coefficient de transfert d'oxygène volumétrique (heure ⁻¹)
MES	Matières en suspension
MSV	Matières solides volatiles
MVES	Matières volatiles en suspension
OTR	Taux de transfert d'oxygène (<i>Oxygen Transfer Rate</i>) (mmol/L/heure)
OUR	Taux de consommation d'oxygène (<i>Oxygen Uptake Rate</i>) (mmol/L/heure)
ST	Solides totaux
t_g	Temps de génération (heure)
μ_m	Taux de croissance spécifique maximum (heure ⁻¹)
UFC	Unité formatrice de colonie
U.I.	Unité internationale

INTRODUCTION

La pollution environnementale causée par l'utilisation industrielle de produits chimiques est toujours un sujet d'actualité. Les alternatives biologiques, compatibles avec l'environnement, sont de plus en plus privilégiées. Parmi ces alternatives, l'emploi d'enzymes industrielles est très profitable à la fois sur le plan énergétique et l'aspect environnemental. Jusqu'au début des années 1960, l'emploi des enzymes en industrie est demeuré très limité. Cependant, au cours des années suivantes, le développement de nouvelles applications a accru la demande pour ces enzymes. Actuellement, l'industrie des enzymes est en pleine progression et son chiffre d'affaire global croît à un rythme accéléré.

La plus grande partie du marché des enzymes est liée aux enzymes de type hydrolytique comme les protéases, les lipases et les cellulases. Les protéases produites par *Bacillus licheniformis*, utilisées majoritairement dans les détergents, occupent présentement une part importante du marché mondial. Cependant, la compétitivité des enzymes par rapport aux produits chimiques est limitée par leurs coûts de production plus élevés. Afin d'assurer son expansion, il est indispensable que l'industrie parvienne à produire des enzymes à des coûts moindres. Comme une grande partie des coûts de production provient du milieu de culture utilisé, l'emploi d'un milieu de culture moins coûteux et stimulant la production de protéases permettrait d'abaisser considérablement les coûts de production.

Les boues d'épuration des eaux usées municipales constituent un substrat potentiel intéressant et bon marché pour la production de protéases. En effet, reconnues depuis longtemps pour leurs propriétés fertilisantes et souvent éliminées par épandage, les boues d'épuration ont le potentiel de devenir une matière première abondante, économique et porteuse de caractéristiques nutritives stimulantes pour l'obtention de plusieurs produits microbiens. En fait, les travaux du *Groupe de recherche en assainissement et en technologies environnementales* du Centre Eau, Terre et Environnement de l'institut national de la recherche scientifique (INRS-ETE) ont démontré que ces boues ont un potentiel nutritif capable de supporter la croissance de différents microorganismes permettant leur bioconversion en produits à valeur ajoutée. Des procédés de production de bioinsecticides, de biofertilisants et de bioplastiques ont été développés ou sont en voie de l'être. Des travaux antérieurs effectués en erlenmeyer ont démontré que les boues d'épuration municipales peuvent soutenir la croissance de *Bacillus licheniformis* et présentent un potentiel intéressant pour la production de protéases (Meunier, 1999). Cependant, des paramètres comme la physiologie de l'inoculum et la concentration en matière en suspension (MES) des boues n'ont pas été étudiés lors de ces travaux. Il s'agit de paramètres importants en culture microbienne pour maximiser la croissance bactérienne dans les boues d'épuration (Lachhab *et al.*, 2001; Sacheveda *et*

al., 1999). Également, la production de protéases en erlenmeyer est limitée en raison du pH et de l'aération qui ne sont pas contrôlés durant la culture microbienne. Il y a donc intérêt à poursuivre les études sur la production de protéases dans les boues d'épuration en conditions contrôlées de pH et d'oxygène dissous (bioréacteur). L'objectif principal de ce travail consiste donc à étudier ces paramètres afin d'accroître les rendements de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis*, sous des conditions contrôlées de pH et d'oxygène dissous (DO), en utilisant les boues d'épuration municipales comme substrat de fermentation.

L'intérêt de ces travaux est double. Dans un premier temps, ils visent à produire des protéases à moindres coûts, selon les procédures conventionnelles de culture microbienne en bioréacteur, en employant un substrat abondant et peu dispendieux. En second lieu, les percées commerciales et les gains financiers escomptables découlant des protéases issues de ce bioprocédé permettraient de réduire considérablement les coûts de gestion des boues d'épuration.

Dans le cadre du présent travail, l'influence de différents facteurs sur la production de protéases, tels que le contrôle du pH et de l'aération, la physiologie de l'inoculum et la concentration de la matière en suspension (MES) des boues a été étudiée. De plus, un pré-traitement hydrolytique des boues a été expérimenté. En effet, des travaux précédents portant sur la production de bioinsecticides dans les boues ont démontré que ce pré-traitement s'avère une stratégie efficace pour améliorer la production de dérivés microbiens.

Ce mémoire se divise en 6 sections. La revue de littérature est présentée en deux chapitres. Le premier chapitre traite de notions générales concernant les protéases. Le second chapitre traite des aspects importants reliés aux procédés de production de protéases et du potentiel des boues d'épuration pour la production de protéases. Les deux chapitres suivants présentent les objectifs et les hypothèses de recherche, ainsi que la méthodologie employée. Le cinquième chapitre présente les résultats obtenus et l'analyse de ces résultats. La dernière section est consacrée aux conclusions et aux recommandations pour les travaux futurs.

CHAPITRE 1: GÉNÉRALITÉS ET APPLICATIONS DES PROTÉASES

Ce chapitre présente un ensemble des connaissances concernant les protéases, en particulier une description des différents types de protéases et des secteurs industriels employant les protéases, quelques données sur l'importance économique des protéases utilisées en industrie et un survol des efforts de recherche actuellement en cours dans le secteur des enzymes industrielles.

1.1 Rôle et actions des enzymes

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

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

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



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

1.2 Origine des enzymes industrielles

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

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

1.3 Enzymes protéolytiques

Les enzymes peuvent être divisées en plusieurs classes selon leur action spécifique. Chacune des six classes principales est décrite dans le Tableau 1 (Meunier, 1999).

Tableau 1 Principales classes d'enzymes selon Meunier (1999).

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

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

Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur site d'action, soit les protéases intracellulaires et extracellulaires. Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques comme la sporulation et la différenciation, la maturation d'hormones et d'enzymes, et la maintenance du pool de protéines cellulaires. Ce type de protéase est moins intéressant à utiliser en industrie car ces enzymes nécessitent une étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Les protéases extracellulaires, excrétées à l'extérieur de la cellule, sont importantes pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement extérieur de la cellule et aident ainsi la cellule à absorber et à utiliser les produits de cette hydrolyse (Kalisz, 1988). Ces enzymes sont plus intéressantes à utiliser en industrie car elles ne nécessitent pas d'étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Une centrifugation suffit pour les séparer des cellules.

Les protéases se différencient également selon leur mode d'action: les endopeptidases et les exopeptidases. Les deux types de protéases sont divisés en plusieurs classes et sous-classes. Le Tableau 2 présente les classes et sous-classes de protéases.

Tableau 2 Classification des protéases (Rao *et al.*, 1998).

Type de protéase	Classes et sous-classes
Exopeptidases	Aminopeptidases
	– Peptidyle peptidase
	– Dipeptidyle peptidases
	– Tripeptidyle peptidases
	Carboxypeptidases
	– Sérine carboxypeptidase
	– Metallocoarboxypeptidase
– Cystéine carboxypeptidase	
Endopeptidases	Protéases sérines
	Protéases cystéines ou protéases thiols
	Protéases aspartiques ou protéases acides
	Métallo-protéases

1.3.1 Exopeptidases

Les exopeptidases sont des protéases qui hydrolysent les liens peptidiques près des extrémités N ou C-terminales des protéines. Il existe deux classes d'exopeptidases : les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Ces enzymes sont très peu utilisées en industrie.

1.3.1.1 Aminopeptidases

Les aminopeptidases sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité N-terminale des protéines. Elles libèrent ainsi un seul acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide, d'où les sous-classes. Beaucoup d'aminopeptidases sont spécifiques aux protéines ayant un résidu méthionine en position N-terminale, qui est alors libéré sous l'action de ses protéases (Rao *et al.*, 1998).

1.3.1.2 Carboxypeptidases

Les carboxypeptidases sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité C-terminale des protéines. Elle libère ainsi un seul acide aminé ou un dipeptide. Les carboxypeptidases sont divisées en trois sous-classes, soit les sérines carboxypeptidases, les métallo-carboxypeptidases et les cystéines carboxypeptidases, selon la nature des acides aminés présents au site actif de l'enzyme et selon leur mécanisme catalytique (Rao *et al.*, 1998).

1.3.2 Endopeptidases

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

1.3.2.1 Protéases cystéines

Les protéases cystéines, ou thiols, sont très peu utilisées en industrie. Ces protéases sont présentes autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. La plupart des protéases de cette classe sont activées seulement en présence d'agents réducteurs comme la cystéine ou l'acide cyanhydrique. Leur activité n'est pas affectée en présence de di-isopropylfluorophosphonate (DFP) et d'agents chélatant, mais elle est inhibée par la présence d'agents sulfhydryles comme le p-chloromercuribenzoate (PCMB) (Rao *et al.*, 1998). La papaïne, d'origine végétale, est la seule protéase de cette famille employée de façon significative en industrie.

1.3.2.2 Métallo-protéases

Les métallo-protéases forment un groupe de protéases très variées. Ces enzymes contiennent un ion métallique divalent, le plus souvent le Zn^{2+} , nécessaire à leur activité. Les métallo-protéases sont habituellement des protéases dites neutres, ayant un pH optimum se situant près de 7,0. Toutefois, certaines métallo-protéases sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de 10 (Rao *et al.*, 1998). La stabilité de ces protéases augmente considérablement si des ions Ca^{2+} sont ajoutés au milieu et diminue lorsque des agents séquestrants sont ajoutés. Ainsi, ces protéases sont inactivées en présence d'agents chélateurs forts (ex: EDTA), qui enlèvent le Zn^{2+} , alors que l'enlèvement des ions Ca^{2+} affecte

seulement leur thermostabilité. Les métallo-protéases sont formées par plusieurs espèces du genre *Bacillus*, comme *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium* et *B. stearothermophilus* (Keay *et al.*, 1972). Elles sont également produites par des moisissures comme *Aspergillus oryzae*.

1.3.2.3 Protéases aspartiques

Les protéases aspartiques, également connues sous le nom de protéases acides, sont des protéases dont l'activité catalytique dépend d'un résidu acide aspartique présent au site actif de l'enzyme. La plupart des protéases aspartiques ont une activité maximale à de faibles pH, généralement entre 3 et 4. Leur masse moléculaire se situe généralement entre 30 et 45 kDa (Rao *et al.*, 1998). Ces protéases acides ne sont pas inhibées par le DFP et le fluorure de phénylméthylsulphonyl (PMSF), ni par les réactifs avec des groupements thiols, comme le PCMB. Ces enzymes présentent un intérêt industriel dans les secteurs où l'hydrolyse des protéines à faible pH est désirée.

1.3.2.4 Protéases sérines

Les protéases sérines sont une sous-classe d'endopeptidases d'une grande importance au niveau industriel. La très grande majorité des protéases alcalines, très employées en industrie, sont des protéases de type sérine. Ces protéases sont caractérisées par la présence d'un résidu sérine au niveau de leur site actif, ainsi que de résidus aspartate et histidine formant le complexe actif avec le résidu sérine. Elles sont présentes chez les virus, les bactéries et les eucaryotes. Ces protéases ont généralement un pH optimal de 10, mais il peut varier entre 7 et 11. Ces enzymes sont inhibées par le DFP et le PMSF. Certaines protéases sérines sont aussi inhibées par des agents thiols, comme le PCMB, à cause de la présence d'un résidu cystéine près du site actif. Leur masse moléculaire se situe généralement entre 18 et 35 kDa. Certaines protéases sérines dépendent du Ca^{2+} pour leur stabilité. Elles sont divisées en trois groupes selon leur site d'attaque sur la protéine : (i) les protéases sérines de type trypsine, qui hydrolysent les protéines après un résidu chargé positivement, (ii) les protéases sérines de type chymotrypsine, qui hydrolysent les protéines après un résidu hydrophobe de haut poids moléculaire, et (iii) les protéases sérines de type élastase, qui hydrolysent les protéines après un résidu hydrophobe de faible poids moléculaire. La *Subtilisin Carlsberg* et la *Subtilisin Novo* sont les protéases alcalines les plus connues et utilisées. La protéase *Subtilisin Carlsberg*, produite par *Bacillus licheniformis* a été découverte en 1947. Elle est produite commercialement depuis 1960 par la compagnie Novo Nordsik (Danemark). La protéase est constituée d'une simple chaîne de peptide avec 274 résidus d'acides aminés. Le site actif est formé par les résidus Ser 221, His 64 et Asp 32. Contrairement à plusieurs protéases sérines, les ions Ca^{2+} ne sont pas nécessaires pour assurer la stabilité de la protéase. Le pH optimal est de 10 et la température optimale de

la protéase est de 50°C. Le poids moléculaire de la protéase est de 27,2 kDa. Quant à la *Subtilisin Novo*, produite par *Bacillus amyloliquefaciens*, elle contient 275 acides aminés. Il y d'ailleurs une homologie avec la *Subtilisin Carlsberg* puisque seulement 28 des 275 résidus d'acides aminés sont différents. Le site actif comprend les résidus Ser 221, His 54 et Asp 32. Son poids moléculaire est de 27,5 kDa (Rao *et al.*, 1998; Meunier, 1999; Polgar, 1989).

1.4 Applications industrielles des protéases

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Cette section trace donc un portrait des principaux secteurs industriels employant des protéases.

1.4.1 Industrie alimentaire

1.4.1.1 Préparation du fromage

L'industrie fromagère emploie une quantité importante de protéases (Rao *et al.*, 1998; Fogarthy et Kelly, 1990). Les protéases employées sont surtout des protéases acides. La majorité des protéases employées sont produites par *Mucor sp.*, *Bacillus subtilis* et *Endothica parasitica*. Elles sont utiles pour la coagulation des protéines du lait. La présure de veau a longtemps été l'enzyme utilisée à cette fin. Cependant, elle est de moins en moins utilisée car elle provient du système digestif de très jeunes veaux. Comme il n'est pas économiquement viable de tuer les veaux aussi jeunes, elle tend à être remplacée par des protéases microbiennes.

1.4.1.2 Boulangerie

La farine de blé est grandement utilisée en boulangerie. Cette farine contient du gluten, une protéine insoluble, qui est responsable des propriétés de la pâte. Les protéases de *Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten, à un degré plus ou moins important, selon les caractéristiques désirées de la pâte. Le traitement de la pâte facilite sa manipulation et permet la production d'une grande variété de produits. Également, des protéases d'origine bactérienne sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (Rao *et al.*, 1998).

1.4.1.3 Produits à base de soja

Des protéases neutres et alcalines sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Les modifications des protéines du soja par les protéases aident à

augmenter leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, le traitement de ces protéines par la protéase alcaline alcalase à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats de protéines solubles avec des propriétés nutritives très intéressantes. Ces hydrolysats sont utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans les formulations d'aliments diététiques (Rao *et al.*, 1998).

1.4.1.4 Synthèse de l'aspartame

L'aspartame est un dipeptide composé d'un résidu acide *L*-aspartique et d'un résidu *L*-phénylalanine. La configuration en *L* de la molécule est responsable du goût sucré. Le maintien de cette configuration est donc crucial, mais engendre des coûts très importants lorsque des méthodes de synthèse chimiques sont employées. La synthèse enzymatique de l'aspartame est donc préférable. Si les protéases sont considérées comme des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse, sous certaines conditions bien précises. Une préparation immobilisée de thermolysin provenant de *Bacillus thermoprotolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartame (Rao *et al.*, 1998).

1.4.2 Domaine pharmaceutique et médical

La grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. Également, des collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement de brûlures et de plaies. Une élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes (Kudrya et Simonenko, 1994). Enfin, une asparaginase provenant de *E. coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002a).

1.4.3 Tanneries

Dans la tannerie, le délainage enzymatique est utilisé depuis le début du siècle dernier et plusieurs souches microbiennes et diverses méthodes ont été suggérées (Meunier 1999). Les protéases sont utilisées pour leur capacité à libérer les poils et la laine des peaux. Cette opération se fait à des pH élevés, et nécessite donc des protéases alcalines, comme celles produites par *Bacillus licheniformis*. Après l'enlèvement des poils, les peaux subissent le reverdissage, étape essentielle afin de rendre la peau douce et élastique. Les préparations enzymatiques servant pour le reverdissage peuvent contenir des protéases de *A. oryzae*, *B. amyloliquefasciens* ou *B. licheniformis*. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi

est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients, dont des impacts majeurs sur la sécurité des travailleurs et sur l'environnement. De plus, le traitement des eaux usées de ces industries cause de sérieux problèmes. Par conséquent, l'emploi d'enzymes dans les procédés est maintenant privilégié. De plus, l'amélioration des procédés, la découverte et la mise au point de nouvelles protéases plus performantes permettent l'emploi grandissant des enzymes dans cette industrie (Meunier, 1999; Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002a; Kumar *et al.*, 1999).

1.4.4 Détergents

À l'heure actuelle, l'industrie des détergents est la plus grande utilisatrice de protéases. Le marché des détergents est aujourd'hui un marché très large qui englobe les détergents pour usage domestique (détergents à lessive, détergents à vaisselle), les produits de nettoyage pour usage industriel et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le plus important marché au niveau des détergents est de loin celui des détergents à lessive. À titre d'exemple, le marché de la protéase alcaline appelée « subtilisine » est estimé à plus de 200 millions US\$ (Demain, 2000) et la production à plus de 500 tonnes par année (Rao *et al.*, 1998). Les protéases jouent un rôle important dans l'efficacité des détergents. Dans les procédés de lavage, la chaleur, les conditions alcalines et la présence de surfactants et d'agents séquestrants vont suffire pour dissoudre ou disperser la plupart des saletés incrustées dans les tissus. Cependant, les saletés de nature protéique ne seront pas toujours enlevées par ces traitements. De plus, les protéines toujours accrochées aux tissus seront capables de retenir, par coagulation, d'autres composés. Par exemple, des taches composées de sécrétions corporelles et qui ne sont pas visibles à l'œil nu donneront après quelques lavages des vêtements ayant une apparence terne à cause de la capacité des protéines à coaguler d'autres particules. L'utilisation d'enzymes protéolytiques permet de résoudre ce problème. Les protéases hydrolysent les protéines dissoutes et coagulées et les composés solubles qui en résultent seront facilement rincés hors du tissu (Meunier, 1999; Fogarthy et Kelly, 1990).

Aujourd'hui, les préparations d'enzymes pour les détergents sont sous forme liquide ou granulaire. Les granules sont généralement formés de la façon suivante : un noyau contient les enzymes et est entouré d'une enveloppe faite souvent de cire pour réduire le risque que de la poussière soit relâchée si les granules sont soumises à l'abrasion. Le noyau contient souvent des ligands et des fibres de cellulose pour rendre les granules plus résistantes et plus flexibles. Les préparations d'enzymes liquides sont conçues pour être incorporées facilement aux détergents liquides. Elles consistent pour la plupart du temps en une

solution claire d'enzymes dans un solvant fait d'eau et de propylène glycol. Des agents stabilisants sont aussi fréquemment ajoutés pour accroître la stabilité à long terme des préparations (Eriksen, 1996).

Outre les protéases, les détergents peuvent contenir des lipases, des amylases et des cellulases (Ito *et al.*, 1998; Eriksen, 1996). Néanmoins, les protéases sont les enzymes les plus utilisées dans les détergents. La grande majorité sont des protéases sérines alcalines et thermophiles. En effet, les protéases doivent souvent agir à des pH et à des températures élevées, particulièrement dans le cas des détergents à lessive.

Les protéases incorporées aux détergents doivent avoir une activité protéolytique appréciable à des températures et pH élevés, être compatibles avec la force ionique élevée des détergents et avoir une bonne durée de conservation. À ce propos, l'industrie fait face à un nouveau défi. En effet, les détergents sous forme liquide sont de plus en plus populaires et les préparations liquides d'enzyme ont une durée de conservation beaucoup moins longue que les préparations sous forme de granules. Les industries mettent beaucoup d'effort à mettre au point des préparations liquides d'enzymes qui auront une durée de conservation beaucoup plus longue.

Le marché des détergents est un marché en constante évolution. Bien que l'emploi des enzymes dans les détergents, et plus particulièrement des protéases, est un concept relativement simple et connu depuis longtemps, le défi de rendre les détergents davantage performants est encore très présent. Par exemple, des efforts de recherches s'intensifient pour découvrir de nouvelles enzymes et de nouvelles formulations (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002a; Eriksen, 1996).

1.4.5 Traitement des eaux usées industrielles

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. En effet, les protéases peuvent traiter les rejets riches en protéines. Des essais effectués dans différentes industries alimentaires produisant des rejets riches en protéines ont donné des résultats très intéressants, qui permettent de constater le potentiel des protéases pour le traitement de ces déchets (Kumar *et al.*, 1999). Dalev (1994) a utilisé des protéases alcalines provenant de *B. subtilis* pour le traitement des rejets semi-solides des abattoirs de volailles. Des protéases sont aussi utilisées pour traiter les eaux usées riches en kératine provenant des chaînes d'abattage de volailles (Ichida *et al.*, 2001). Enfin, une préparation à base d'enzymes de *B. subtilis*, *B. amyloliquefasciens* et *Streptomyces sp.* est commercialement disponible pour le nettoyage des drains domestiques (Gupta, 2002a).

1.5 Marché des protéases

Grâce aux progrès importants des trente dernières années, l'industrie des enzymes est en pleine progression puisque son chiffre d'affaires global a connu une importante augmentation depuis le début des années 80. En effet, le marché mondial des enzymes industrielles était estimé à 400 millions US\$ en 1983, à 720 millions US\$ en 1990 alors qu'en 1995, le marché atteignait le cap du milliard US\$. En 2000, le marché était évalué à plus de 1,6 milliards US\$ et il est prévu qu'en 2005, le marché mondial des enzymes se situera entre 2 et 2,5 US\$ (Barnabé, 2003; Godfrey et West, 1996). Ces chiffres excluent le marché des enzymes thérapeutiques et médicales comme les enzymes pour les techniques moléculaires (exemple : la *taq* polymérase détenant un marché de 80 millions US\$). Comme mentionné précédemment, les ventes d'enzymes sont distribuées dans plusieurs secteurs différents. Le Tableau 3 fait état de la distribution des ventes d'enzymes.

Tableau 3 Distribution des ventes d'enzymes par secteurs industriels en 1995 (Godfrey et West, 1996).

Industries	Pourcentage (%)
Détergents	32
Amidon	15
Produits laitiers	14
Textiles	10
Autres	29

De toutes les enzymes industrielles, les protéases sont de loin le groupe le plus important. En effet, les protéases représentent à elles seules entre 35-40% du total des ventes d'enzymes et la dominance des protéases dans le marché des enzymes industrielles devrait s'accroître d'ici 2005 (Rao *et al.*, 1998; Ferrero et al., 1996). À l'heure actuelle, la plus grande part du marché des enzymes est occupée par les protéases alcalines, principalement à cause de leur utilisation dans le marché des détergents. En effet, de toutes les protéases produites, 70 à 80 % sont destinées au marché des détergents. Les protéases alcalines issues principalement de *Bacillus licheniformis* sont très utilisées dans les détergents et occupent une grande part du marché (Godfrey et West, 1996).

1.6 Tendances en recherche et développement pour la production de protéases

1.6.1 Nouvelles souches productrices de protéases

Des efforts en recherche et développement sont présentement en cours afin de créer de nouveaux produits à base d'enzymes. Ainsi, de nombreux efforts sont orientés vers la biologie moléculaire afin de modifier les souches productrices de façon à les rendre plus performantes pour la production de protéases et de façon à améliorer les caractéristiques catalytiques des protéases produites. Ces efforts ont pour but d'améliorer les performances des procédés et d'accroître davantage l'étendue des applications enzymatiques (Barnabé, 2003). Également, de nouvelles souches productrices de protéases aux propriétés intéressantes font l'objet de nombreux travaux de recherche. Le Tableau 4 en donne quelques exemples.

Tableau 4 Nouveaux microorganismes producteurs de protéases aux propriétés intéressantes faisant l'objet de travaux de recherche.

Souches bactériennes	Caractéristiques de la protéase	Référence
<i>Nocardiopsis sp.</i>	Protéase très stable en présence de surfactants et d'agents blanchissants	Moreira <i>et al.</i> (2002)
<i>Bacillus sp.</i>	Protéase hautement thermostable avec pic d'activité à 90°C	Kaur <i>et al.</i> (2001)
<i>Bacillus horikoshii</i>	Nouvelle protéase alcaline	Joo <i>et al.</i> (2002)
<i>Bacillus sp.</i>	Protéase très stable en présence d'agents blanchissants	Gupta <i>et al.</i> (1999)
<i>Bacillus brevis</i>	Nouvelle protéase alcaline thermostable	Banerjee <i>et al.</i> (1999)
<i>Bacillus sphaericus</i>	Nouvelle protéase stable en présence de chlorure	Singh <i>et al.</i> (1999)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Nouvelle souche qui produit des kératinases	Manczinger <i>et al.</i> (2003)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Nouvelle protéase alcaline thermostable	Rahman <i>et al.</i> (1994)
<i>Bacillus mojavensis</i>	Protéase alcaline stable en présence d'agents blanchissants.	Beg <i>et al.</i> (2002)
<i>Bacillus subtilis</i> K2	Capacité du microorganisme de croître dans des effluents de tannerie et protéase efficace pour le traitement des peaux	Hameed <i>et al.</i> (1999)
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Protozoaire produisant des protéases extracellulaires	Coninck <i>et al.</i> (2000)
<i>Bacillus clausii</i>	Microorganisme capable de croître dans des conditions hautement alcalines	Denizci <i>et al.</i> (2004)

1.6.2 Production de protéases dans les milieux de culture alternatifs

Bien que les enzymes présentent de nombreux avantages au niveau industriel et environnemental, leurs marchés sont peu développés car l'offre est faible et la domination des produits chimiques moins dispendieux décourage les investissements pour leur commercialisation (Barnabé, 2003). Afin de rendre les enzymes plus compétitives par rapport aux produits chimiques, il est essentiel d'en abaisser les coûts de production. Pour la production des protéases, 30 à 40% des coûts de production sont reliés au substrat de production employé (Kumar et Parrack, 2003; Joo *et al.*, 2002). Généralement, les protéases sont produites dans des milieux synthétiques complexes (Gupta *et al.*, 2002b). Donc, afin de réduire leurs coûts de production, des efforts de recherche sont orientés dans le but de trouver des substrats alternatifs moins coûteux et efficaces pour la production des enzymes. À cet effet, l'utilisation de matières tertiaires en tant que substrats alternatifs, disponibles en grandes quantités et à coûts moindres, serait une solution qui amènerait des diminutions importantes dans les coûts de production. Le Tableau 5 présente quelques substrats alternatifs faisant l'objet de recherches pour la production de protéases.

Tableau 5 Substrats alternatifs pour la production de protéases faisant l'objet de travaux de recherche.

Substrat	Microorganisme employé	Référence
Liqueurs résiduelles de maïs	<i>Bacillus sp.</i>	Barnabé (2003), Mabrouk <i>et al.</i> (1999)
Résidus d'amidon végétal	<i>Bacillus lentus</i>	Ganesh Kumar et Parrack (2003)
Sang de bovin	<i>Mucor sp.</i>	Barnabé (2003)
Hydrolysats de résidus de poisson	<i>Bacillus subtilis</i>	Ellouz <i>et al.</i> (2001)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ellouz <i>et al.</i> (2003)
Petit lait	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	De Souza <i>et al.</i> (2001)
Mélasses de canne à sucre	<i>Bacillus subtilis</i>	Calik <i>et al.</i> (2004)

Dans cette optique de diminution des coûts de production, Tyagi *et al.*, du Groupe de recherche en assainissement de l'INRS-ETE, proposent d'employer des boues d'épuration municipales pour la production de protéases et de plusieurs autres produits à valeur ajoutée. Les travaux réalisés au sein de ce groupe de recherche sont présentés à la section 2.5.

Ce chapitre a fait état de différentes protéases aux applications multiples. Bien que les marchés se développent rapidement, les procédés de production de protéases font toujours l'objet d'études afin d'accroître les rendements de production ainsi que de diminuer les coûts de production et de purification. Une revue de littérature touchant les aspects reliés à la production de protéases est présentée dans le chapitre suivant. Dans ce chapitre, l'accent sera mis sur la production de protéases alcalines par *B. licheniformis*, qui fait l'objet du présent travail.

CHAPITRE 2: PRODUCTION DE PROTÉASES ALCALINES PAR *BACILLUS LICHENIFORMIS*

2.1 *Bacillus licheniformis*

2.1.1 Caractéristiques générales

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

Bacillus licheniformis se distingue par sa capacité à produire de nombreux métabolites d'intérêt commercial, énumérés au Tableau 6 (Archana *et al.*, 2003, Meunier, 1999; Perego *et al.*, 2003).

Tableau 6 Métabolites d'intérêt commercial produits par *Bacillus licheniformis*.

Classes	Métabolites
Enzymes	Protéases
	Alpha-amylases
	Pénicillinases
	Cellulases
Antibiotiques	Bacitracines
Solvants	Butylène-glycol, glycérol
Polypeptides	D-glutamylpolypeptides

À l'heure actuelle, *B. licheniformis* est principalement utilisé pour la production de protéases alcalines. Les protéases alcalines produites par *B. licheniformis* sont des protéases de type sérine (Calik *et al.*, 1998, 1999 et 2000a).

2.1.2 Croissance et métabolisme

Bacillus licheniformis tire son énergie de molécules organiques et utilise préférentiellement les glucides comme source d'énergie et de carbone. Durant la croissance, *B. licheniformis* catabolise les glucides présents dans la cellule en l'un des intermédiaires des principales voies de dégradation des glucides, soit la voie d'Embden-Meyerhof (glycolyse) et la voie des pentoses-phosphates (Deutscher *et al.*, 2002). Comme plusieurs de ces intermédiaires sont des acides organiques, leur accumulation peut contribuer à la diminution du pH du milieu de culture durant la croissance. *B. licheniformis* assimile préférentiellement l'azote sous forme de NH_4^+ , mais il peut utiliser une grande variété de composés comme source d'azote. *B. licheniformis* croît de façon optimale en milieu aérobie, mais peut croître en anaérobiose, grâce à sa capacité de fermenter les sucres ou, en dernier recours, en effectuant la respiration anaérobie avec le nitrate comme accepteur final d'électron (Fisher et Débarbouillé, 2002). *B. licheniformis* peut croître sur une grande plage de température, de 20°C jusqu'à 60°C. Par contre, les températures optimales pour la production de protéases alcalines varient de 35°C à 60°C, selon les souches (Gupta *et al.*, 2002a). Le pH optimal de croissance varie entre 7,0 et 7,5.

Les fermentations ont le plus souvent cours en mode discontinu (« batch culture ») dans lequel le milieu de culture n'est pas régénéré (Atlas et Bartha, 1998; Meunier, 1999). Les procédés en continu ou en semi-continu ne sont pas couramment utilisés en industrie pour la production de protéases, même si certains procédés expérimentaux s'avèrent efficaces (Frankena *et al.*, 1985; Giesecke *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 2002a). En mode discontinu, *B. licheniformis* croît selon un modèle représenté graphiquement par une courbe ayant quatre phases bien distinctes (Figure 1) (Prescott *et al.*, 1995).

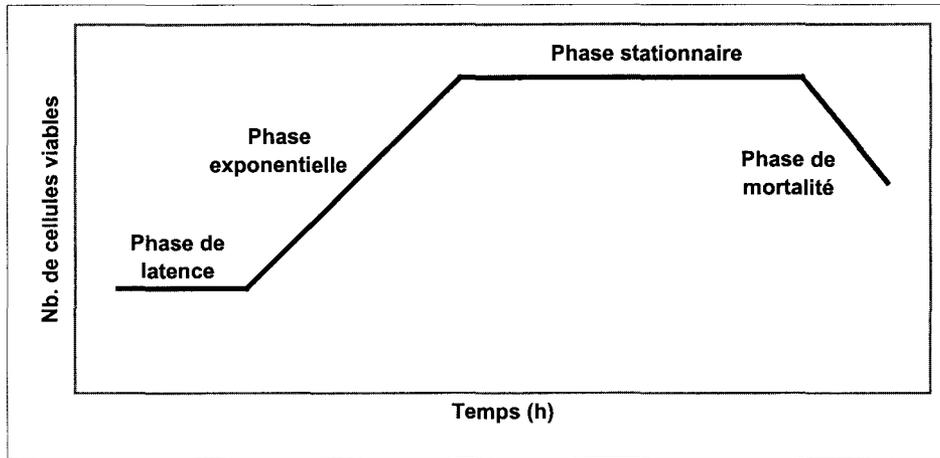


Figure 1 Courbe de croissance microbienne en mode discontinu.

Lors de l'inoculation d'un milieu de culture frais, les cellules ne se multiplient pas immédiatement. Cette période représente la phase de latence. Durant cette période, les cellules sont actives et procèdent à la synthèse de nouveaux constituants cellulaires de façon à s'adapter au nouveau milieu sans toutefois se multiplier. La durée de la période de latence est grandement influencée par la quantité et l'âge de l'inoculum ainsi que la composition du nouveau milieu par rapport à la composition du milieu d'origine. Suite à cette période d'adaptation, les microorganismes commencent à se multiplier. Ils entrent alors en phase de croissance exponentielle. À ce moment, la vitesse de croissance bactérienne est maximale. Les cellules se dédoublent à une vitesse et à un intervalle régulier. Durant cette phase, la population est homogène et chaque cellule possède pratiquement les mêmes propriétés chimiques et physiologiques.

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

2.2 Protéases de *B. licheniformis*

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

La première étape du catabolisme d'un acide aminé est une désamination qui lui retire son groupe aminé. Le groupe aminé est transféré sur une molécule accepteuse (un cétoacide). L'acide organique résultant de la désamination peut être converti en pyruvate, en acétyl-CoA ou en un intermédiaire du cycle des acides tricarboxyliques et oxydé pour libérer de l'énergie. Il peut aussi servir de source carbonée pour la synthèse de constituants cellulaires. L'excès d'azote provenant de la désamination est excrété sous forme d'ion ammonium, rendant ainsi le milieu alcalin (Prescott *et al.*, 1995).

B.licheniformis produit deux types de protéases extracellulaires : des protéases neutres et des protéases sérines alcalines (Calik *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1999). C'est au cours de la phase stationnaire que la production de protéases extracellulaires est maximale, alors qu'elle est pratiquement nulle dans les autres phases (Gupta *et al.*, 2002a et b; Calik *et al.*, 2000b). Durant la phase exponentielle, la cellule croît aux dépens des substrats les plus facilement assimilables, comme le glucose et les autres sucres. Par contre, au début de la phase stationnaire, les nutriments s'épuisent et les déchets métaboliques s'accumulent. La production de protéases s'enclenche donc en réponse à un stress causé par une limitation des nutriments et à des conditions de croissance qui deviennent difficiles (Calik *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002b).

Les mécanismes régulateurs de la synthèse des protéases ne sont pas encore bien connus. Comme la production de protéases est associée avec la phase stationnaire, qui est marquée par la transition entre la croissance végétative et la sporulation, certains avancent que la sporulation et la production de protéases seraient intimement reliés, *i.e.* que l'une ne pourrait se faire sans l'autre. Ainsi, l'analyse de mutants asporogènes montre que plusieurs ne produisent pas de protéases. La réversion de ces mutations permet aux cellules de retrouver la capacité de produire des protéases (Gupta *et al.*, 2002b; Doi, 1974).

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

Si les mécanismes régulateurs de la synthèse des protéases ne sont pas encore parfaitement connus, les facteurs biotiques et abiotiques qui influencent la production de protéases alcalines ont été largement étudiés. Les plus importants sont discutés dans les sections suivantes.

2.3 Facteurs biotiques influençant la production de protéases

Comme vu précédemment, la production de protéases par la cellule bactérienne peut être stimulée ou réprimée par certaines molécules. En fait, un substrat qui permet une bonne croissance végétative ne mène pas forcément à la production de grandes quantités de protéases. La production de ces protéases est grandement affectée par l'environnement extérieur de la cellule, dont la nature et la concentration des sources d'azote et de carbone. Il est donc nécessaire de connaître l'effet de ces facteurs sur la production de protéases alcalines afin de bien contrôler les procédés de production et de les rendre plus performants.

2.3.1 Influence de la source de carbone

Les milieux servant à la production de protéases en industrie sont généralement complexes et contiennent des concentrations élevées de sources de carbone et d'azote (Kumar *et al.*, 1999). Le choix de la source de carbone a une grande importance car il influence les performances du procédé. Une grande variété de substrats peut être utilisée, dont de nombreux glucides. L'emploi du glucose a été largement étudié. Il a été établi que le glucose inhibe la production de protéases par un mécanisme de répression catabolique (Ferrero *et al.*, 1996; Frankena *et al.*, 1985; Gupta *et al.*, 2002a; Kumar *et al.*, 1999; Puri *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 1991). En effet, lors d'une fermentation employant le glucose comme source de carbone, la production de protéases commence au moment où le glucose est épuisé dans le milieu (Ferrero *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 1999). Ensuite, si du glucose est ajouté au milieu, la production de protéases cesse immédiatement (Doi *et al.*, 1974). D'autres sucres simples peuvent aussi être utilisés et leurs effets sur la production de protéases sont variables. Par exemple, dans un milieu à base de soja, l'emploi de lactose ou de fructose à de faibles concentrations (3 à 4 %) permet une meilleure production de protéases que le même milieu comprenant une quantité équivalente de glucose. Par contre, une diminution dans la production de protéases est observée lorsque tous ces sucres sont présents en plus grandes concentrations (Mabrouk *et al.*, 1999). D'ailleurs, dans les pratiques commerciales de production de protéases avec *Bacillus sp.*, il est reconnu que de grandes concentrations de sucre dans les milieux de culture inhibent la production de protéases (Kumar *et al.*, 1999). Comme la concentration des substrats carbonés influe sur les performances des procédés, cela tend à démontrer l'influence du rapport C/N sur la production de protéases (Gupta *et al.*, 2002a). En revanche, le sucrose, le maltose et le xylose donnent des rendements

très faibles à nuls (Ferrero *et al.*, 1996; Mabrouk *et al.*, 1999). En contradiction avec tous ces résultats, Fujiwara *et al.* (Mabrouk *et al.*, 1999) ainsi que Sinha *et al.* (1991), ont observé que le lactose et le fructose étaient moins efficaces que le glucose pour la production de protéases.

Également, des substrats plus complexes peuvent être employés. C'est le cas notamment de l'amidon. En effet, un milieu soja employant l'amidon comme source de carbone permet une meilleure production de protéases que le fructose et le lactose. L'amidon peut aussi être remplacé par le son de blé et les résultats demeurent très intéressants (Sinha *et al.*, 1991). Dans les essais de Summant *et al.* (Puri *et al.*, 2002), l'amidon permet une production supérieure à la pectine, au son de blé et au glucose. Par contre, dans les essais menés par Mabrouk *et al.* (1999) sur un milieu différent à base de soja, l'amidon donne des résultats inférieurs que lorsqu'il est remplacé par le glucose. La mélasse et la farine de maïs sont d'autres sources de carbone potentielles qui donnent aussi de faibles productions. Également, d'autres sources de carbone de nature protéique peuvent être employées. Ainsi, la caséine permet une bonne production de protéases. Ferrero *et al.* (1996) ont observé une augmentation de la production de protéases alcalines en remplaçant dans leur milieu le glucose par la caséine. Le petit lait est aussi une source de carbone alternative pour la production de protéases alcalines (Kumar *et al.*, 1999).

2.3.2 Influence de la source d'azote

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

Généralement, de faibles productions de protéases sont obtenues avec l'emploi d'azote inorganique comme seule source d'azote. La synthèse d'enzymes est inhibée par la présence de sources d'azote inorganiques rapidement métabolisables comme les acides aminés et l'ion ammonium (Giesecke *et al.*, 1991; Kumar *et al.*, 1999). Le même phénomène est observé chez *B. subtilis* auquel *B. licheniformis* s'apparente étroitement (Kembhavi *et al.*, 1993). Par contre, quelques rapports indiquent l'absence de répression associée à l'usage de sels d'ammonium (Kumar *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1991). Avec

l'utilisation de sources d'azotes organiques, la production de protéases est généralement plus élevée. Par exemple, le soja est une excellente source d'azote qui permet d'obtenir une production plus élevée de protéases (Kumar *et al.*, 1999; Mabrouk *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1991). Des substrats comme les peptones, la caséine, l'extrait de bœuf, les liqueurs de maïs et le son de blé peuvent aussi être utilisés, mais la production n'est pas aussi élevée que celle observée avec du soja (Mabrouk *et al.*, 1999; Puri *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 1991).

2.3.3 Influence des éléments traces

Certains ions comme le calcium, le cobalt, le cuivre, le bore, le magnésium, le manganèse et le molybdène peuvent avoir un effet bénéfique sur la croissance de *B. licheniformis* et la production de protéases. Certains éléments comme le calcium contribuent à la stabilité des protéases (Kumar *et al.*, 1999). Le phosphate de potassium est utilisé comme source de phosphore dans la majorité des études et peut avoir un effet tampon sur le milieu de culture. De faibles concentrations (2 g/L) seraient optimales pour la production de protéases. En revanche, de plus grandes concentrations ont un effet inhibiteur sur la croissance et la production de protéases (Kembhavi *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 1999).

2.4 Facteurs abiotiques influençant la production de protéases

2.4.1 pH

Le pH est un facteur important qui influence la croissance des microorganismes (Prescott, 1995). Le pH a également une forte influence sur la production de protéases. Calik *et al.* (2002) ont démontré que le pH affecte les mécanismes de régulation métabolique de la production de protéases chez *B. licheniformis*. Également, Kembhavi *et al.* (1993) et Hameed *et al.* (1999) ont démontré que la production de protéases par *B. subtilis* est maximale lorsque le pH est contrôlé durant la culture microbienne. Des résultats semblables ont été observés dans plusieurs autres études (Gupta *et al.*, 2002b; Kumar *et al.*, 1999). De plus, des variations importantes de pH au cours de la fermentation peuvent mener à la désactivation des protéases excrétées dans le milieu (Kumar *et al.*, 1999). Il est donc nécessaire de maintenir en tout temps le pH à un niveau optimal lors de la fermentation afin d'obtenir de bons rendements de production de protéases.

2.4.2 Aération et agitation

L'agitation assure un environnement nutritionnel et physique homogène pour toutes les cellules. Un tel environnement est indispensable pour une production maximale de protéases (Calik *et al.*, 2000a). Des taux d'aération et d'agitation contrôlés et optimaux sont nécessaires afin d'assurer un transfert d'oxygène adéquat lors des fermentations. En effet, le transfert d'oxygène dans le milieu de culture est un des facteurs influençant de façon majeure la production de protéases (Calik *et al.*, 1998 et 2000a; Yezza *et al.*, 2004; Hameed *et al.*, 1999). Calik *et al.* (2000a) ont démontré que la mise au point d'une bonne stratégie de transfert d'oxygène par l'optimisation des paramètres d'agitation et d'aération permet d'augmenter de façon importante la quantité de protéases produites par *B. licheniformis* en milieu synthétique. L'optimisation des paramètres d'agitation et d'aération a également permis d'obtenir une production de protéases supérieure chez *B. subtilis* (Hameed *et al.*, 1999; Kembhawi *et al.*, 1993). Également, l'agitation et l'aération peuvent avoir un effet néfaste si elles sont maintenues à des niveaux trop élevés. En effet, il a été noté lors de plusieurs études que le maintien d'une agitation et d'une aération trop élevée augmente les forces de cisaillement dans le milieu de culture, ce qui peut mener à la dénaturation des protéases excrétées à l'extérieur de la cellule bactérienne (Calik *et al.*, 2000a; Hameed *et al.*, 1999).

2.5 Production de protéases dans les boues d'épuration

Le Tableau 5 du chapitre 1 fait état de plusieurs matières résiduelles d'origine agro-alimentaire qui ont fait l'objet d'études pour la production de protéases. Des études sur la production de protéases dans les boues d'épuration des eaux usées d'origine municipale ont aussi été réalisées par Meunier (1999) et Tyagi *et al.* (2002). Cette section traite de l'utilisation de boues d'épuration municipales comme substrat alternatif pour la production de protéases.

2.5.1 Problématique de la gestion des boues

Actuellement, les boues d'épuration des eaux usées municipales sont majoritairement éliminées par incinération et enfouissement sanitaire. Au Québec, de 1981 à 1994, la production annuelle de boues municipales est passée de 82 000 à environ 200 000 tonnes de boues sèches (Dufresne, 2004). Face à la congestion provoquée par l'augmentation rapide de la quantité de boues à gérer et la limitation des lieux et des méthodes pour en disposer, les coûts d'élimination des boues d'épuration s'accroissent rapidement. Ce phénomène incite les technologues à trouver des moyens de revaloriser ces matières. Les efforts de valorisation des boues d'épuration sont surtout axés sur la fabrication de fertilisants ainsi que sur la

production de méthane (Barnabé, 2004). Néanmoins, ces pratiques bien établies mettent en évidence le potentiel nutritif des boues d'épuration à supporter la croissance des microorganismes du sol et des plantes dans le cas de l'épandage agricole, et de la microflore indigène des boues dans le cas de la production de méthane par digestion anaérobie.

Dans ce contexte, le *Groupe de recherche en assainissement et en technologies environnementales* de l'INRS-ETE explore la capacité des boues à supporter la croissance de microorganismes industriels et la production de leurs dérivés microbiens d'intérêt commercial. Entre autres, la possibilité d'effectuer la bioconversion des boues d'épuration en biopesticides (*Bacillus thuringiensis*) a fait l'objet de plusieurs travaux et publications. Un procédé efficace est d'ailleurs en voie d'être mis au point (Tirado-Montiel, 1997, Sachdeva *et al.*, 1999 et 2000; Barnabé, 2000 et 2004, Yezza *et al.*, 2004, 2005 a, b et c). Plusieurs stratégies ont été développées afin de maximiser l'entomotoxicité des dérivés microbiens de *B. thuringiensis* produits dans les boues. Les travaux de Sachdeva *et al.* (1999 et 2000) ont démontré que la concentration des boues avait une grande influence sur les performances du procédé. Une concentration en MES des boues de 25 g/L permet d'obtenir les valeurs d'entomotoxicité les plus élevées en offrant aux microorganismes une quantité adéquate de nutriments sans perturber le transfert d'oxygène en raison de la faible viscosité du milieu. Les travaux de Lachhab *et al.* (2001) ont démontré qu'un inoculum préparé en deux étapes et comprenant une pré-culture en boues, cultivée sur 12 h, permet d'atteindre un nombre de cellules, de spores et de valeurs d'entomotoxicité plus élevés après une fermentation de 48 h. Également, ces travaux ont permis de démontrer qu'une inoculation du milieu de fermentation à 2 % ou 3 % permet d'obtenir les rendements maximaux au niveau du nombre de cellules, de spores et d'entomotoxicité. Ensuite, Barnabé (2004) a exploré l'application d'un pré-traitement physico-chimique des boues pour accroître la biodisponibilité des éléments nutritifs et accroître le rendement de la bactérie *B. thuringiensis* en termes de cellules, de spores et de toxines insecticides. L'auteur a étudié plusieurs pré-traitements et l'hydrolyse thermo-alcaline s'est avérée la plus efficace. Brar *et al.* (2004) ont démontré que l'hydrolyse des boues permet de dégrader les molécules complexes en molécules plus simples, ce qui en améliore la biodisponibilité pour la bactérie. Les auteurs ont également démontré que l'hydrolyse diminue la viscosité des boues, ce qui permet un meilleur transfert d'oxygène dans le milieu. Ceci a pour conséquences une meilleure croissance de la bactérie et une plus forte production de produit entomotoxique.

Un procédé de bioconversion des boues en biofertilisant à base de rhizobium est également à l'étude (Ben Rebah, 2001; Dufresne, 2004). Ben Rebah *et al.* (2004) ont réalisé des travaux portant sur la production de bioplastiques dans les boues d'épuration à partir de *B. thuringiensis* et de certains rhizobia. Les résultats ont démontré que ces bactéries produisent des quantités notables de polyhydroxybutyrates (PHB) lorsqu'elles sont cultivées dans les boues d'épuration.

2.5.2 Les boues d'épuration comme milieu de production de protéases

L'intérêt à valoriser les boues d'épuration, combiné à la nécessité de trouver un substrat alternatif bon marché pour la production de protéases (section 1.6.2), ont amené le *Groupe de recherche en assainissement et en technologies environnementales* de l'INRS-ETE à étudier la possibilité d'utiliser ces boues pour la production de protéases. Ainsi, des essais de production de protéases dans les boues d'épuration en utilisant *Bacillus licheniformis* ont été tentés par Meunier (1999). Ces travaux ont été réalisés en erlenmeyer. Les boues employées étaient les boues mixtes de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ) et les boues secondaires de la base militaire de Valcartier. Différents essais ont été menés dans les boues avec ou sans addition de sources de carbone et d'azote. Ces travaux ont permis de démontrer que les boues d'épuration peuvent supporter la croissance de *B. licheniformis*. Ces travaux ont également démontré qu'un apport externe en azote ammoniacal inhibe la production de protéases dans les boues, alors que l'addition d'une source protéique (farine de soja) aux boues n'influence pas significativement l'activité protéolytique. Également, il a été démontré que l'ajout d'une source de carbone aux boues (glucose ou dextrine) augmente l'activité protéolytique. Enfin, des essais ont été menés afin d'évaluer l'effet du contrôle du pH par différents tampons sur l'activité protéolytique. Les résultats ont démontré que le contrôle du pH pendant les essais permet d'obtenir des valeurs d'activité protéolytique supérieures.

Dans le même contexte, des travaux de Tyagi *et al.* (2002) ont porté sur la production simultanée d'entomotoxines et de protéases par *B. thuringiensis* à partir des boues d'épuration. L'entomotoxicité et l'activité protéolytique de *B. thuringiensis* étaient plus élevées dans les boues d'épuration en comparaison avec le milieu synthétique normalement utilisé pour produire industriellement la bactérie. Les protéases produites par *B. thuringiensis* ont également fait l'objet d'une caractérisation. Deux types de protéases ont été détectés : des protéases neutres et alcalines. Les travaux de Lamontagne (2004) ont porté sur la production simultanée d'entomotoxines et de protéases alcalines par des souches de *B. thuringiensis* isolées des boues d'épuration. Ces travaux ont démontré que certaines de ces souches permettent d'obtenir des valeurs d'entomotoxicité et d'activité protéolytique plus élevées dans les boues en comparaison avec la souche de *B. thuringiensis* de référence. Enfin, tous ces travaux ont permis de mettre en évidence le potentiel des boues d'épuration à supporter la production de protéases.

CHAPITRE 3: OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

3.1 Objectifs de recherche

Meunier (1999) et Tyagi *et al.* (2002) ont démontré que les boues d'épuration municipales représentent un substrat bon marché, riche en éléments nutritifs et capable de supporter la croissance de microorganismes producteurs de protéases. Le développement d'un procédé de production de protéases à partir des boues d'épuration serait intéressant puisqu'il permettrait d'en abaisser les coûts de production. De plus, l'emploi de boues d'épuration pour la production de produits à valeur ajoutée, comme les protéases, constitue une façon innovatrice de réutiliser ces rejets. Il s'agit alors d'un moyen de diversifier les filières de revalorisation, tout en générant des revenus par la vente d'enzymes à coût moindre.

Les travaux de Meunier (1999) ont démontré, d'une part, que les boues d'épurations supportent très bien la croissance de *Bacillus licheniformis* et, d'autre part, que le potentiel de production de protéases dans ce milieu est prometteur. Par contre, comme tous les essais de Meunier (1999) ont eu lieu en erlenmeyer, le procédé de production reste à être entièrement développé et optimisé. L'objectif de ce travail de recherche est donc d'accroître le rendement de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis*, sous des conditions contrôlées de pH et d'oxygène dissous (DO), en utilisant les boues d'épuration municipales comme substrat de fermentation.

Le développement d'un procédé de fermentation nécessite l'étude de différents paramètres ayant une influence sur les performances du procédé. Ainsi, des facteurs comme la concentration et la composition du milieu de fermentation, le transfert d'oxygène et les caractéristiques de la pré-culture employée sont très importants. Les objectifs de ce travail sont les suivants :

- Transposer les résultats obtenus en fioles en bioréacteur de 15 L, sous des conditions contrôlées de pH et de DO;
- Étudier les caractéristiques de l'inoculum en termes d'âge et de volume;
- Étudier l'effet de la concentration en matières en suspension (MES) des boues;
- Évaluer l'effet d'un pré-traitement des boues sur la croissance et l'activité protéolytique de *Bacillus licheniformis*;

- Comparer l'activité protéolytique obtenue dans les boues d'épuration secondaires de la CUQ avec celle obtenue dans un milieu synthétique standard.

3.2 Hypothèses de recherche

Les hypothèses justifiant l'ensemble de ces travaux sont les suivantes :

- D'après la revue de littérature, des conditions contrôlées de pH et de DO permettront une amélioration de l'activité protéolytique;
- Un inoculum adéquat en terme de physiologie, d'âge et de volume pourrait réduire considérablement la phase de latence et permettre d'obtenir une croissance optimale de *Bacillus licheniformis* lors de la fermentation, favorisant ainsi une augmentation de l'activité protéolytique;
- La croissance de *Bacillus licheniformis* et la production de protéases dépendent de la disponibilité des éléments nutritifs présents dans le milieu de fermentation. Il est possible que des boues d'épuration avec une concentration optimale de matières en suspension (MES) permettraient un apport optimal en sources de carbone et d'azote, ce qui favoriserait une meilleure croissance de *Bacillus licheniformis* et par conséquent une activité protéolytique supérieure;
- Les boues d'épuration sont composées d'une grande diversité de sources de carbone et d'azote, simples et complexes, facilement et difficilement biodégradables (Tirado Montiel et al., 2001). Afin d'augmenter la quantité d'éléments nutritifs disponibles pour la bactérie, la concentration en MES des boues ne peut indéfiniment être augmentée, car l'augmentation de la viscosité du milieu entrave le transfert d'oxygène. Il serait donc intéressant qu'un pré-traitement d'hydrolyse alcaline soit appliqué aux boues à hautes concentrations en MES. L'hydrolyse de ces boues pourrait, d'une part, rendre plus facilement assimilable une plus grande quantité d'éléments nutritifs pour la bactérie et, d'autre part, diminuer la viscosité du milieu et ainsi améliorer le transfert d'oxygène.

CHAPITRE 4: DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE

4.1 Procédure de production de protéases par *Bacillus licheniformis*

4.1.1 Préparation du milieu de culture

4.1.1.1 Échantillonnage et préparation des substrats de fermentation

Pour les expériences, deux types de milieu ont été utilisés : un milieu synthétique de référence et des boues d'épuration municipales. Les boues d'épuration proviennent de l'usine de traitement des eaux usées de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ, Québec). Il s'agit de boues secondaires qui proviennent de la décantation des eaux de lavage des biofiltres de la station. Leur concentration en solide est normalement faible (5 à 10 g/L de MES). Les expériences ayant été menées avec des boues dont la concentration en matière en suspension est élevée (20-40 g/L de MES), une étape de décantation a donc été nécessaire afin d'obtenir les concentrations désirées. Pour atteindre 40 g/L de MES, il a également été nécessaire de centrifuger les boues après les avoir décantées.

Tous les échantillons de boues ont été recueillis dans des contenants en polypropylène de 20 L. Ils ont été conservés à 4°C pendant un maximum de 7 jours afin d'écartier l'effet du stockage. Un litre de boues a également été conservé à -20°C pour les analyses physico-chimiques.

Un milieu synthétique de référence, employé lors de plusieurs travaux et qui permet une production de protéases élevée (Viccaro, 1973), a été utilisé pour réaliser certaines fermentations. Ce milieu a été utilisé afin d'établir des comparaisons avec l'activité protéolytique obtenue dans les boues. Ce milieu est composé de : glucose, 60 g/L ; farine de soja, 20 g/L ; CaCl₂, 0,3 g/L ; MgCl₂, 0,2 g/L.

4.1.1.2 Analyses physiques des boues

Les caractéristiques physiques des divers échantillons de boues tels que les solides totaux (ST), les matières solides volatiles (MSV), les matières en suspension (MES) et les matières volatiles en suspension (MVES), ont été déterminées suivant la procédure décrite dans APHA-AWWA-WPCF (1989). Ainsi, pour la détermination des solides totaux (ST), trois échantillons de 30 mL de boues sont déposés dans deux coupelles pré-pesées (gardées dans un dessiccateur 15 minutes avant la pesée) et placées dans une étuve à 105°C pour une durée de 24 heures. Par la suite les nacelles sont pesées à nouveau. Le calcul des ST pour

chaque échantillon s'effectue à l'aide de l'équation suivante, et la moyenne des trois résultats obtenus est par la suite calculée :

$$\frac{\text{Poids nacelle après 24 heures à } 105^{\circ}\text{C (g)} - \text{poids nacelle vide(g)}}{\text{Volume de l'échantillon de boues (L)}}$$

Pour la détermination des matières en suspension (MES), trois échantillons de 30 mL de boues ont été centrifugés 15 minutes à 8000 rpm à l'aide d'une centrifugeuse *RC 5C plus* de Sorvall (Asheville, Caroline du Nord, É.-U.). Le surnageant a par la suite été éliminé et les culots ont été déposés dans des nacelles pré-pesées. De l'eau distillée est employée afin de bien rincer les tubes à centrifugation, de façon à s'assurer que tout le culot est transféré dans la nacelle. Les nacelles sont par la suite placées dans une étuve à 105°C pour une durée de 24 heures. La même procédure de calcul que pour la détermination des ST est par la suite appliquée.

Pour déterminer les matières solides volatiles (MSV), les trois nacelles qui ont servi à la détermination des ST sont par la suite déposées dans un four à 550°C pour une durée de 15 minutes. Le calcul des MSV s'effectue de la façon suivante, et la moyenne des trois résultats obtenus est par la suite calculée :

$$\frac{\text{Poids nacelle avant passage à } 550^{\circ}\text{C (g)} - \text{poids nacelle après passage à } 550^{\circ}\text{C (g)}}{\text{Volume de l'échantillon de boues (L)}}$$

La concentration des matières volatiles en suspension (MVES) est calculée de la même manière que les MSV, en utilisant par contre les nacelles ayant servies pour la détermination des MES.

4.1.1.3 Analyses chimiques des boues

Les analyses chimiques des boues comprennent les métaux, le carbone organique total et dissous, l'azote ammoniacal et le phosphore total. Les métaux analysés sont Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Ni, Pb et Zn. Pour effectuer ces analyses chimiques, les boues doivent tout d'abord subir une digestion. L'acide nitrique ACS, l'acide hydrofluorhydrique ACS et le peroxyde d'hydrogène sont utilisés pour réaliser cette digestion, suivant le protocole du MENVIQ (89.12/213-mét. 1.3). Ensuite, les boues sont dosées par spectrométrie d'émission atomique à source de plasma, à l'aide d'un spectromètre *Vista Ax Cco Simultaneous ICP-AES* de Varian (Palo Alto, Californie, É.-U.), pour le dosage du phosphore total et des métaux selon les méthodes accréditées par le gouvernement du Québec (MENVIQ, 1989).

Le carbone total, le soufre et l'azote total sont pour leur part mesurés sur l'analyseur d'azote-carbone-soufre *Leco CHNS-932* de Leco Corporation (St-Joseph, Michigan, É.-U.) selon la méthode d'analyse des

sédiments (applicable aux boues d'épuration) accréditée par le gouvernement du Québec (MENVIQ, 1986). L'azote organique est obtenu en soustrayant la valeur de N-NH₃ de celle de l'azote total. Les concentrations en azote ammoniacal (N-NH₃) et en orthophosphate (P-PO₄³⁻) sont mesurées avec un auto-analyseur *Lachat Quickchem FIA+ 8000 series* de Zellweger Analytics (Sunrise, Floride, É.-U.), selon les protocoles fournis par le manufacturier.

L'analyse du carbone organique total est effectuée à partir des échantillons bruts. Les échantillons sont centrifugés pour permettre l'obtention des valeurs de carbone organique dissous. Les valeurs de carbone organique total et dissous sont mesurées à l'aide d'un analyseur *TOC-5000A* de Shimadzu (Kyoto, Japon).

4.1.2 Préparation de l'inoculum

4.1.2.1 Souche bactérienne employée

La souche microbienne employée pour toutes les expériences est *Bacillus licheniformis* ATCC 21424. Une culture active de la bactérie est maintenue sur gélose nutritive, constituée de 3 g/L d'extrait de viande de bœuf, 5 g/L de peptone et 15 g/L d'agar. Ces dernières sont incubées à 35°C pendant 48 heures dans une étuve modèle *Incubator* de Sanyo (Osaka, Japon), puis stockées à 4°C pour utilisations ultérieures.

4.1.2.2 Culture de départ

Une culture de départ est préparée dans 100 mL de bouillon nutritif dont la composition est la suivante : 3 g/L d'extrait de viande de bœuf, 5 g/L de peptone. La préparation est effectuée dans un erlenmeyer de 500 mL et deux erlenmeyers sont préparés pour chaque expérience. Le pH des milieux est vérifié avec un pH-mètre *Accumet 805 Mp* de Fisher (Pittsburgh, Pennsylvanie, É.-U.) et ajusté à 7,5 par ajout de base (NaOH 4N) ou d'acide (H₂SO₄ 4N). Les milieux sont ensuite stérilisés à l'autoclave *Labo autoclave* de Sanyo (Osaka, Japon) à 121°C pendant 15 minutes. Une colonie de *B. licheniformis* prélevée sur une gélose nutritive servant à la conservation est utilisée pour effectuer l'ensemencement du milieu refroidi. Toutes ces étapes s'effectuent sous conditions stériles de façon à prévenir la contamination. Finalement, les deux erlenmeyers sont incubées à 35°C sous une agitation constante de 250 révolutions/minute pendant 12 heures dans un incubateur-agitateur *Environ-Shaker* (Lab-Line, Dubuque, Iowa, É.-U.). Les cultures de départ sont par la suite vérifiées au microscope (Nikon, Tokyo, Japon) afin de s'assurer de la bonne croissance de *B. licheniformis* dans le milieu. L'erlenmeyer présentant la meilleure croissance est utilisé pour l'étape suivante.

4.1.2.3 Pré-culture

Pour certains essais de fermentation, aucune pré-culture n'a été utilisée. En effet, dans ces essais, le milieu de fermentation (boues) a été inoculé directement avec la culture de départ (inoculation en une étape; bouillon nutritif → milieu de fermentation). Par contre, dans la plupart des essais, une pré-culture a été employée (inoculation en deux étapes; bouillon nutritif → pré-culture → milieu de fermentation). Les pré-cultures sont composées de 150 mL de boues d'épuration, ou de milieu synthétique dans le cas des essais de fermentation réalisés en milieu synthétique. Elles sont préparées dans des erlenmeyers de 500 mL, et pour chaque expérience, 4 ou 5 pré-cultures sont préparées. Le pH des milieux est ajusté à 7,5 par ajout de base (NaOH 4N) ou d'acide (H₂SO₄ 4N). Les milieux sont par la suite stérilisés à l'autoclave à 121°C pour une durée de 30 minutes. Les milieux refroidis sont ensuite ensemencés avec 2 % (v/v) de la culture de départ et incubés pour des périodes variant de 9 à 15 heures (selon les essais), à 35°C et sous une agitation constante de 250 révolutions/minute dans un incubateur-agitateur. La pré-culture est par la suite vérifiée au microscope afin de s'assurer de la bonne croissance de la bactérie.

4.1.3 Essais de fermentation

4.1.3.1 Fermentations en erlenmeyers

Des erlenmeyers de 500 mL contenant 100 mL de boues sont utilisés. Le pH des boues est tout d'abord ajusté à 7,5 par ajout de base (NaOH 4N) ou d'acide (H₂SO₄ 4N) et les milieux sont stérilisés à 121°C pendant 30 minutes à l'autoclave. Les milieux refroidis sont par la suite inoculés soit directement avec 3 % de la culture de départ (inoculation en une seule étape), ou avec la pré-culture (inoculation en deux étapes). Dans le cas d'une inoculation à partir de la pré-culture, les pourcentages d'inoculation (v/v) varient de 1 % à 10 % selon les essais. Les fermentations en fioles sont effectuées sur une période de 48h, dans un incubateur-agitateur à température (35°C) et à agitation (250 révolutions/minute) contrôlées et constantes. Les échantillonnages sont effectués à toutes les 3 heures pour les 24 premières heures de la fermentation et à toutes les 6 heures pour les 24 dernières heures. À chaque échantillonnage, 3 à 4 mL d'échantillons sont conservés à 4°C dans des tubes de verres stériles contenant des billes de verre (5 mm). L'inoculation des fioles ainsi que tous les échantillonnages se font en présence d'une flamme, sous hotte à flux laminaire, de façon à prévenir toute contamination.

4.1.3.2 Fermentations en bioréacteurs

4.1.3.2.1 Description des bioréacteurs

Pour les expériences, des bioréacteurs de 15 L (Biogénie Inc., Québec, Québec, Canada) ont été utilisés. Ces réacteurs sont équipés d'instrumentation et de contrôleurs d'agitation, d'aération, de température, de pH, de mousse et d'oxygène dissous (DO). Ces unités sont reliées à un ordinateur et les paramètres de fermentation sont contrôlés à l'aide du logiciel FIX Version 5.5 de Intellution (Foxborough, Massachusetts, É.-U.).

Les cultures sont aérées par injection d'air sous pression. L'air passe à travers une cartouche filtrante PTFE, 0,2 μ m (Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan, É.-U.) préalablement autoclavée, puis est acheminée par un tube perforé dans le milieu de culture. L'agitation est assurée au moyen de trois turbines à pales, de type RUSHTON, tandis que quatre contre-pales assurent une bonne turbulence et permettent d'éviter le vortex. L'arbre d'agitation et sa garniture mécanique sont situés au fond de la cuve.

En ce qui concerne le contrôle de la température, le réacteur est muni d'une double paroi qui permet la stérilisation par injection de vapeur dans la boucle. Cette paroi joue également le rôle de surface d'échange entre le milieu de culture et l'extérieur. De l'eau froide ou chaude circule dans une boucle, afin de maintenir la température optimale lors de la fermentation. Cette régulation de température est soumise à des contrôles automatiques gérés par ordinateur.

L'addition des agents neutralisants, sous forme liquide, s'effectue au cours de la fermentation par l'intermédiaire d'un contrôleur automatique de pH. Le contrôle de la mousse s'effectue manuellement ou automatiquement avec un brise mousse mécanique et une solution de polypropylène glycol (PPG) 0,1 % (v/v) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Ces agents chimiques sont injectés dans le milieu de culture à l'aide de pompes péristaltiques.

Le pourcentage en oxygène dissous dans le milieu de fermentation est mesuré par une sonde polarographique latérale *InPro 6000* de Metler-Toledo (Columbus, Ohio, É.-U.). Quant à la mesure du pH, elle est réalisée au moyen d'une électrode à pH de Metler-Toledo. Ces deux sondes sont positionnées à 25 cm du fond de la cuve au-dessus du diffuseur d'air. Les données de pH et de DO sont recueillies toutes les 6 secondes par des analyseurs numériques *Rosemount Analytical Model 1054A* de Rosemount Analytical Inc. (Chanhassen, Minnesota, É.-U.).

Les sondes de pH et de DO sont préalablement calibrées avant de procéder à la stérilisation du substrat contenu dans les bioréacteurs. L'électrode de pH est calibrée en utilisant deux tampons à pH 4 et 7 (VWR-Canada, Mississauga, Ontario, Canada). La sonde d'oxygène est calibrée aux concentrations 0 et 100% : elle est mise à zéro par trempage dans une solution 1N de sulfite de sodium et la saturation est obtenue par injection d'air. Les deux sondes sont alors installées sur le bioréacteur et celui-ci est ensuite rempli avec le milieu de fermentation. Le milieu de fermentation est par la suite stérilisé. Après la stérilisation, la sonde à DO doit être re-calibrée avant la fermentation. Dans ce cas la mise à zéro est assurée par injection de N₂ stérile dans le bioréacteur ; la saturation est obtenue en utilisant les taux maximums d'aération et d'agitation, à la pression atmosphérique.

4.1.3.2.2 Stérilisation et hydrolyse des milieux de culture

Pour les fermentations en bioréacteur, un volume de 10 L de milieu de culture est utilisé (boues ou milieu synthétique). Ensuite, 20 mL d'une solution anti-mousse de polypropylène glycol 10% (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) est ajoutée au bioréacteur pour éviter la formation de mousse durant la stérilisation. La stérilisation, à 121°C pendant 30 minutes, se fait à même le bioréacteur avec de la vapeur provenant d'une chaudière 48 KW (Caloritech Inc., Edmonton, Alberta, Canada).

Pour certaines expériences en bioréacteur, une hydrolyse thermo-alcaline des boues a été expérimentée. Cette hydrolyse consistait simplement à stériliser les boues à un pH alcalin. Pour ce faire, le pH des boues contenues dans le bioréacteur est ajusté à 10 avant le début de la stérilisation, à l'aide de NaOH concentré (15N), de façon à ne pas diluer le milieu de culture. Les paramètres de la stérilisation sont les mêmes que ceux décrit plus haut. Après la stérilisation, le pH est ramené à 7,5 par ajout d'une solution stérile de H₂SO₄ 10N.

4.1.3.2.3 Inoculation des bioréacteurs

Après stérilisation, refroidissement à 35°C, recalibrage de la sonde d'O₂ et ajustement du pH du milieu de culture contenu dans le bioréacteur, le fermenteur peut être inoculé. Il s'agit d'inoculer le substrat de fermentation avec la pré-culture préparée en fiole. L'inoculation doit être réalisée avec la plus grande précaution, dans des conditions aseptiques afin d'éviter tout risque de contamination. Ainsi, la pré-culture est transférée au bioréacteur en présence d'une flamme.

4.1.3.2.4 Paramètres des fermentations

Les fermentations en bioréacteurs sont effectuées à 35°C et à pH 7,5, sur une période de 48 heures. L'agitation est continue et varie entre 200 et 500 révolutions/minute. Il en est de même pour l'aération,

dont le débit varie entre 2 et 6 LPM (litres par minute). Ces paramètres sont ajustés tout au long de la fermentation afin de maintenir plus de 20% d'oxygène dissous dans le milieu de culture tout au long de la fermentation.

4.1.3.2.5 Échantillonnage

Comme pour les fermentations en fioles, des échantillonnages sont effectués à toutes les 3 heures pour les 24 premières heures de la fermentation et à toutes les 6 heures pour les 24 dernières heures. À chaque échantillonnage, 10 à 15 mL d'échantillons sont conservés à 4°C dans des tubes de verre stériles contenant des billes de verre (5 mm). Tous les échantillonnages se font en présence d'une flamme, de façon à prévenir la contamination. Avant de prendre les échantillons, la vanne d'échantillonnage du bioréacteur est stérilisée par circulation de vapeur pendant 5 minutes.

4.1.4 Analyse des échantillons recueillis

4.1.4.1 Compte de cellules et de spores

Afin de suivre la croissance de *B. licheniformis* au cours des fermentations, des comptes de cellules et de spores sont effectués à partir de chaque échantillon. Pour le dénombrement sur boîte Pétri des comptes de cellules, 0,5 mL de l'échantillon à analyser est dilué dans un volume de 4,5 mL d'une solution saline stérile (0,85 % NaCl). Le nombre de dilutions est fonction de la croissance du microorganisme. Ainsi, plus le nombre de microorganismes dans le milieu de fermentation est important, plus le facteur de dilution est élevé, allant jusqu'à 10^{-8} . Toutes les dilutions se font dans des tubes de verre stériles. À chaque étape du processus de dilution en série, tous les tubes sont mélangés sur un agitateur *Maxi Mix II* (Thermolyne, Dubuque, Iowa, É-U) afin de bien re-suspendre les cellules bactériennes. Pour le compte de cellules, un volume de 0,1 mL de la dilution appropriée est étalé en triplicata sur gélose nutritive à l'aide d'un râteau de verre stérilisé à l'alcool 95%. Pour le dénombrement des spores viables, le tube de la dilution appropriée est placé dans un bain-marie *Thermo-Lift* (Buchler Instrument Inc., Fort Lee, New Jersey, É-U) à 80°C pendant 10 minutes, puis il est refroidi dans la glace pendant 5 minutes. Par la suite, un volume de 0,1 mL de cette dilution est étalé en triplicata sur gélose nutritive.

Les plats de Pétri sont incubés à 35°C pendant 16 à 24 heures dans une étuve *Incubator* de Sanyo (Osaka, Japon) et le décompte des unités formatrices de colonies (UFC) peut être effectué. À partir des comptes d'UFC, des courbes de croissance sont tracées. Pour certains essais de fermentation, le temps de génération (t_g) qui représente le temps nécessaire pour que la population microbienne double en nombre

($2N_0$) est déterminé avec la pente (m) de la phase exponentielle. Le taux de croissance spécifique maximum (μ_m) peut alors être calculé à partir du temps de génération, selon la formule suivante :

$$m = (\log N_{t_2} - \log N_{t_1}) / (t_2 - t_1) = \mu_m$$

$$\ln 2N_0 - \ln N_0 = \mu_m \times t_g$$

$$\mu_m = 0,693/t_g$$

Dans le but d'établir la fiabilité de la technique de compte de cellules et de spores, 10 échantillons indépendants ont été prélevés (au même moment) d'une fiole contenant un bouillon fermenté. Les échantillons ont été dilués de façon appropriée et étalés en triplicata sur des géloses. Les colonies ont été comptées après incubation des géloses et les résultats obtenus ont permis de calculer la moyenne et l'écart type. L'écart type a été établi à 7 %.

4.1.4.2 Détermination de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est déterminée à partir de l'effet de l'enzyme sur la caséine suivant la méthode de Kunitz (1947). Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par la protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés. Cette quantité de tyrosine libérée, qui peut être mesurée directement par colorimétrie (absorbance à 275 nm), devient alors une mesure de l'activité de l'enzyme.

Les échantillons sont tout d'abord centrifugés à 8000 révolutions/minute pendant 10 minutes, à 4°C, à l'aide d'une centrifugeuse *RC 5C plus* de Sorvall (Asheville, Caroline du Nord, É.-U.). Le surnageant obtenu est dilué dans le tampon borate à pH 8,2 afin de maintenir les conditions alcalines lors de la réalisation du test enzymatique. La réaction enzymatique s'effectue en ajoutant 1 ml de la solution enzymatique à tester à 5 mL de la solution de caséine (1,2 % dans le tampon borate pH 8,2). Le mélange caséine-protéase est maintenu à 37°C durant 10 minutes, avec faible agitation constante, dans un bain-marie *360 Orbital Shaker Bath* de Precision Scientifics (Waltham, Massachusetts, É.-U.). Après cette période, la réaction est arrêtée par ajout d'une solution d'acide trichloracétique (TCA). Le mélange (11 mL) est ensuite incubé à 37°C durant 30 minutes afin de s'assurer de la précipitation totale de la caséine non hydrolysée. Parallèlement aux échantillons, des blancs sont préparés avec de la caséine précipitée : 5 mL de caséine sont tout d'abord précipités avec 5 mL de TCA pendant 10 minutes à 37 °C avant l'ajout de 1 mL de la solution enzymatique.

Après la période d'incubation de 30 minutes, les échantillons et les blancs sont filtrés sur papier Whatman 934-AH (Whatman Inc., Clifton, New-Jersey, É.-U.). Les échantillons sont par la suite analysés à 275 nm au spectrophotomètre *Cary 100 Bio UV-Visible* (Varian, Palo Alto, Californie, É.-U.).

La mesure de l'activité enzymatique 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, à l'aide d'une courbe d'étalonnage de concentration en tyrosine.

La tyrosine utilisée pour la courbe d'étalonnage provient de la compagnie Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada), porte le numéro de référence T 3754 et est certifiée L-Tyrosine pure à 98%. Les courbes d'étalonnage sont préparées à partir de solutions dont les concentrations en tyrosine varient entre 0 et 181 µg. Pour la préparation de ces solutions, la tyrosine est diluée dans une solution composée de 50 % de tampon borate et 50 % de la solution de TCA. Ces solutions sont par la suite analysées au spectrophotomètre à 275 nm.

La commission sur les enzymes de l'union internationale des biochimistes définit ainsi l'activité enzymatique (U.I.) : « *une unité d'enzyme hydrolyse la caséine pour produire la coloration équivalente à 1 µmole (ou 181 µg) de tyrosine par minute à pH 8.2 et à 37°C* ».

Le nombre d'unité (U.I.) est calculé à l'aide de la formule ci-dessous :

$$UI/mL = \frac{Conc. Tyro. (\mu mole/L)}{10 \text{ min} \times 10^3 \text{ mL}} \times 11 \text{ mL} \times \text{Facteur de dilution}$$

Dans le but d'établir la fiabilité de la technique de mesure de l'activité protéolytique, 10 échantillons indépendants ont été prélevés (au même moment) d'un bouillon fermenté. Les échantillons ont été traités de façon appropriée afin d'en déterminer l'activité protéolytique. Les résultats obtenus ont permis de calculer l'écart type. L'écart type a été établi à 5 %. Également, un échantillon de boue de la CUQ à 25 g/L de MES stérilisé a été traité de façon appropriée afin d'en déterminer l'activité protéolytique. Les résultats ont démontré que l'activité protéolytique est nulle dans les boues après stérilisation.

4.1.4.3 Calcul du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (K_{La})

La mesure du K_{La} est basée sur la méthode dynamique décrite en détails par Aiba et *al.* (1973). Cette méthode consiste à suivre la concentration en oxygène dissous au cours du temps. Un résumé de la méthode est présenté ci-dessous.

Durant le procédé en cuvée (batch), lors d'une culture bactérienne, les changements de la concentration en oxygène dissous durant la fermentation peuvent être décrits par l'équation :

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR$$

Le premier terme, OTR (*Oxygen Transfert Rate*), représente la vitesse de transfert de l'oxygène de la phase gazeuse à la phase aqueuse :

$$OTR = K_L a (C^* - C_L)$$

Dans les équations, le C^* représente la concentration saturante en oxygène dans le milieu de culture (mmol/L) et le C_L représente la concentration initiale (avant de fermer l'aération) en oxygène dissous dans le milieu de culture (mmol/L).

Le second terme, OUR (*Oxygen Uptake Rate*), représente la vitesse de consommation d'oxygène par les microorganismes pendant la fermentation. Dans les processus biologiques, l'OUR est égale au $Q_{O_2} X$:

$$OUR = Q_{O_2} X$$

Donc, les changements de concentration en oxygène dissous dans le milieu lors de la fermentation peuvent être exprimés selon l'équation suivante :

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L) - Q_{O_2} X$$

À l'équilibre $\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR = 0$ et donc la balance en oxygène donne:

$$K_L a (C^* - C_L) = OUR = Q_{O_2} X$$

En arrêtant momentanément l'aération, le premier terme de l'équation (OTR) peut être considéré comme étant nul. La diminution de la concentration en oxygène dissous est donc causée exclusivement par l'OUR. Cette réduction est généralement linéaire et le $Q_{O_2} X$ peut facilement être déterminé à partir de la pente du diagramme C en fonction du temps (Figure 2) :

$$\frac{dC_L}{dt} = -Q_{O_2} X$$

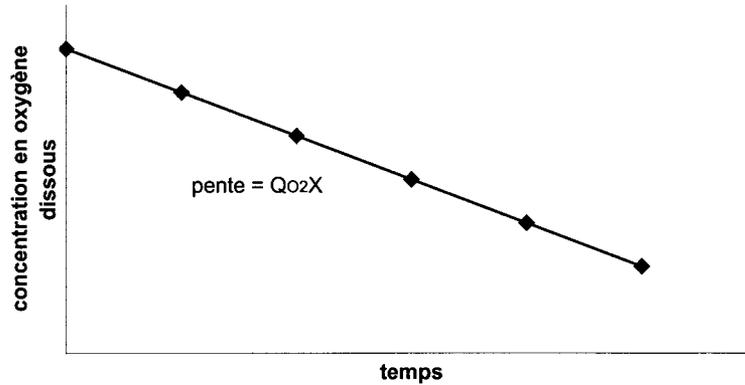


Figure 2 Évaluation de la vitesse de consommation d’oxygène ($Q_{O_2}X$) à partir de la pente de la courbe d’évolution de l’oxygène dissous en fonction du temps.

Il est considéré que l’aération est interrompue pendant un intervalle de temps suffisamment bref pour ne pas affecter le métabolisme microbien. Ainsi, avant que la concentration en DO n’atteigne la valeur critique (15-20%), l’aération est reprise et un retour aux concentrations normales est par la suite observé. Il s’agit alors de suivre l’évolution de la DO en fonction du temps. Le K_La peut alors être estimé en reformulant l’équation ci-dessus en terme de concentration en oxygène dissous :

$$C_L = -\frac{1}{K_La} \left[\frac{dC}{dt} + Q_{O_2}X \right] + C^*$$

Le $\left(-\frac{1}{K_La}\right)$ est donc donné par la pente du diagramme de l’évolution de C_L en fonction de $\left[\frac{dC}{dt} + Q_{O_2}X\right]$ (Figure 3).

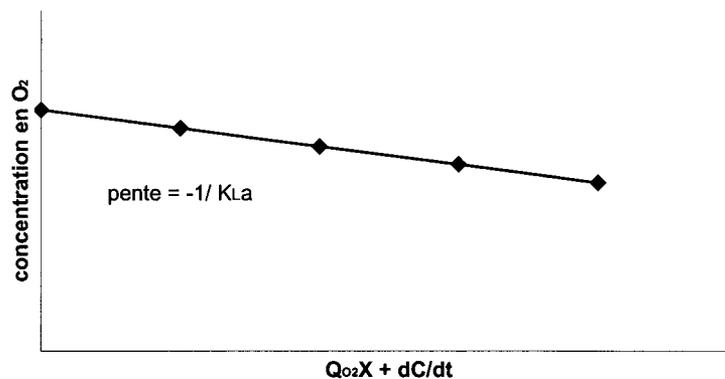


Figure 3 Estimation du coefficient de transfert d’oxygène (K_La) à partir de la pente de la courbe de l’évolution de l’oxygène dissous en fonction de $(dC/dt + Q_{O_2}X)$.

Les estimations de Q_{O_2X} et K_{La} sont dépendantes de la section de la courbe utilisée lors de l'évaluation. Il est aussi important de signaler que par la méthode dynamique, le K_{La} ne dépend pas de Q_{O_2X} .

Pour le calcul de l'OTR et de l'OUR, la transformation des valeurs de DO mesurées (%) en concentration en oxygène dissous (mmol/L) est effectuée de la façon suivante : l'électrode à DO a été calibrée dans le milieu de culture à 35°C et par la suite transférée dans de l'eau distillée saturée en oxygène, à 25°C et à pression ambiante. La lecture obtenue a été utilisée, en combinaison avec la valeur de la concentration saturante en DO dans l'eau distillée (0,07559 mmol/L) (100%), pour estimer la concentration saturante en DO dans le milieu de culture à 35 °C.

4.2 Méthodologie expérimentale

Afin d'atteindre les objectifs fixés et de vérifier les hypothèses émises, plusieurs travaux ont été réalisés.

4.2.1 Comparaison de la croissance de *B. licheniformis* et des activités protéolytiques obtenues en erlenmeyer et en bioréacteur (expériences préliminaires)

Comme tous les travaux précédents ont été réalisés en erlenmeyer sous des conditions non contrôlées d'oxygène dissous et de pH, il serait pertinent de vérifier l'effet du contrôle de ces paramètres sur les rendements en activités protéolytiques. Des essais de fermentation ont donc été réalisés en erlenmeyer et en bioréacteur afin de comparer les activités protéolytiques obtenues sur les deux échelles. Ainsi, une première fermentation a été réalisée en erlenmeyer, sans contrôle de pH et d'oxygène dissous, alors que la deuxième fermentation a été réalisée en bioréacteur de 15 L, sous des conditions contrôlées de pH et d'oxygène dissous. Les deux expériences ont été réalisées avec des boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES. L'inoculum pour les deux types de fermentation a été préparé de façon identique : 2 % (v/v) d'une culture de départ de 12 h a servi à inoculer une pré-culture composée de boues à 25 g/L de MES. Cette pré-culture, une fois âgée de 12 h, a servi à inoculer les milieux de fermentation à 3 % (v/v). Les deux fermentations ont été menées sur 48 h et la croissance de *B. licheniformis*, ainsi que l'activité protéolytique, ont été suivies tout au long des fermentations. La comparaison des résultats obtenus lors de ces deux essais permet d'évaluer l'effet de conditions contrôlées de pH et d'oxygène dissous (DO) sur la croissance de *B. licheniformis* et sur l'activité protéolytique.

4.2.2 Optimisation de l'inoculum

Afin d'obtenir une croissance optimale et des valeurs d'activité protéolytique supérieures lors des fermentations, il est nécessaire d'utiliser un inoculum présentant des caractéristiques optimisées en terme de physiologie, d'âge et de volume. Pour ce faire, différents inoculums, d'âges différents, et différents volumes d'inoculation ont été testés. Tous ces essais ont été réalisés en erlenmeyer.

4.2.2.1 Croissance de *B. licheniformis* dans les boues à 15 et 25 g/L de MES lors d'une inoculation en une étape (inoculum sans pré-culture)

Dans un premier temps, il est pertinent de vérifier si un inoculum préparé en deux étapes, comportant une étape de pré-culture en boues, est nécessaire afin de permettre à *B. licheniformis* de bien s'adapter aux boues d'épuration secondaires de la CUQ. Dans une première expérience, 3 % (v/v) d'une culture de départ de 12 h, préparée en bouillon nutritif, a été transférée directement dans deux milieux de fermentation composés respectivement de boues à 25 g/L et 15 g/L de MES (inoculation en une étape, sans l'usage d'une pré-culture en boues). La croissance de *B. licheniformis* dans les deux milieux de fermentation a été suivie sur une période de 48 h.

4.2.2.2 Croissance de *B. licheniformis* dans les boues à 25 g/L de MES lors d'une inoculation en deux étapes : influence de l'âge de la pré-culture

Après avoir vérifié que l'usage d'un inoculum préparé en deux étapes (comportant une pré-culture en boues) est nécessaire pour permettre à *B. licheniformis* de bien s'adapter aux boues d'épuration, différents essais de fermentation ont été réalisés avec un inoculum comprenant une pré-culture en boues. Ces essais ont été réalisés avec des inoculums dont l'âge de la pré-culture était variable afin de vérifier l'influence de l'âge de la pré-culture sur la fermentation. Pour ces essais, une culture de départ de 12 h, préparée dans un bouillon nutritif, a été utilisée pour inoculer à 2 % (v/v), en triplicata, des pré-cultures en boues. Les pré-cultures ont été incubées sur une période de 15 h et des milieux de fermentations composés de boues à 25 g/L de MES ont été inoculés avec 3 % de ces pré-cultures aux temps 9 h, 12 h et 15 h. La croissance de *B. licheniformis* a été suivie dans les milieux de fermentation sur une période de 48 h afin de déterminer l'âge de la pré-culture qui permet d'atteindre le nombre maximum de cellules et de spores lors de la fermentation.

4.2.2.3 Croissance de *B. licheniformis* dans les boues à 25 g/L de MES lors d'une inoculation en deux étapes : influence du volume d'inoculation des milieux de fermentation

Suite à la détermination de l'âge de la pré-culture donnant les meilleurs résultats, différents essais ont été réalisés de façon à déterminer le volume d'inoculation du milieu de fermentation le plus approprié. Pour ces essais, une culture de départ de 12 h, préparée en bouillon nutritif, a été utilisée pour inoculer à 2 % (v/v) une pré-culture en boues. Lorsque la pré-culture a atteint l'âge donnant les meilleurs résultats (déterminé lors des essais précédents), différents volumes de cette pré-culture ont été utilisés pour inoculer, en triplicata, des milieux de fermentation composés de boues à 25 g/L de MES. Les volumes utilisés sont les suivants (v/v) : 1, 2, 3, 4, 4,5, 5, 6 et 10 %. La croissance de *B. licheniformis* a par la suite été suivie dans les milieux de fermentation sur une période de 48 h afin de déterminer quel volume d'inoculation permet d'atteindre le nombre maximum de cellules et de spores lors de la fermentation.

Les résultats obtenus lors ces essais ont permis de déterminer les caractéristiques de l'inoculum donnant un nombre maximum de cellules et de spores lors de la fermentation. La combinaison de ces caractéristiques a permis de mettre au point une procédure améliorée de production de l'inoculum. Pour tous les essais suivants, les inoculums ont donc été préparés suivant cette procédure.

4.2.3 Comparaison de l'activité protéolytique dans les boues secondaires de la CUQ et dans le milieu synthétique

Afin de comparer l'activité protéolytique et la croissance de *B. licheniformis* dans les boues et dans le milieu synthétique, deux fermentations en bioréacteur ont été réalisées. Un essai a été réalisé avec des boues à 25 g/L de MES. Parallèlement, un deuxième essai a été réalisé en milieu synthétique. L'inoculum employé pour la fermentation dans les boues a été préparé selon les conditions optimales déterminées lors de la série d'expériences présentée à la section 4.2.2. La préparation de l'inoculum pour le milieu synthétique s'est également faite suivant la procédure améliorée, mais en employant une pré-culture composée du milieu synthétique plutôt que de boues d'épuration. Pour les deux essais, la croissance et la sporulation, ainsi que l'activité protéolytique, ont été suivies pendant toute la durée des 48 heures de fermentation afin de comparer les boues et le milieu synthétique comme substrat pour la production de protéases.

4.2.4 Optimisation de la concentration en matière en suspension (MES) des boues secondaires employées pour les fermentations

Différents essais ont été réalisés en bioréacteurs afin de vérifier l'influence de la concentration des boues sur l'activité enzymatique et la croissance de *B. licheniformis*. Ainsi, en plus de l'essai à 25 g/L de MES effectué au cours de la série d'expériences précédente, des essais ont été réalisés avec des boues à 20, 30, 35 et 40 g/L de MES. Pour tous les essais, la croissance et la sporulation ainsi que l'activité protéolytique ont été suivies pendant toute la durée des 48 heures de fermentation. Également, pour les essais à 25 et 35 g/L de MES, l'évolution du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (K_{La}) a été suivie au cours des fermentations afin d'étudier l'effet de la concentration des boues sur le transfert d'oxygène.

4.2.5 Évaluation de l'effet d'un pré-traitement d'hydrolyse alcaline des boues sur le transfert d'oxygène, la croissance de *B. licheniformis* et l'activité protéolytique

Pour ces essais, les fermentations à 25 g/L et à 35 g/L de MES ont été reprises, mais en appliquant préalablement le pré-traitement d'hydrolyse alcaline aux boues avant la fermentation. Pour les deux essais, la croissance et la sporulation, ainsi que l'activité protéolytique ont été suivies pendant toute la durée des 48 heures de fermentation. Également, l'évolution du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (K_{La}) a été suivie au cours des deux fermentations. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus dans les boues non-hydrolysées a permis d'évaluer l'effet du pré-traitement d'hydrolyse alcaline sur la croissance de *B. licheniformis*, sur le transfert d'oxygène et sur l'activité protéolytique obtenue.

CHAPITRE 5: RÉSULTATS ET DISCUSSION

5.1 Analyses physico-chimiques des boues

Le Tableau 7 présente les résultats des tests de caractérisation effectués sur deux échantillons des boues utilisées au cours de ces expériences.

Tableau 7 Caractéristiques physico-chimiques des boues secondaires de la CUQ.

Paramètres	Concentration	
	Échantillon 1 (25/06/2002)	Échantillon 2 (24/01/2003)
ST (g/L)	29,0	32,0
SVT (g/L)	20,0	22,0
MES (g/L)	24,0	27,0
MVES (g/L)	18,5	20,8
C _t (mg/kg)*	317376	383020
N _t (mg/kg)*	44080	55920
P _t (mg/kg)*	20846	11271
N-NH ₃ (mg/kg)*	793	1007
N-NO ₂ -NO ₃ (mg/kg)*	17	21
P-PO ₄ (mg/kg)*	12549	6785
Al (mg/kg)*	12918	6671
Ca (mg/kg)*	18859	16127
Cd (mg/kg)*	0,9	0,7
Cr (mg/kg)*	128	37
Cu (mg/kg)*	297	190
Fe (mg/kg)*	15050	12201
K (mg/kg)*	3856	2072
Pb (mg/kg)*	31	38
S (mg/kg)*	7685	5791
Zn (mg/kg)*	386	314
Na (mg/kg)*	4806	1536

* Résultats présentés sur une base de boues sèches

Les boues d'épuration secondaires de la CUQ constituent un milieu complexe qui contient une grande variété d'éléments nutritifs pouvant supporter la croissance de *Bacillus licheniformis*. Il s'agit d'un milieu

riche en carbone et en azote. Les rapports C/N pour les deux échantillons sont de 7,2 et 6,8 respectivement. Également, les boues d'épuration contiennent du phosphore et du calcium. Ces éléments peuvent avoir un effet bénéfique sur la production de protéases, leur activité protéolytique et leur stabilité (section 2.3.3). Les boues d'épuration présentent donc plusieurs caractéristiques favorables pour la production de protéases. Les boues contiennent aussi plusieurs éléments inorganiques dont certains (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) sont réglementés par le Ministère l'environnement (MENV, 2004). À titre d'information, les boues de la CUQ respectent les critères C2-P1 pour leur épandage dans les champs agricoles.

5.2 Comparaison de la croissance de *B. licheniformis* et de l'activité protéolytique en erlenmeyer et en bioréacteur (expériences préliminaires)

Deux fermentations dans les boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES ont été réalisées. La première fermentation a été réalisée en erlenmeyer alors que la seconde a été effectuée en bioréacteur. Pour les deux fermentations, un inoculum identique, préparé en deux étapes et comprenant une pré-culture en boues, a été employé (voir section 4.2.1). La Figure 4 illustre la croissance de *B. licheniformis* lors des deux fermentations. Pour la fermentation en erlenmeyer, une phase de latence du temps 0 au temps 7 h est observée. Elle précède la phase de croissance exponentielle qui se prolonge jusqu'à 26 h. Pour la fermentation en bioréacteur, une phase de latence est également observée du temps 0 au temps 6 h. La phase de croissance exponentielle commence par la suite et se poursuit jusqu'au temps 21 h.

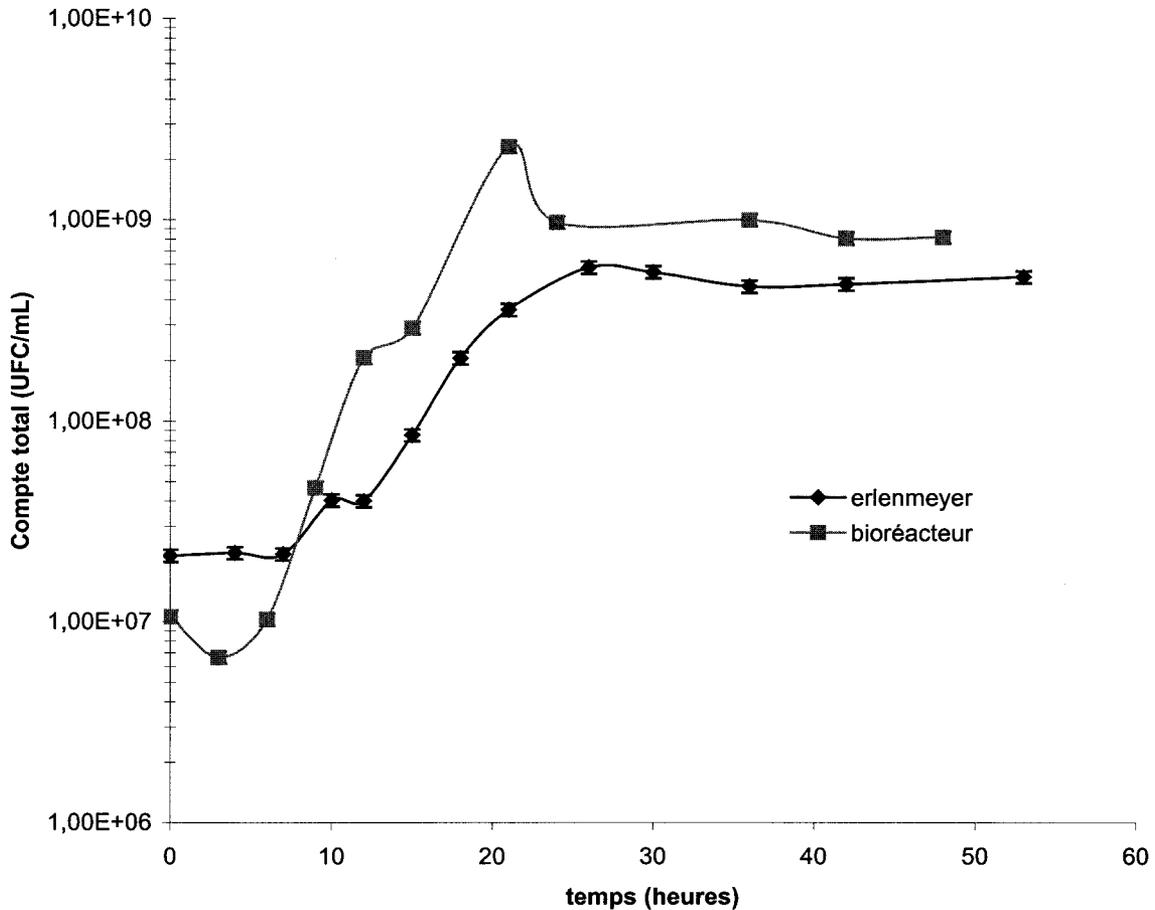


Figure 4 Évolution du nombre de cellules de *B. licheniformis* en fonction du temps lors de deux fermentations en erlenmeyer et en bioréacteur dans les boues à 25 g/L de MES ayant été inoculées à 3 % (v/v) avec une pré-culture en boue âgée de 12 h. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 7 %.

Le Tableau 8 présente les résultats obtenus pour les différents paramètres mesurés pendant les fermentations. La croissance a été supérieure en bioréacteur (sous des conditions de DO et de pH contrôlées) par rapport à la croissance obtenue en erlenmeyer (conditions de pH et de DO non-contrôlées). En effet, le taux de croissance spécifique maximum (μ_m) a été plus élevé en bioréacteur qu'en erlenmeyer. Le nombre maximum de cellules obtenues lors de la fermentation a été également plus élevé en bioréacteur qu'en erlenmeyer. Au niveau des activités protéolytiques mesurées, la différence est considérable. L'activité protéolytique maximum mesurée en bioréacteur est plus de 10 fois supérieure à celle obtenue en erlenmeyer.

Tableau 8 Valeurs des différents paramètres lors des fermentations en erlenmeyer et en bioréacteur dans les boues secondaires de la CUQ (25 g/L de MES).

Fermentation	μ_m (h ⁻¹)	Nombre de cellules maximum (UFC/mL)	Activité protéolytique maximum (U.I./mL)
Erlenmeyer	0,27	5,77 x 10 ⁸	0,33 (36 h)
Bioréacteur	0,42	2,30 x 10 ⁹	4,51 (18 h)

L'activité protéolytique obtenue avec la fermentation en erlenmeyer est faible. Lors de travaux précédents, Meunier (1999) avait aussi obtenu des valeurs d'activités protéolytiques dans le même ordre de grandeur (moins de 1 U.I./mL) lors de fermentations réalisées en erlenmeyer avec des boues mixtes de la CUQ (60 % de boues primaires et 40 % de boues secondaires). Cependant, Meunier (1999) était parvenue à atteindre des activités protéolytiques supérieures (1-5 U.I./mL) dans certains essais dans des boues mixtes additionnées de sources de carbone et d'azote supplémentaires. Lors de ces travaux, les boues étaient inoculées directement avec 1 à 5 % des pré-cultures préparées en milieu synthétique (milieu trypticase soja). Les fermentations se déroulaient généralement sur une période de 96 h et les activités protéolytiques maximales étaient enregistrées entre 48 et 96 h de fermentation.

Les différentes conditions d'inoculum et de temps de fermentation rendent difficiles les comparaisons entre les activités protéolytiques mesurées dans ce travail et celles obtenues par Meunier (1999). En effet, Meunier (1999) a utilisé des boues mixtes comme milieu de culture pour *B. licheniformis* alors que les boues secondaires de la CUQ n'ont pas été utilisées. Dans le présent travail, l'emploi de boues secondaires en erlenmeyer a été nécessaire afin de pouvoir établir des comparaisons avec les résultats obtenus en bioréacteurs, dans lesquels seules les boues secondaires peuvent être utilisées. En effet, Barnabé (2000) a noté que les particules grossières des boues mixtes (ex : grains de silice) peuvent endommager certaines composantes des bioréacteurs, dont les sondes et le joint mécanique de l'agitateur.

Également, Meunier (1999) n'a pas adapté l'inoculum à l'aide d'une pré-culture préparée dans les boues. Dans le présent travail, une pré-culture en boue a été utilisée. Une meilleure adaptation de la bactérie pourrait expliquer pourquoi l'activité protéolytique maximale est enregistrée après 36 h de fermentation en comparaison avec les travaux de Meunier (1999) où la valeur maximale était observée après 48 h.

L'utilisation d'erlenmeyers pour l'étude des procédés de bioconversion en produits à valeur ajoutée présente de nombreux avantages (facilité de manipulation, peu de matériel nécessaire et possibilité de mener plusieurs expériences simultanément). Par contre, les faibles activités protéolytiques, comptes

cellulaires et μ_m obtenus en erlenmeyer par rapport à ceux obtenus en bioréacteur démontrent les limites des fermentations en erlenmeyer. D'abord, le pH n'y est pas contrôlé. Le pH influe beaucoup sur la croissance cellulaire et sur la production de protéases. Ainsi, les possibles variations du pH pendant la fermentation pourrait affecter la croissance microbienne, ce qui expliquerait le moins grand nombre de cellules obtenues en erlenmeyer. De plus, Calik *et al.* (2002) ont démontré que le pH a une grande influence sur les voies métaboliques impliquées dans la production de protéases. Le maintien du pH optimal de la bactérie (7,5) tout au long de la fermentation permet donc une meilleure production de protéases. Également, de fortes variations de pH au cours de la fermentation peuvent mener à la dénaturation des protéases excrétées dans le milieu (Kumar *et al.*, 1999). D'ailleurs, Meunier (1999) a tenté plusieurs essais de fermentation dans les boues additionnées de différentes solutions tampons (PBS, Borate) afin de maintenir le pH à un niveau optimum tout au long de la culture. Les résultats d'activité protéolytique variaient en fonction du tampon utilisé. Cependant, ces résultats ont démontré que les boues additionnées de tampons permettaient l'atteinte d'activités protéolytiques plus élevées que les boues non tamponnées.

Les conditions d'oxygène dissous jouent également un rôle de première importance dans la production de protéases. Calik *et al.* (2000a) ont démontré que la modification des conditions de transfert de l'oxygène dissous de la phase gazeuse à la phase liquide a une grande influence sur la production de protéases en affectant les voies métaboliques de la bactérie. En erlenmeyer, la capacité de transfert d'oxygène est limitée. Cette limitation est causée en partie par l'agitation déficiente du milieu (Yezza *et al.*, 2004). De plus, Humphrey (1998) a noté que les bouchons en coton employés lors des fermentations en erlenmeyer pouvaient nuire au transfert d'oxygène. Ainsi, si la demande en oxygène des microorganismes excède la capacité de transfert gaz-liquide, le transfert d'oxygène devient alors un facteur limitant (Veglio *et al.*, 1997). La production de protéases en erlenmeyer peut donc être limitée par le transfert d'oxygène.

Somme toute, le transfert d'oxygène limité, combiné au pH non contrôlé, expliqueraient pourquoi les activités protéolytiques obtenues en erlenmeyer sont faibles. En revanche, il est possible de contrôler l'agitation, l'aération et le pH en bioréacteur. Cela expliquerait l'activité protéolytique supérieure mesurée dans ces conditions.

L'activité protéolytique obtenue en bioréacteur (4,51 U.I./mL) est plus importante qu'en erlenmeyer. Cependant, un inoculum mieux adapté permettrait d'augmenter davantage l'activité protéolytique. En effet, en examinant les courbes de croissance, une phase de latence est observée malgré l'utilisation d'un inoculum en deux étapes comprenant une pré-culture produite dans les boues. Cette phase de latence suggère que la culture bactérienne était peu adaptée aux boues lors de son transfert dans le milieu de

fermentation. En effet, la phase de latence est une phase d'adaptation des bactéries. Pendant cette phase d'adaptation, la bactérie consomme des nutriments (Prescott *et al.*, 1995). Les nutriments utilisés pendant cette phase ne sont donc plus disponibles pour la croissance de la bactérie et la production de protéases. Un inoculum bien adapté est donc nécessaire pour réduire au maximum la phase de latence et obtenir de meilleures valeurs d'activité protéolytique. À ce propos, Lachhab *et al.* (2001) ont démontré, lors de travaux portant sur la production de biopesticides (*Bacillus thuringiensis*) dans les boues d'épuration, qu'un inoculum bactérien bien adapté aux boues permet l'obtention d'une meilleure croissance, d'un nombre supérieur de cellules et de valeurs de produit (entomotoxicité) plus élevées lors de la fermentation. Également, un inoculum approprié permet de raccourcir les temps de fermentation, ce qui peut être un avantage économique lors de procédés de fermentation à grande échelle. Il y a donc intérêt à améliorer l'inoculum de *B. licheniformis* pour la production de protéases dans les boues. C'est pourquoi une étude sur l'inoculum a été réalisée dans le cadre de ce travail. Les résultats de cette étude sont présentés à la section suivante (5.3).

De plus, au cours de cette première fermentation en bioréacteur, l'agitation et l'aération ont été maintenues à des niveaux très élevés pendant toute la durée de la fermentation (500 révolutions/minute d'agitation et 4,5 L/min d'aération), de façon à maintenir la concentration en oxygène dissous très élevée en tout temps. Cette stratégie avait pour but de comparer une situation où le transfert d'oxygène est minimal (erlenmeyer) à une situation où il est maximal. Cependant, pour obtenir de bons rendements en production de protéases, il n'est pas souhaitable de maintenir l'agitation et l'aération à des niveaux aussi élevés tout au long de la fermentation. Ainsi, pendant la phase de croissance exponentielle, les cellules bactériennes hautement actives au plan métabolique consomment beaucoup d'oxygène et obligent à employer une forte agitation et une forte aération pour ne pas laisser descendre la concentration en oxygène dissous sous le seuil critique de 15-20 % (Hameed *et al.*, 1999). Par contre, la situation est différente pendant la phase stationnaire. Au cours de cette phase, les bactéries sont moins actives au plan métabolique (Prescott, 1995). L'aération et l'agitation peuvent alors être diminuées sans que la concentration en oxygène dissous dans le milieu diminue sous le seuil critique. D'ailleurs, pour la production de protéases, le maintien d'une forte agitation et d'une forte aération au cours de la phase stationnaire n'est pas souhaitable car la synthèse et l'excrétion des protéases de *B. licheniformis* surviennent majoritairement durant cette phase (Gupta *et al.*, 2002a et b). Le maintien d'une agitation et d'une aération élevée durant la phase stationnaire augmente les forces de cisaillement dans le milieu de culture, ce qui peut mener à la dénaturation des protéases excrétées à l'extérieur de la cellule bactérienne (Calik *et al.*, 2000a; Hameed *et al.*, 1999). Ainsi, il aurait été possible d'avoir des activités protéolytiques plus élevées si une stratégie différente d'agitation et d'aération avait été adoptée.

5.3 Étude de l'inoculum

Il est nécessaire d'utiliser un inoculum adéquat en termes de physiologie, d'âge et de volume afin de raccourcir au maximum la phase de latence en début de fermentation, d'obtenir une croissance bactérienne optimale et d'atteindre de fortes activités protéolytiques. Lors de cette série d'expériences, des inoculums (avec et sans étape de pré-culture en boues) d'âges variables et différents volumes d'inoculation ont été testés afin de déterminer les caractéristiques optimales de l'inoculum à employer pour une fermentation dans les boues à 25 g/L de MES. Toutes les expériences présentées dans la section 5.3 ont été réalisées en erlenmeyer. La procédure détaillée de préparation des inoculums est présentée à la section 4.1.2.

5.3.1 Croissance de *B. licheniformis* dans les boues après une inoculation en une étape (sans pré-culture en boues)

Un essai a été réalisé en inoculant directement un erlenmeyer contenant des boues d'épuration à 25 g/L de MES avec 3% d'une culture de départ de 12 h préparée en bouillon nutritif. Aucune pré-culture en boue n'a été utilisée afin d'acclimater les cellules bactériennes aux boues d'épuration (inoculation en une étape). La Figure 5 illustre la croissance de *B. licheniformis* lors de cette fermentation.

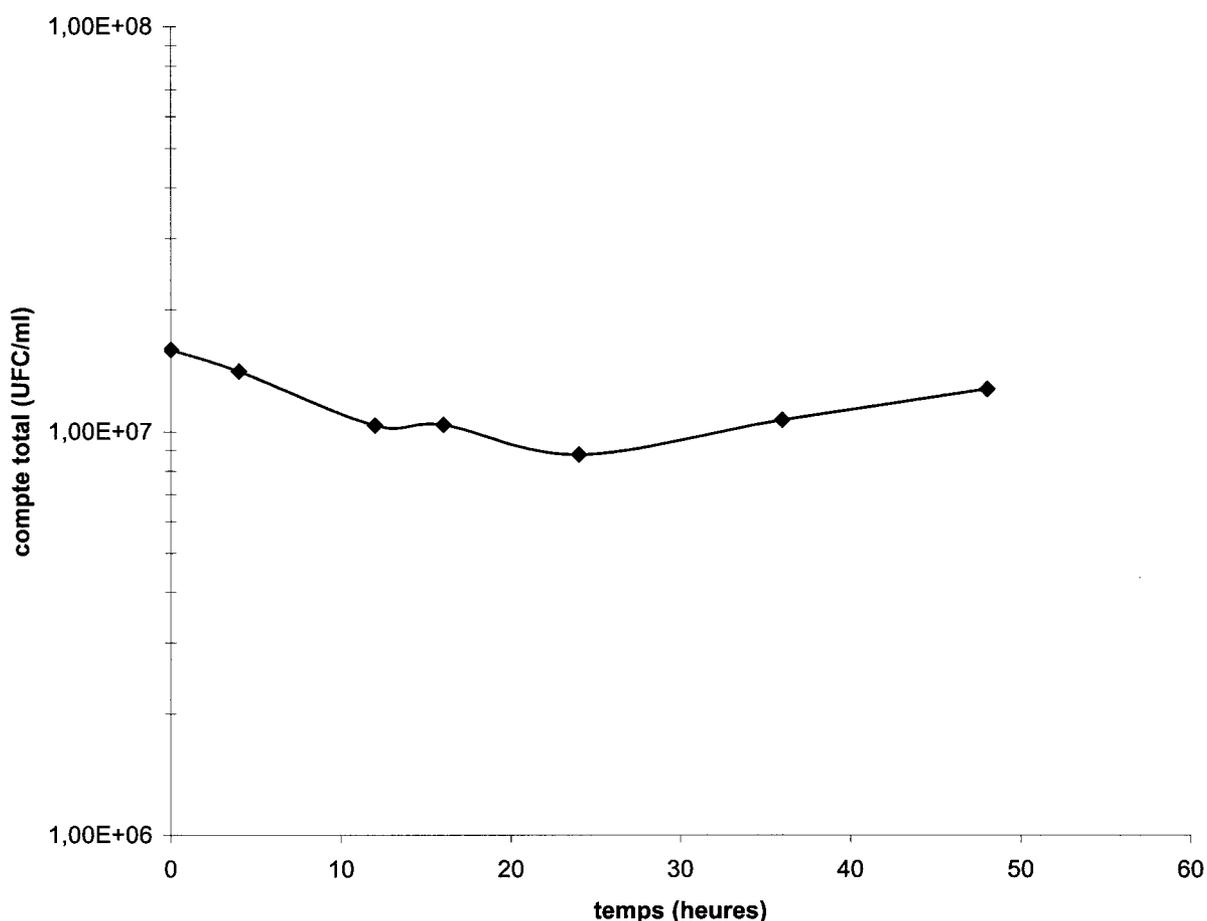


Figure 5 Évolution du nombre de cellules de *B. licheniformis* en fonction du temps lors d'une fermentation effectuée en erlenmeyer, dans les boues à 25 g/L de MES ayant été inoculées à 3 % (v/v) avec une culture de départ en bouillon nutritif âgée de 12 h.

La Figure 5 montre que l'inoculation des boues à 25 g/L de MES à partir d'une culture d'enrichissement (bouillon nutritif) n'a pas permis d'obtenir une bonne croissance lors de la fermentation sur une période de 48 h. En effet, une phase de déclin de la population bactérienne est observée dans les premières heures de la fermentation. Par la suite, une très faible augmentation du nombre de cellules est observée, si bien que le nombre de cellules à la fin de la fermentation n'est que légèrement supérieur à celui au début de la culture. Cette observation indique que l'adaptation des bactéries aux boues d'épuration est difficile lors d'une inoculation à partir d'un bouillon nutritif.

La difficulté de la bactérie à bien s'adapter lors du passage du bouillon nutritif aux boues pourrait s'expliquer par des différences importantes existant entre ces deux milieux au niveau de la composition en

éléments nutritifs. Également, dans le bouillon nutritif, les éléments nutritifs se retrouvent sous forme soluble (peptones et extraits de viande) alors que dans les boues, la matière nutritive est majoritairement présente sous forme de matière en suspension (Barnabé, 2004). Il est donc difficile pour la bactérie de s'adapter aux boues dans ces conditions.

La faible croissance de *B. licheniformis* observée dans les boues pourrait également s'expliquer par un phénomène d'inhibition de la croissance par de fortes concentrations en solides. En effet, le passage d'un milieu faiblement concentré (faible concentration en éléments nutritifs) à un milieu plus fortement concentré amène des modifications au niveau de la pression osmotique. De brusques et grandes modifications dans la pression osmotique peuvent affecter le métabolisme de la cellule et empêcher son bon fonctionnement (Prescott, 1995).

Suite à ces résultats, un essai a été réalisé avec des boues à 15 g/L de MES afin de vérifier si une plus faible concentration en solides pouvait permettre une meilleure adaptation de la bactérie. Les boues à 15 g/L de MES ont été préparées en diluant les boues à 25 g/L de MES avec le surnageant retiré des boues lors de l'étape de la concentration (décantation) des boues. Les boues ont été inoculées directement avec 3 % d'une culture de départ de 12 h préparée en bouillon nutritif. La Figure 6 illustre la croissance de *B. licheniformis* dans les boues à 15 g/L de MES.

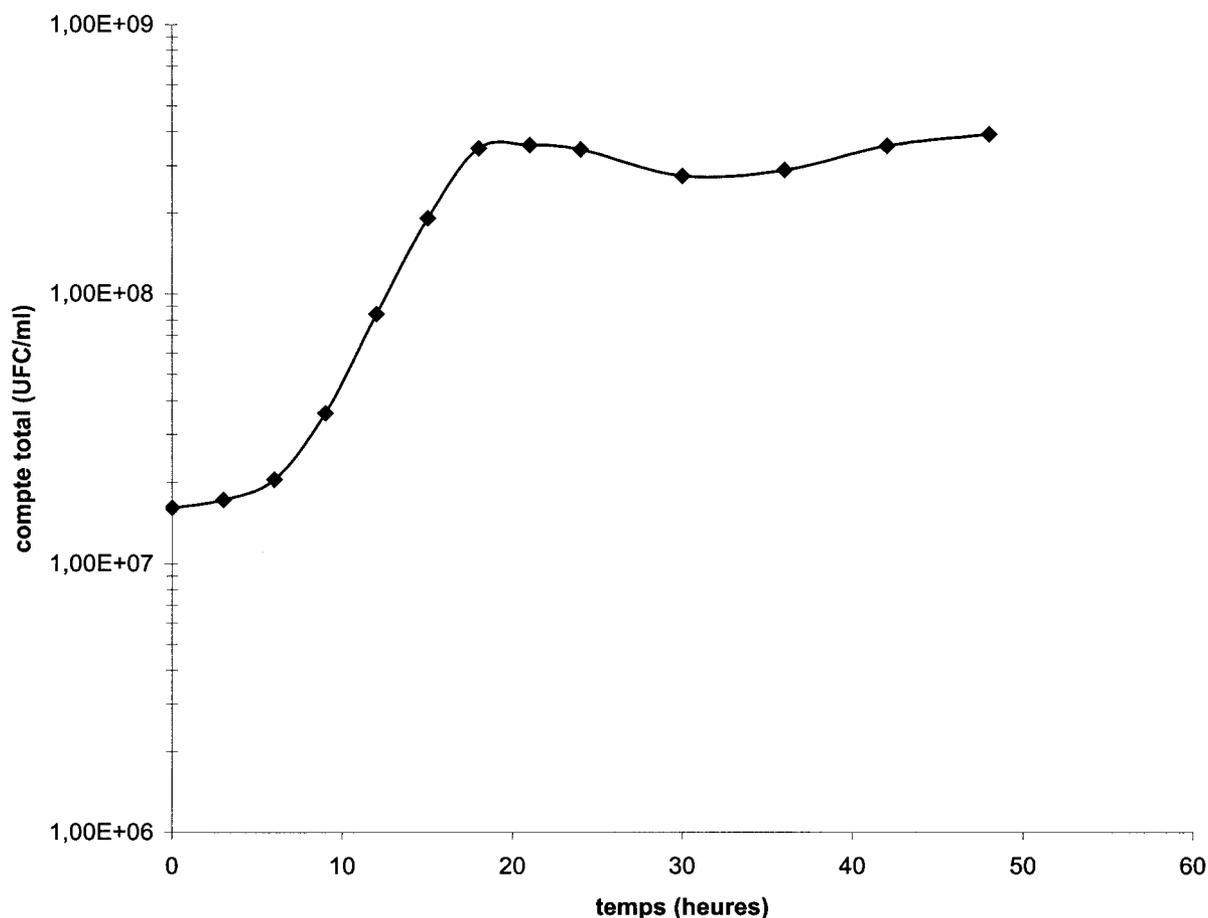


Figure 6 Évolution du nombre de cellules de *B. licheniformis* en fonction du temps lors d'une fermentation effectuée en erlenmeyer, dans les boues à 15 g/L de MES ayant été inoculées à 3% (v/v) avec une culture de départ en bouillon nutritif âgée de 12h.

La Figure 6 indique que le transfert de *B. licheniformis* du bouillon nutritif aux boues à 15 g/L de MES permet à la bactérie de s'adapter aux boues d'épuration. En effet, après une période de latence (0 à 6 h), une phase de croissance du temps 9 h au temps 18 h est observée.

En comparaison avec les boues à 25 g/L de MES, les boues à 15 g/L de MES favorisent l'adaptation de la bactérie. Comme le surnageant des boues contient très peu d'éléments nutritifs, la dilution des boues à 25 g/L de MES avec le surnageant (pour obtenir des boues à 15 g/L de MES) n'amène pas de changements dans le type d'éléments nutritifs du milieu, mais apporte des changements importants au niveau de leur concentration. Cela suggère que la meilleure adaptation de la bactérie dans les boues plus diluées (15 g/L de MES) serait due à l'absence du phénomène d'inhibition par la forte concentration en solides, phénomène présent dans les boues plus fortement concentrées (Vidyarthi, 2002 ; Barnabé, 2004).

Cependant, la phase de latence (0 à 6 h) observée au début de la fermentation dans les boues à 15 g/L de MES (Figure 6) suggère que les cellules bactériennes de l'inoculum préparé dans le milieu nutritif étaient peu adaptées aux boues d'épuration lors de l'inoculation du milieu de fermentation. L'adaptation des bactéries a eu lieu durant les premières heures de la fermentation. Tel que discuté à la section 5.2, il est préférable d'employer un inoculum contenant des cellules bien adaptées au milieu de fermentation afin de réduire la phase de latence et d'obtenir une meilleure croissance pendant la fermentation. Pour les fermentations dans les boues d'épuration, l'emploi d'un inoculum en deux étapes, comprenant une pré-culture en boues, permettrait d'obtenir un inoculum bien adapté aux boues. En effet, dans un inoculum en deux étapes, un milieu riche en éléments nutritifs facilement assimilables (culture de départ) est tout d'abord utilisé afin de permettre une bonne croissance de la bactérie. Par la suite, un milieu de culture dont la composition est semblable au milieu de fermentation (pré-culture) est utilisé en second lieu afin de permettre l'adaptation des cellules bactériennes au milieu de fermentation, ce qui permet de minimiser la phase de latence lors de la fermentation (Vidyarthi *et al.*, 2002).

Ainsi, pour les fermentations dans les boues, une culture de départ en bouillon nutritif permettra d'obtenir une bonne croissance de *B. licheniformis* et une pré-culture dans les boues d'épuration permettra une bonne adaptation des cellules bactériennes. Idéalement, afin d'assurer une adaptation optimale de la bactérie, les boues employées lors de la pré-culture devraient être de la même concentration que les boues employées pour la fermentation. Cependant, pour une fermentation dans les boues à 25 g/L de MES, l'emploi de boues à 25 g/L de MES pour la préparation de la pré-culture est problématique (Figure 5). En effet, il est souhaitable d'inoculer le milieu de fermentation au moment où les cellules bactériennes de la pré-culture sont en phase de croissance exponentielle. Or, la Figure 5 montre que les cellules bactériennes, lorsque transférées d'un bouillon nutritif vers des boues à 25 g/L de MES, ne parviennent pas à entrer en phase de croissance exponentielle sur une période de 48 h. Dans ces circonstances, il est justifié d'employer des boues à 15 g/L pour la pré-culture. En effet, la Figure 6 démontre que les cellules, lorsque transférées d'un bouillon nutritif dans les boues à 15 g/L de MES, sont en phase de croissance exponentielle entre 9 h et 15 h (Figure 6). Une pré-culture préparée dans les boues à 15 g/L de MES et âgée entre 9 h et 15 h permettrait de transférer des cellules en phase de croissance exponentielle dans le milieu de fermentation. Différents âges de pré-culture ont donc été étudiés afin de vérifier laquelle entraîne la meilleure croissance de *B. licheniformis* dans les boues. Les résultats sont présentés dans la section suivante.

5.3.2 Croissance de *B. licheniformis* dans les boues à 25 g/L de MES après une inoculation en deux étapes

5.3.2.1 Influence de l'âge de la pré-culture

Les résultats présentés à la section 5.3.1 indiquent la nécessité d'utiliser un inoculum préparé en deux étapes. Tel que suggéré dans la section précédente, la concentration en MES de la pré-culture est importante pour l'adaptation de la bactérie. Il est également important de s'assurer que l'emploi de boues pour la pré-culture dont la concentration en MES est différente de celle du milieu de culture à inoculer permette néanmoins une bonne adaptation de la bactérie. De plus, l'âge de la pré-culture doit aussi être considéré. À ce propos, Dufresne (2004) a démontré, au cours d'essais portant sur la production de biofertilisant à partir des boues d'épuration, que l'âge de la pré-culture a une grande influence sur le nombre de cellules obtenues lors de la fermentation. Une pré-culture préparée dans les boues à 15 g/L de MES et âgée entre 9 h et 15 h pourrait être employée pour inoculer les milieux de fermentation (section 5.3.1). Il s'agit alors de déterminer l'âge de la pré-culture permettant d'obtenir un nombre maximum de cellules et de spores.

Pour ces essais, une culture de départ de 12 h est préparée dans un bouillon nutritif et utilisée pour inoculer à 2 % (v/v) en triplicata des pré-cultures composées de boues à 15 g/L de MES. Par la suite, des milieux de fermentation composés de boues à 25 g/L de MES ont été inoculés avec 3% des pré-cultures âgées de 9 h, 12 h et 15 h. L'évolution du nombre de cellules et de spores a été suivie au cours de chaque fermentation. La Figure 7 illustre les résultats obtenus lors des différents essais.

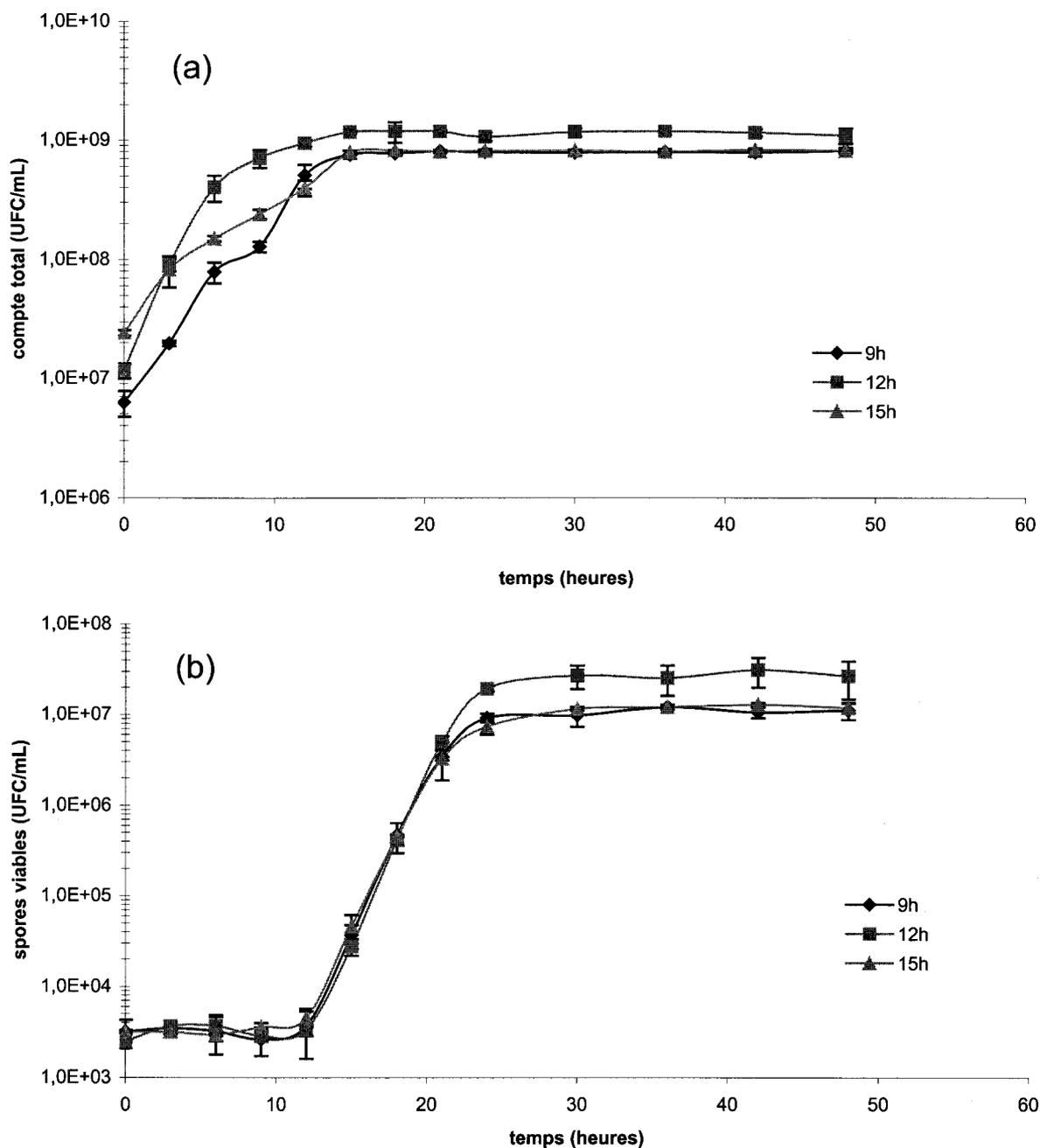


Figure 7 Évolution du nombre moyen de cellules (a) et de spores (b) de *B. licheniformis* lors de fermentations en erlenmeyer dans les boues secondaires de la CUQ (25 g/L de MES). Boues inoculées à 3% (v/v) avec des pré-cultures en boue (15 g/L de MES) âgées de 9 h, 12 h ou 15 h. Essais effectués en triplicata. Les écarts-types ont été déterminés à partir des valeurs obtenues lors des trois essais

La Figure 7a indique que la pré-culture préparée dans les boues à 15 g/L permet une bonne adaptation des bactéries dans les boues à 25 g/L de MES. Pour chacun des essais, aucune phase de latence n'est observée au début de la fermentation. De faibles variations sont observées dans les taux de croissance spécifique maximum (μ_m) obtenus lors des différents essais (Tableau 9).

Tableau 9 Moyenne des nombres maximums de cellules et de spores et des taux de croissance spécifiques maximums obtenus pour les fermentations effectuées dans les boues à 25 g/L de MES et inoculées avec des pré-cultures d'âges variables.

Âge de l'inoculum (h)	Nombre maximum de cellules obtenues (UFC/mL)*	Nombre maximum de spores obtenues (UFC/mL)*	μ_m (h ⁻¹)
9	8,08 x 10 ⁸ (48 h)	1,21 x 10 ⁷ (36 h)	0,34
12	1,18 x 10 ⁹ (36 h)	3,11 x 10 ⁷ (42 h)	0,42
15	8,22 x 10 ⁸ (42 h)	1,27 x 10 ⁷ (42 h)	0,27

*Le temps entre parenthèses indique le temps où la valeur a été obtenue

Selon le Tableau 9, l'âge de la pré-culture a néanmoins une influence sur le nombre de cellules et de spores obtenues lors de la fermentation. Une pré-culture âgée de 12 h donne les meilleurs résultats en terme de nombre de cellules et de spores obtenues. Il est possible qu'une pré-culture âgée de 12 h ait permis d'introduire un nombre adéquat de cellules actives sur le plan métabolique dans le milieu de fermentation, ce qui favoriserait la croissance et la production de cellules végétatives ainsi que la formation de spores. Cette observation suggère qu'une concentration initiale de 1,16x10⁷ UFC/mL de cellules adaptées aux boues offre des conditions de croissance adéquate pour *B. licheniformis* dans ce milieu de culture. La différence avec les deux autres pré-cultures de 9 h et 15 h pourrait s'expliquer par le nombre initial de cellules (6,26 x 10⁶ et 2,42 x 10⁷ respectivement) qui est un paramètre bien connu pour influencer la croissance bactérienne (Prescott, 1995). Ainsi, avec l'emploi d'une pré-culture de 9 h le nombre initial de cellules et de spores dans le milieu de fermentation ne serait pas suffisant. Un nombre inférieur de cellules et de spores en résulterait donc après la phase de croissance exponentielle. Avec l'emploi d'une pré-culture de 15 h, un nombre de cellules trop élevé au temps initial pourrait avoir un effet inhibiteur sur la croissance. Ce phénomène avait également été observé avec les travaux de Barnabé (2000) lors de la fermentation des boues d'épuration avec *Bacillus thuringiensis*.

Le nombre moins important de cellules et de spores obtenues avec l'emploi d'une pré-culture plus âgée (15 h) pourrait également s'expliquer par la possibilité que les cellules bactériennes sont en fin de

croissance exponentielle (Figure 6). Cela suggère qu'elles étaient plus lentes à réagir au transfert en bioréacteur et à croître comme en témoigne le plus faible μ_m obtenu (Tableau 9).

Ainsi, comme la pré-culture de 12 h est celle qui a permis d'obtenir le nombre maximum de cellules et de spores lors de la fermentation, elle a été sélectionnée pour l'étude du volume de l'inoculum.

5.3.2.2 Influence du volume d'inoculation

Les résultats obtenus à la section précédente ont permis de déterminer l'âge optimal de la pré-culture à employer. Cependant, le volume de l'inoculum utilisé est un autre facteur qui peut avoir une influence sur le nombre de cellules obtenues lors de la fermentation. Lachhab *et al.* (2001) ont démontré que le volume d'inoculum employé a une influence sur le nombre de cellules et de spores obtenues au cours de fermentation dans les boues avec *Bacillus thuringiensis*. Cela suggère que le volume d'inoculation pourrait avoir aussi une influence sur le nombre de cellules et de spores de *B. licheniformis* produites dans les boues. Lors de ces expériences, un inoculum en deux étapes, comprenant une pré-culture de 12h a été employé et différents volumes d'inoculation ont été étudiés. L'évolution du nombre de cellules et de spores a été suivie au cours de chaque fermentation. La Figure 8 illustre les résultats obtenus lors des différents essais.

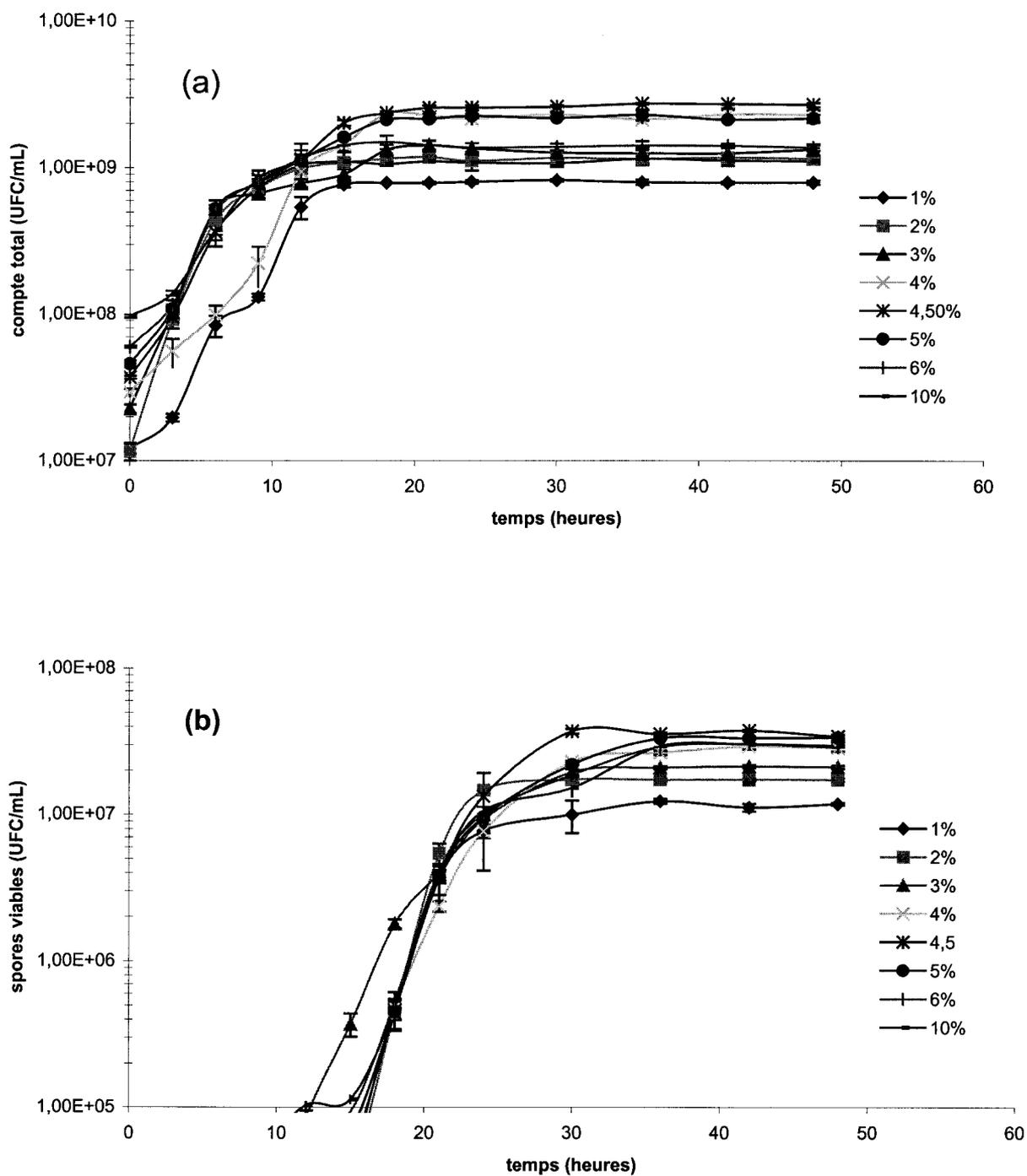


Figure 8

Évolution du nombre moyen de cellules (a) et de spores (b) de *B. licheniformis* obtenues lors de fermentations effectuées en erlenmeyer, dans les boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES. Boues inoculées avec différents volumes d'une pré-culture préparée dans des boues à 15 g/L de MES et âgée de 12 h. Essais effectués en triplicata. Les écarts-types ont été déterminés à partir des valeurs obtenues lors des trois essais.

La Figure 8 démontre que l'âge de la pré-culture a une influence sur le nombre de cellules obtenues lors des fermentations.

Le Tableau 10 fait la synthèse des comptes maximaux de cellules et de spores obtenus. Le nombre de cellules obtenues s'accroît lorsque le pourcentage d'inoculation augmente, jusqu'à un volume d'inoculation de 4,5 %. Comme les taux de croissance obtenus sont très semblables pour les essais de 1 à 4,5 % (v/v), les différences dans le nombre maximum de cellules obtenues s'expliquent possiblement par le nombre de cellules au départ. En effet, avec des taux de croissance similaires, un nombre plus élevé de cellules au départ a permis d'atteindre un nombre supérieur de cellules à la fin de la fermentation. Ainsi, l'essai à 4,5 % (v/v) a permis d'obtenir un nombre de cellules plus élevé que les autres essais.

Tableau 10 Moyenne des nombres maximaux de cellules et de spores et des taux de croissance spécifiques maximaux obtenus pour les fermentations effectuées dans les boues à 25 g/L avec différents volumes d'inoculation.

Volume de l'inoculum (% v/v)	Nombre maximum de cellules obtenues (UFC/mL)*	Nombre maximum de spores obtenues (UFC/mL)*	μ_m (h ⁻¹)
1	8,23 x 10 ⁸ (30 h)	1,23 x 10 ⁷ (36 h)	0,37
2	1,19 x 10 ⁹ (21 h)	1,74 x 10 ⁷ (42 h)	0,41
3	1,42 x 10 ⁹ (21 h)	2,15 x 10 ⁷ (42 h)	0,29
4	2,31 x 10 ⁹ (42 h)	2,93 x 10 ⁷ (42 h)	0,37
4.5	2,73 x 10 ⁹ (36 h)	3,77 x 10 ⁷ (42 h)	0,29
5	2,29 x 10 ⁹ (36 h)	3,38 x 10 ⁷ (48 h)	0,30
6	1,50 x 10 ⁹ (18 h)	3,04 x 10 ⁷ (42 h)	0,31
10	1,15 x 10 ⁹ (36 h)	3,03 x 10 ⁷ (42 h)	0,30

*Le temps entre parenthèses indique le temps où la valeur a été obtenue.

Lorsque des concentrations d'inoculation sont plus élevées que 4,5 %, il y a une diminution du nombre de cellules obtenues. Plus le volume de l'inoculum augmente, plus la concentration de cellules au départ est élevée. Il est possible que des concentrations initiales de cellules trop élevées soient défavorables à la croissance microbienne. Ce phénomène a aussi été observé et discuté à la section précédente.

Pour les volumes d'inoculation de 1, 2 et 3 et 4 et 4,5 % (v/v), il y a une relation entre le nombre de cellules et de spores obtenues. Selon ces résultats, plus le nombre de cellules obtenues est élevé, plus la quantité de spores est importante. Ainsi, l'essai à 4,5 % (v/v) a permis d'atteindre un nombre maximum de spores plus

élevé que les autres essais. Lorsque les volumes d'inoculation sont supérieurs à 4,5 %, des diminutions de la quantité de spores sont observées. Ceci est peut-être dû à la faible production de cellules végétatives (Figure 8a) observée lors de ces essais.

La combinaison des résultats obtenus lors de cette série d'expériences permet de déterminer les caractéristiques appropriées de l'inoculum pour obtenir un nombre maximum de cellules lors de la fermentation. Ainsi, les essais de fermentation en bioréacteur présentés dans les prochaines sections ont été réalisés avec un inoculum en deux étapes préparé de la façon suivante : une culture de départ de 12h, préparée dans un bouillon nutritif, est utilisée pour inoculer à 2 % (v/v) une pré-culture composée de boues à 15 g/L de MES. La pré-culture est incubée sur une période de 12 h et le milieu de fermentation est inoculé avec 4,5 % de la pré-culture.

Il est à noter que l'activité protéolytique n'a pas été mesurée lors des essais pour étudier l'inoculum. Les critères de performance choisis pour l'optimisation de l'inoculum sont le nombre de cellules et de spores obtenues. Calik *et al.* (2000a) soulignent que les conditions permettant la production maximale de protéases sont celles qui, d'une part, permettent l'atteinte d'un nombre maximum de cellule durant la fermentation et d'autre part, permettent l'atteinte des activités cellulaires spécifiques maximales (activité protéolytique produite par chaque cellule). L'inoculum a donc été amélioré de façon à obtenir une croissance maximale (nombre maximum de cellules et de spores) au cours des fermentations. Ainsi, l'emploi d'un inoculum amélioré lors des fermentations en bioréacteur (présentées dans les sections suivantes) devrait permettre d'obtenir une croissance optimale en terme de nombre de cellules et de spores, et l'influence de différents facteurs, autres que l'inoculum, sur la croissance et l'activité protéolytique pourra être étudiée lors de ces fermentations.

5.4 Comparaison de la croissance de *B. licheniformis* et de l'activité protéolytique dans les boues à 25 g/L et dans le milieu synthétique

Au cours de cette série d'expériences, deux fermentations en bioréacteur ont été réalisées. Une première fermentation en milieu synthétique a été réalisée pour évaluer la croissance de *B. licheniformis* et l'activité protéolytique dans un milieu synthétique de référence. Par la suite, une fermentation dans les boues à 25 g/L de MES a été réalisée, et un inoculum en deux étapes, préparé selon les meilleures conditions déterminées à la section 5.3, a été utilisé. L'inoculum pour la fermentation en milieu synthétique a été préparée selon la même procédure, mais en utilisant une pré-culture composée de milieu synthétique plutôt que de boues (voir section 4.1.2 pour la procédure détaillée de préparation des inoculums). La

Figure 9 illustre l'évolution de la croissance de *B. licheniformis* dans les boues à 25 g/L et dans le milieu synthétique.

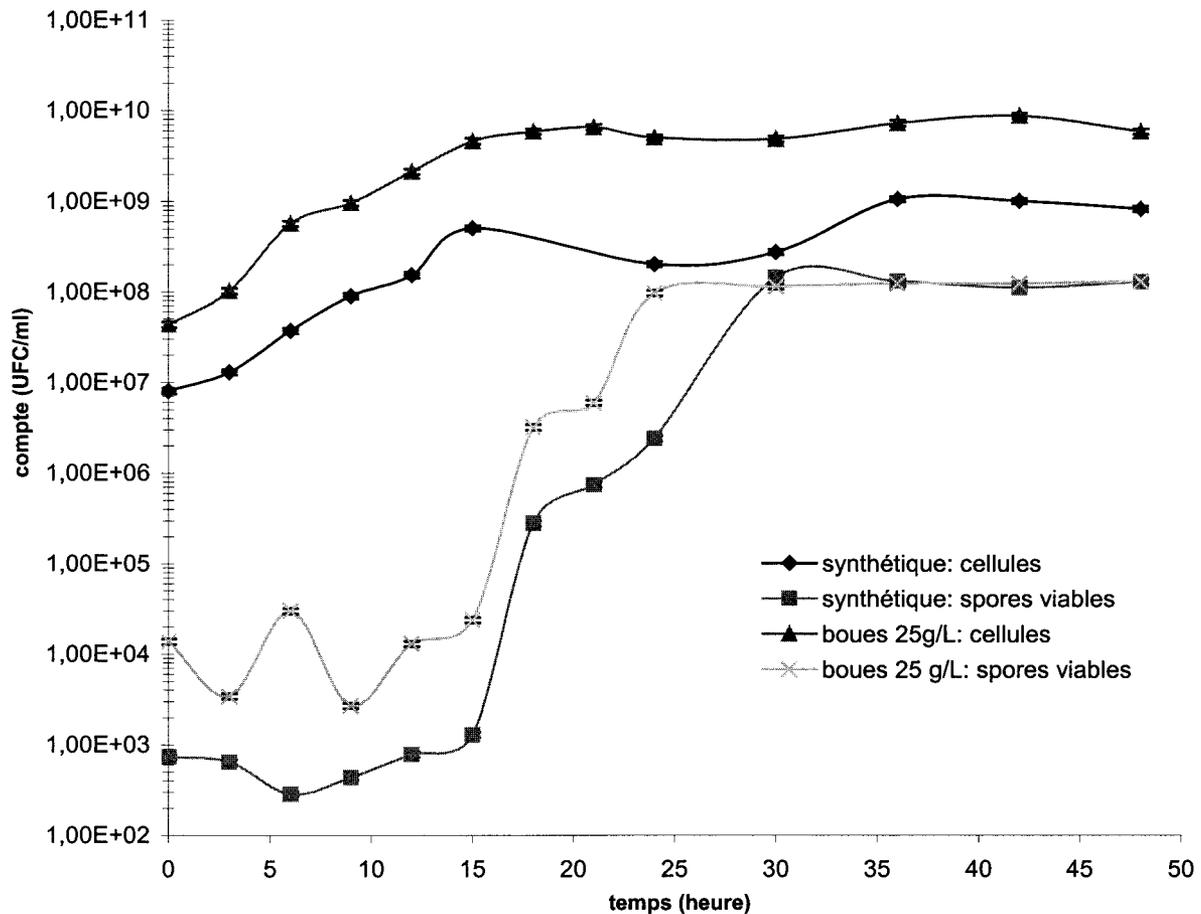


Figure 9 Évolution du nombre de cellules et de spores viables de *B. licheniformis* en fonction du temps lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues à 25 g/L de MES et dans un milieu synthétique de référence ayant été inoculés avec un inoculum amélioré. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 7 %.

Les courbes de croissance illustrées à la Figure 9 permettent de distinguer la phase de croissance exponentielle et la phase stationnaire. Aucune phase de latence n'a été observée. L'inoculum employé a permis une bonne adaptation de la bactérie aux deux milieux de fermentation. Dans les deux cas, les cellules sont en phase de croissance exponentielle durant les 15 premières heures de fermentation. Au cours de cette phase, les taux de croissance spécifique maximum obtenus dans le milieu synthétique et dans les boues sont de 0,39/h et de 0,36/h respectivement. Le nombre de cellules obtenues est plus élevé dans les boues ($8,57 \times 10^9$ UFC/mL) que dans le milieu synthétique ($1,06 \times 10^9$ UFC/mL).

Les courbes d'évolution des spores viables dans les boues et le milieu synthétique permettent de constater qu'il n'y a pas d'augmentation notable du nombre de spores pendant la phase exponentielle de croissance.

Cependant, des spores sont observées dans les deux milieux dès le début de la fermentation, ce qui signifie que des spores étaient présentes dans les pré-cultures. Dans les deux milieux étudiés, le début de la phase de sporulation coïncide avec la fin de la phase de croissance exponentielle et le début de la phase stationnaire (15-18 h). Le nombre maximum de spores est atteint après 24 h de fermentation dans les boues et après 30 h de fermentation dans le milieu synthétique, mais leurs valeurs sont similaires.

La Figure 10 présente l'évolution de l'activité enzymatique au cours des deux fermentations. L'activité enzymatique maximale mesurée est de 12,5 U.I./mL dans le milieu synthétique et de 9,9 U.I./mL dans les boues à 25 g/L de MES. L'activité protéolytique est pratiquement nulle pendant la phase exponentielle pour les deux milieux. L'augmentation de l'activité protéolytique coïncide avec la transition entre la phase de croissance exponentielle et le début de la phase stationnaire. L'activité protéolytique maximale est atteinte vers la fin de la fermentation, soit après 42 h dans les boues et 45 h dans le milieu synthétique. Une fois l'activité protéolytique maximale atteinte, une diminution est observée dans les deux milieux.

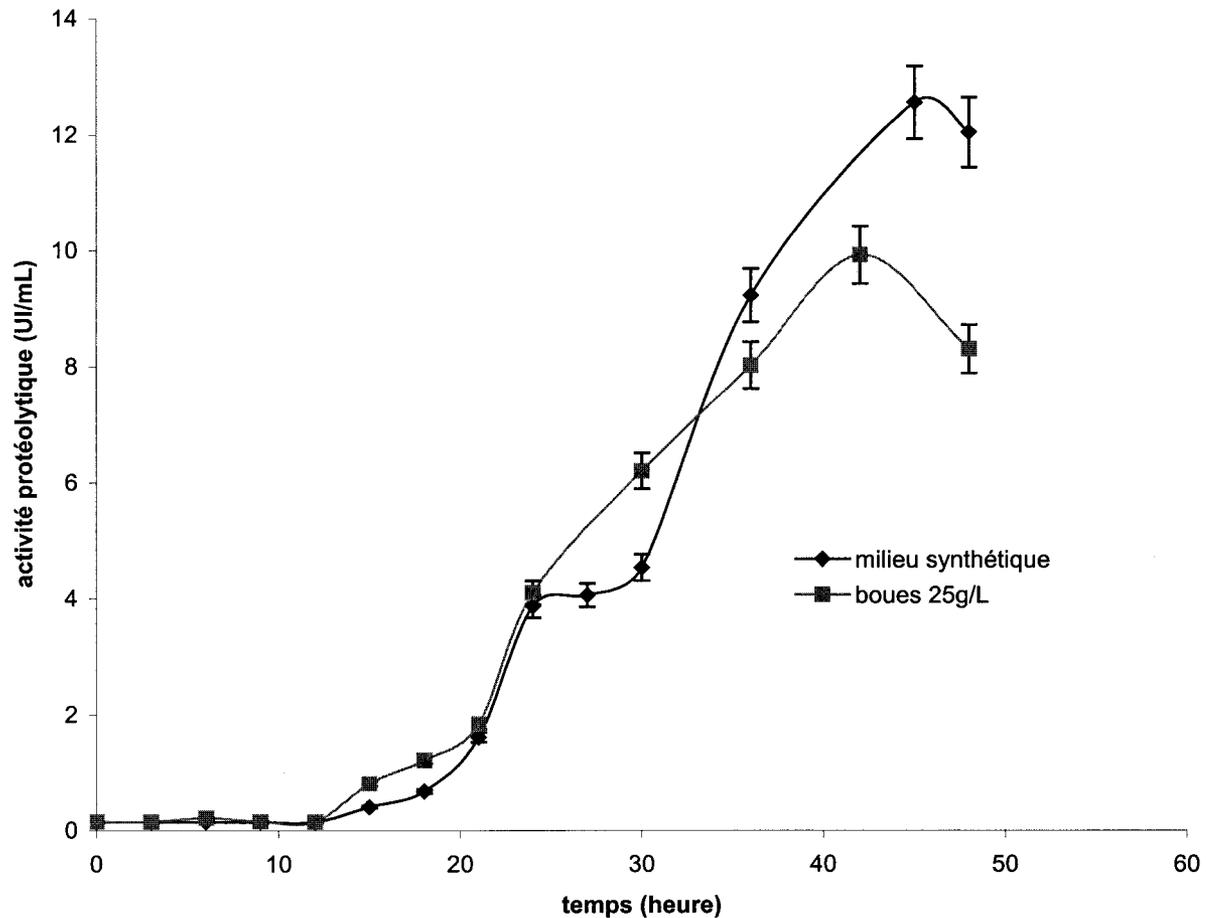


Figure 10 Évolution de l'activité protéolytique lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues à 25 g/L de MES et dans le milieu synthétique ayant été inoculés avec un inoculum amélioré. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 5 %.

L'absence d'activité protéolytique notable durant la phase de croissance exponentielle dans les deux milieux suggère que la production de protéases était nulle lors de cette phase. L'absence de production de protéases chez *B. licheniformis* durant la phase de croissance exponentielle a été rapportée dans la littérature (Frankena *et al.*, 1985; Kumar *et al.*, 1999). En effet, durant la phase de croissance exponentielle, la cellule croît en utilisant préférentiellement les sources de carbone et d'azote facilement assimilables, et la présence de ces substrats peut avoir un effet inhibiteur sur la production de protéases (Doi, 1974; Gupta *et al.*, 2002a et b; Kumar *et al.*, 1999; Mabrouk *et al.*, 1999). Ainsi, dans le milieu synthétique employé, le glucose est rapidement métabolisé lors de la phase de croissance exponentielle. Il a été établi que le glucose inhibe la production de protéases par un mécanisme de répression catabolique (Ferrero *et al.*, 1996; Frankena *et al.*, 1985; Gupta *et al.*, 2002a; Kumar *et al.*, 1999; Puri *et al.*, 2002;

Sinha *et al.*, 1991), ce qui expliquerait l'absence d'activité protéolytique durant les premières heures de la fermentation.

Au temps 15 h, une augmentation de l'activité protéolytique est observée dans les deux milieux. Cette observation suggère que cette période pourrait correspondre au moment où le glucose est entièrement consommé par les cellules bactériennes. Effectivement, lors de certains essais dans des milieux de fermentation contenant du glucose, il a été établi que la production de protéases commence lorsque le glucose est épuisé dans le milieu (Ferrero *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 1999).

Comme les profils d'activité protéolytique dans les boues et le milieu synthétique sont très semblables (Figure 10), certains parallèles peuvent être établis entre les deux milieux. Les boues contiennent au départ une grande variété de substrats, dont certains sont simples et facilement assimilables par *B. licheniformis*. La présence de ces substrats simples aurait un effet inhibiteur sur la production de protéases et, lors de la phase de croissance exponentielle, ces substrats seraient tout d'abord consommés. Après 15 h de fermentation, l'épuisement potentiel de ces substrats entraînerait la disparition de leur effet inhibiteur (Yezza *et al.*, 2005 b). Les protéases seraient alors produites et excrétées par les cellules bactériennes, d'où l'augmentation de l'activité protéolytique observée. Il serait intéressant lors de travaux ultérieurs d'étudier l'effet de l'ajout aux boues de substrats facilement assimilables (comme le glucose) sur l'activité protéolytique.

Dans les deux milieux, la production de protéases débute à partir du temps 15 h lorsque les cellules entrent en phase de croissance stationnaire et en phase de sporulation (Figures 9 et 10). La production de protéases associée à la phase stationnaire a été rapportée par de nombreux auteurs avec les bactéries du genre *Bacillus* (Beg *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2002a et b; Kumar *et al.*, 1999; Calik *et al.*, 2000b). L'initiation simultanée de la production de protéases et de la phase de sporulation suggère une relation entre la sporulation et la production de protéases. De nombreux travaux suggèrent d'ailleurs un lien indirect entre les deux mécanismes (Doi, 1974; Gupta *et al.*, 2002a et b; Kumar *et al.*, 1999; Mabrouk *et al.*, 1999). En effet, tel que discuté à la section 2.3, l'initiation de la sporulation et la production de protéases ne seraient pas directement liées, mais quelques mécanismes communs seraient impliqués dans la régulation des deux événements. Ainsi, certaines étapes de la synthèse et de l'excrétion des protéases ainsi que de la sporulation seraient partiellement inductibles. Ces mécanismes pourraient aussi être communément stimulés sous certaines conditions ou en présence de certaines molécules, tout en étant sujets à la répression catabolique par des composés facilement assimilables.

Les Figures 9 et 10 suggèrent une relation entre la sporulation et l'activité protéolytique entre les temps 12 h et 24 h dans les boues, et entre les temps 12 h et 30 h dans le milieu synthétique. En effet, plus le nombre de spores augmente, plus l'activité protéolytique augmente aussi. Toutefois, après 24 h dans les boues et après 30 h dans le milieu synthétique, le nombre de spores n'augmente plus de façon notable, alors que l'activité protéolytique continue d'augmenter considérablement. Cette relation est illustrée à la Figure 11. Ces résultats tendent à démontrer que les processus de sporulation et de production de protéases demeurent indépendants l'un de l'autre, même si certains mécanismes régulateurs communs peuvent être impliqués au niveau des deux événements.

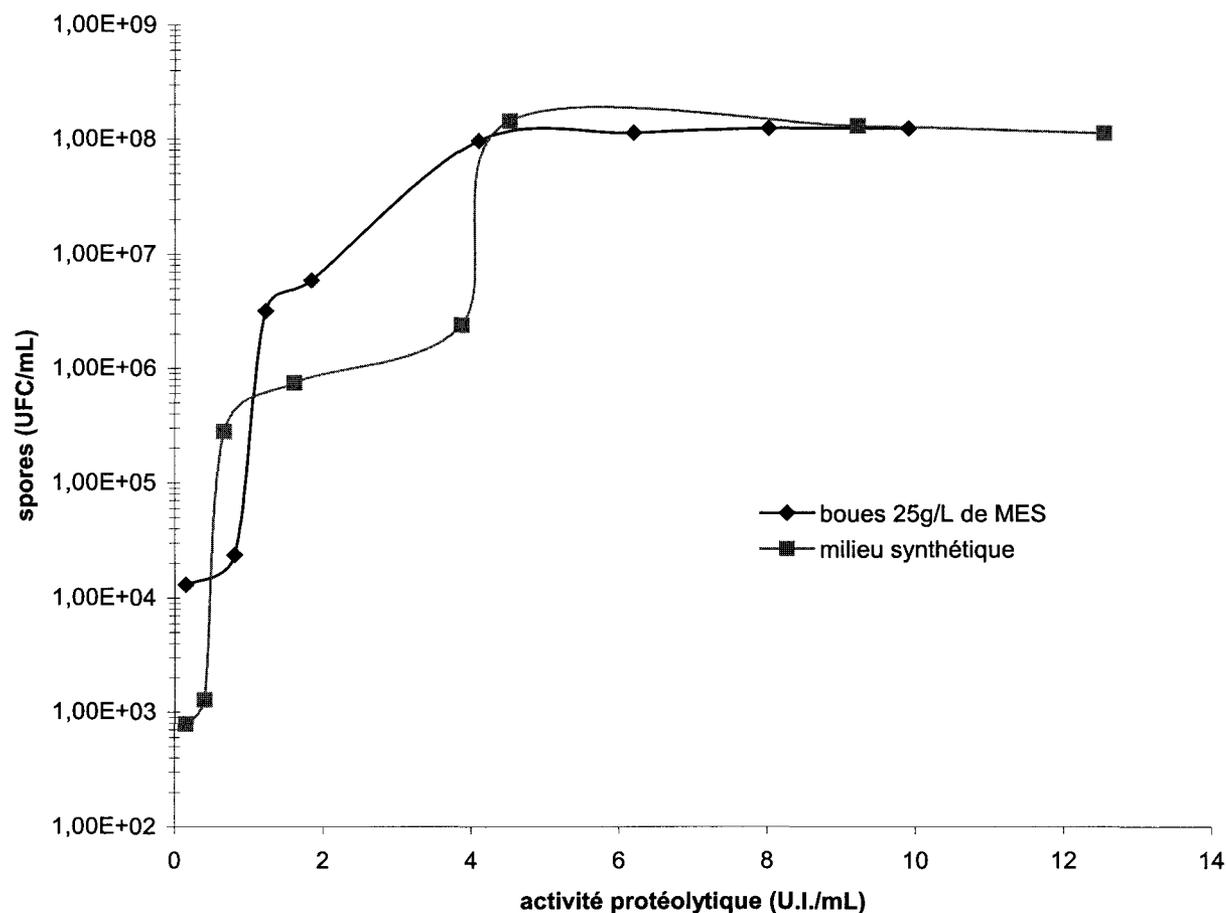


Figure 11 Relation entre la concentration de spores et l'activité protéolytique obtenue pour le milieu synthétique et les boues à 25 g/L de MES.

Quelques hypothèses peuvent être émises pour expliquer la diminution de l'activité protéolytique observée après 45 h de fermentation. Cette diminution pourrait être causée par une limitation des nutriments dans les boues suite à leur consommation par les microorganismes (Yezza *et al.*, 2005 b). Les travaux de Beg *et al.* (2002) et de Puri *et al.* (2002) suggèrent que la production de protéases diminue lorsque la concentration en nutriments devient limitante. Également, la diminution de l'activité protéolytique pourrait s'expliquer par une désactivation des protéases produites. Selon Chu *et al.* (1992), cette désactivation pourrait être causée par un phénomène d'auto-digestion ou par la digestion des protéases extracellulaires par certaines protéases intracellulaires larguées dans le milieu suite à la lyse cellulaire à la fin du processus de la sporulation. Après 45 h de fermentation, un taux de désactivation supérieur au taux de synthèse des protéases amènerait ainsi une baisse de l'activité protéolytique mesurée.

Également, la comparaison entre le nombre de cellules obtenues et l'activité protéolytique mesurée pour les deux milieux permet de constater que l'activité protéolytique dans le milieu synthétique est supérieure à celle obtenue dans les boues, malgré que le nombre de cellules observées y soit moins élevé. Il n'y a donc pas de relation directe entre le nombre de cellules et l'activité protéolytique. D'ailleurs, il est reconnu que les conditions de culture qui permettent l'atteinte d'un nombre maximum de cellules ne sont pas nécessairement celles qui permettent la production d'un nombre maximum de protéases (Kumar *et al.*, 1999). Tel que discuté à la section précédente, les conditions permettant la production maximale de protéases sont celles qui, d'une part, permettent l'atteinte d'un nombre maximum de cellule durant la fermentation et d'autre part, permettent l'atteinte des activités cellulaires spécifiques maximales (activité protéolytique produite par chaque cellule). Parmi les conditions de culture influençant l'activité protéolytique cellulaire spécifique, la composition du milieu a naturellement une grande importance. Ainsi, il est possible que l'activité protéolytique cellulaire spécifique (U.I./cellule bactérienne) en milieu synthétique soit supérieure à celle obtenue dans les boues. Par contre, il est intéressant de constater que le nombre de cellules obtenues est plus important dans les boues que dans le milieu synthétique. L'optimisation des conditions et des paramètres de culture permettrait d'augmenter l'activité protéolytique cellulaire spécifique (U.I./cellule bactérienne) dans les boues et d'obtenir des activités protéolytiques supérieures.

5.5 Effet de la concentration en MES des boues d'épuration sur la croissance de *Bacillus licheniformis* et sur l'activité protéolytique

Des expériences en bioréacteur ont été réalisées pour étudier l'effet des concentrations des boues sur la croissance de *B. licheniformis* et sur l'activité protéolytique. Quatre concentrations en MES (25, 30, 35 et 40 g/L) ont été étudiées. Pour tous les essais présentés dans cette section, l'inoculum en deux étapes a été préparé selon les meilleures conditions déterminées à la section 5.3 : une culture de départ en milieu nutritif de 12 h a été utilisée pour inoculer à 2 % (v/v) une pré-culture composée de boues à 15 g/L de MES. Cette pré-culture a été incubée pendant 12 h et un aliquot de cette pré-culture (4,5 % v/v) a été utilisé pour inoculer le bioréacteur (voir section 4.1.2 pour la procédure détaillée de préparation des inocula). La Figure 12 présente l'évolution de la croissance au cours des fermentations à différentes concentrations en MES.

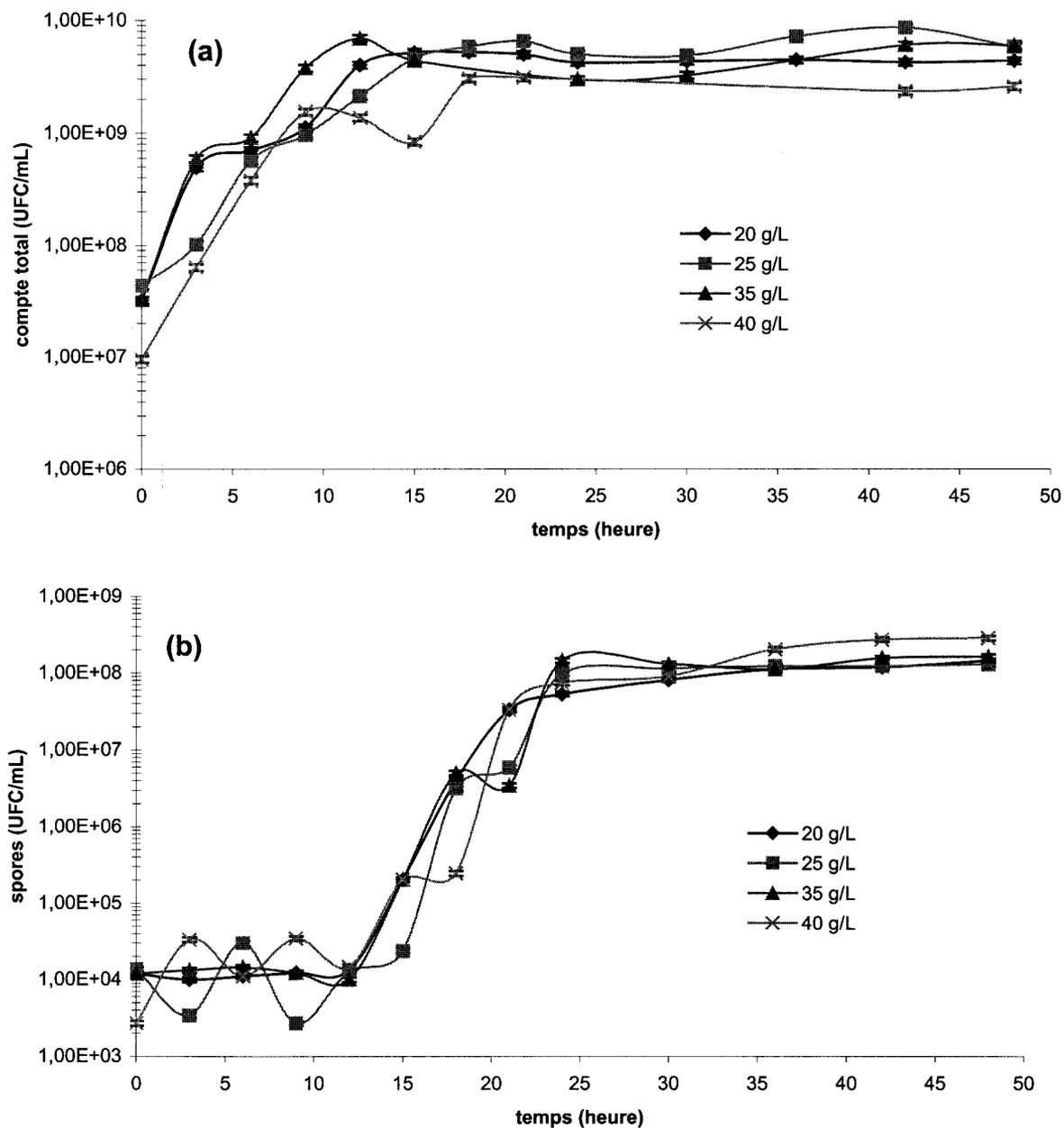


Figure 12

Évolution du nombre de cellules (a) et de spores (b) de *B. licheniformis* lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues secondaires de la CUQ à différentes concentrations en MES ayant été inoculées avec un inoculum amélioré. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 7 %.

Selon la Figure 12, la concentration en MES des boues a une influence sur la croissance de *B. licheniformis*. Les taux de croissance spécifique maximum lors des différentes fermentations varient (Tableau 11). Il en est de même pour le nombre de cellules et de spores.

Tableau 11 Comparaison du μ_m , du nombre maximum de cellules et de spores et de l'activité protéolytique obtenus lors de fermentations dans les boues à différentes concentrations en MES

Concentration en MES (g/L)	μ_m (h ⁻¹)	Nombre maximum de cellules obtenues* (x10 ⁹ UFC/mL)	Nombre maximum de spores obtenues* (x10 ⁸ UFC/mL)	Activité enzymatique maximale* (U.I./mL)
20	0,44	5,23 (18 h)	1,44 (48 h)	9,0 (42 h)
25	0,36	8,57 (42 h)	1,29 (48 h)	9,9 (42 h)
35	0,60	8,00 (42 h)	1,63 (48 h)	11,2 (42 h)
40	0,45	3,09 (21 h)	2,85 (48 h)	9,6 (42 h)

* Le temps entre parenthèses correspond au temps où la valeur a été obtenue.

Le nombre maximum de cellules et de spores obtenues diffère selon la concentration en MES des boues. Ainsi, les boues à 25 et 35 g/L de MES ont permis l'atteinte du nombre le plus élevé de cellules. Les boues à 40 g/L sont celles où le nombre de cellules est le plus faible. De façon générale, plus la concentration en MES des boues est importante, plus le nombre de spores obtenues est élevé.

L'augmentation de la concentration des boues de 20 à 25 g/L a un effet bénéfique sur le nombre de cellules obtenues. La quantité plus élevée d'éléments nutritifs dans les boues contenant 25 g/L de MES pourrait avoir contribué à cette augmentation (Barnabé, 2004). Par contre, l'augmentation de la concentration des boues de 25 g/L à 35 g/L ne permet pas d'obtenir un plus grand nombre de cellules malgré la forte concentration en nutriments. Également, une diminution marquée du nombre de cellules est observée au-delà de 35 g/L.

La concentration en MES a également une influence sur l'activité protéolytique. La Figure 13 illustre l'évolution de l'activité enzymatique au cours des différentes fermentations.

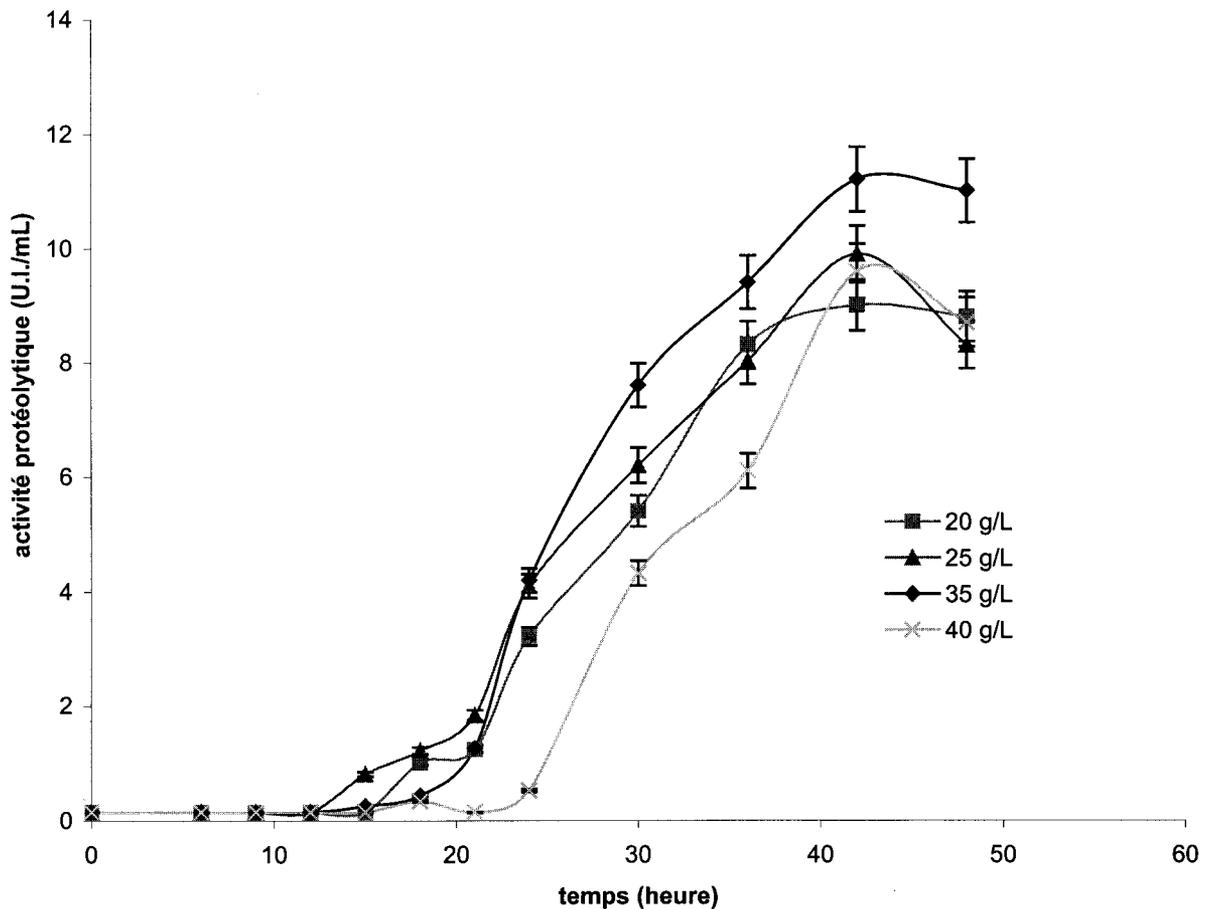


Figure 13 Évolution de l'activité enzymatique lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues à différentes concentrations en MES ayant été inoculées avec un inoculum amélioré. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 5 %.

Selon la Figure 13, la production de protéases dans les boues est nulle pendant la phase de croissance exponentielle (activité protéolytique nulle) et débute pendant la phase stationnaire indépendamment de la concentration en MES. Pour tous les essais, l'activité protéolytique maximale est obtenue après 42h de fermentation (Tableau 11). De plus, lorsque la concentration des boues augmente de 20 à 25 g/L de MES, la production de protéases débute plus tôt. Par la suite, plus la concentration en MES des boues est importante, plus la phase de production de protéases semble retardée. Par exemple, dans les boues à 40 g/L, l'activité protéolytique est nulle jusqu'à 24 h. À l'opposé, dans les boues à 25 g/L, une activité enzymatique est observée après seulement 15 h.

Les boues à 35 g/L sont celles qui permettent d'atteindre les plus fortes activités protéolytiques. Les résultats suggèrent une relation entre la concentration en MES et l'activité protéolytique jusqu'à 35 g/L. L'augmentation de la concentration en MES permet d'obtenir de meilleures activités protéolytiques. Par contre, à 40 g/L, une diminution de l'activité protéolytique est observée (Figure 13).

L'objectif de travailler à des concentrations supérieures en MES est de fournir aux cellules bactériennes une plus grande quantité de nutriments pour la croissance et la production de protéases. Cependant, une diminution du nombre de cellules et de l'activité protéolytique a été observée dans les boues à 40 g/L de MES. Ce phénomène a déjà été observé lors la croissance de *Bacillus thuringiensis* dans des boues très concentrées en MES (Lachhab *et al.*, 2001; Vidyarthi *et al.*, 2002). Les auteurs ont suggéré que la diminution en cellules et en activité insecticide de *B. thuringiensis* soient attribuées à un phénomène de l'inhibition par le substrat ou une distribution déficiente de l'oxygène dans le milieu de culture due à la viscosité importante des boues fortement concentrées. Les particules et les polymères extracellulaires des boues très concentrées en MES peuvent interférer avec l'activité des enzymes bactériennes ou les processus de transport des nutriments à travers la membrane bactérienne. Quant à la distribution de l'oxygène, la plus grande viscosité des boues nuit au transfert de l'oxygène des bulles d'air aux cellules, élément essentiel à la croissance de la bactérie (Barnabé, 2004).

Afin d'évaluer l'influence de la concentration en MES sur le transfert d'oxygène, l'évolution du K_La a été suivie lors des fermentations effectuées dans les boues à 25 et 35 g/L. Lors de l'essai à 40 g/L de MES, il n'a pas été possible de prendre les mesures de K_La car le temps tardif de réponse de la sonde affectait considérablement la précision. En effet, les sondes à oxygène utilisées ne sont pas adaptées pour la fermentation de boues d'épuration très concentrées en MES. Les particules des boues d'épuration peuvent colmater les sondes à DO, ce qui nuit à la lecture de la concentration en oxygène dissous dans le milieu. Les Figures 14 et 15 présentent l'évolution des paramètres mesurés lors de ces essais.

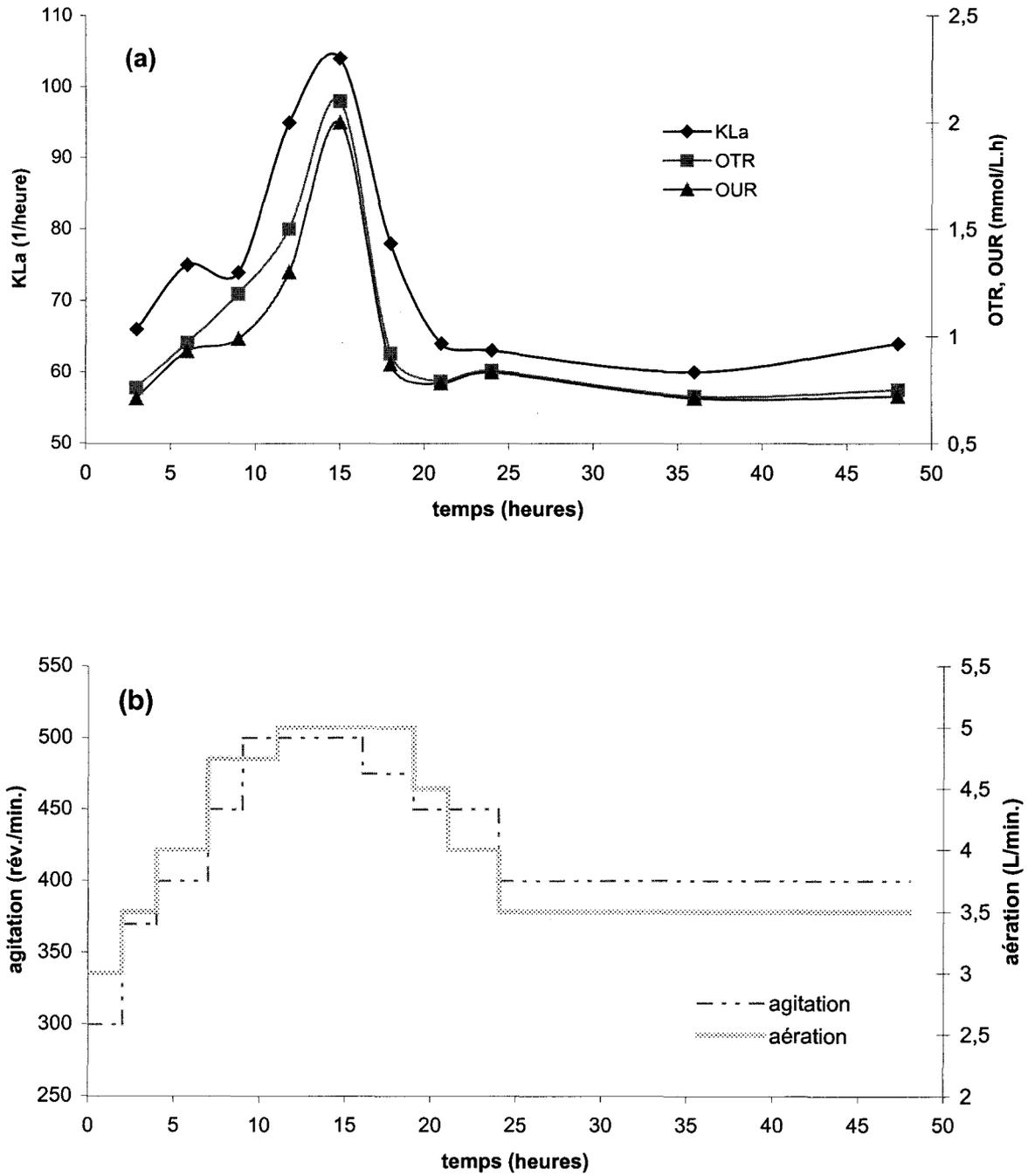


Figure 14 Évolution de K_{La} , de l'OTR de l'OUR (a) et de l'agitation et de l'aération (b) lors d'une fermentation en bioréacteur effectuée dans les boues à 25 g/L de MES.

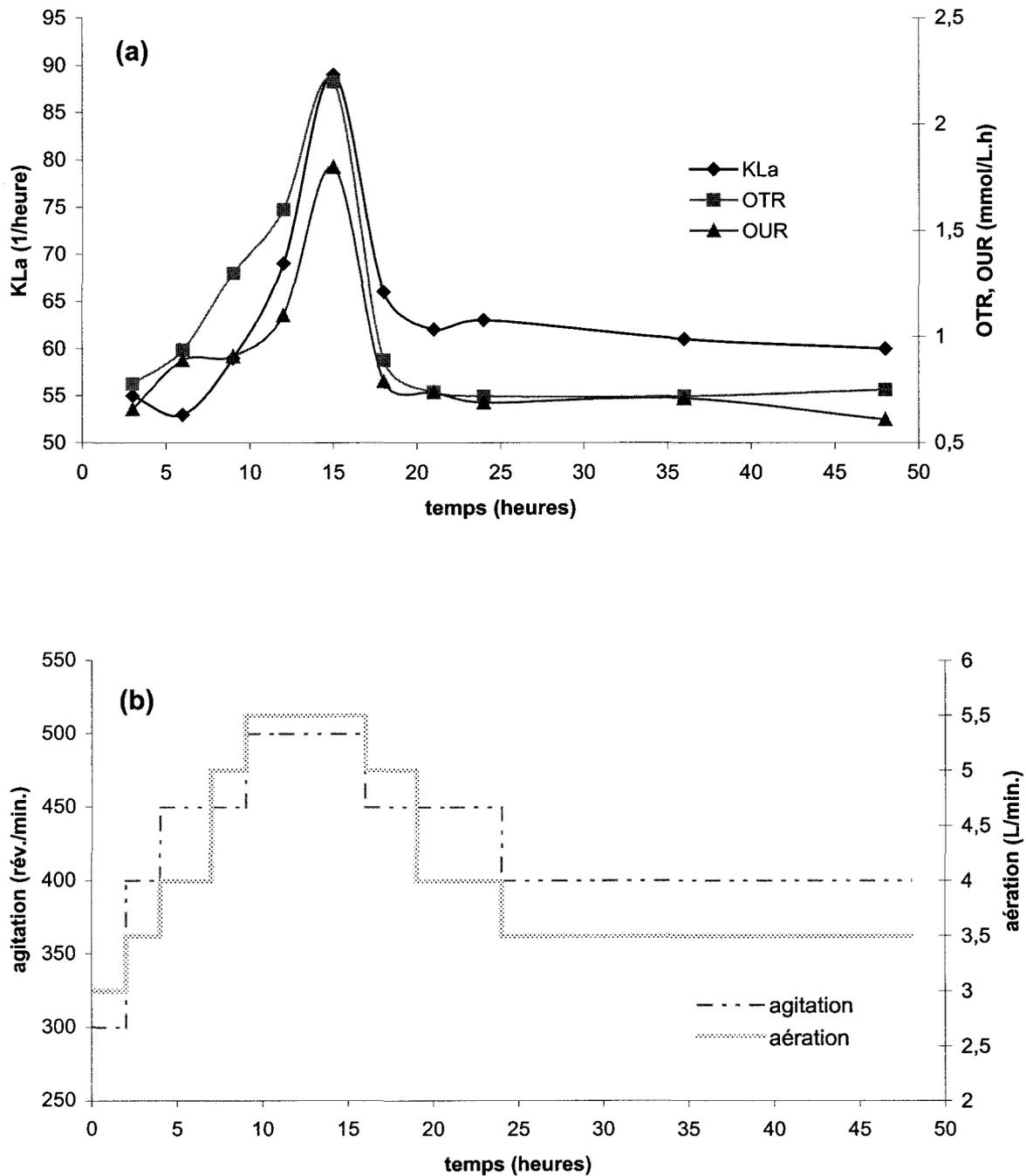


Figure 15 Évolution de $K_{L,a}$, de l'OTR de l'OUR (a) et de l'agitation et de l'aération (b) lors d'une fermentation en bioréacteur effectuée dans les boues à 35 g/L de MES.

Les Figures 14a et 15a permettent de constater que les maximums de K_{La} , d'OTR et d'OUR sont obtenus au temps 15 h dans les boues à 25 et 35 g/L de MES, lors de la fin de la phase de croissance exponentielle. Par la suite, une diminution est observée et les valeurs tendent ensuite à se maintenir constantes. La brusque diminution observée pour les trois paramètres correspond à la fin de la croissance exponentielle. Des profils semblables ont été obtenus lors des travaux de Yezza *et al.* (2004, 2005 a) portant sur la production de biopesticides (*B. thuringiensis*) dans les boues d'épuration.

Généralement, une diminution de la DO est enregistrée pendant la phase de croissance exponentielle. Cette diminution est due à de hautes valeurs d'OUR (Figures 14a et 15a) associées à la croissance active du microorganisme lors de la phase de croissance exponentielle (Yezza *et al.*, 2004). C'est pourquoi il est nécessaire d'augmenter l'OTR durant cette période afin de maintenir la DO au-dessus du seuil critique (15-20 %).

L'OTR peut être augmenté en employant de plus fortes agitations et aérations. Ceci explique pourquoi l'agitation et l'aération atteignent des niveaux maximaux durant la phase de croissance exponentielle (Figure 14b et 15b). Il est cependant important de noter que dans les boues d'épuration, l'augmentation de l'aération et de l'agitation est limitée par la formation de mousse. Cette dernière est causée en partie par la présence de protéines dans les boues. L'hydrolyse des protéines par les microorganismes lors de leur croissance engendre la formation de mousse (Barnabé, 2000). Il est important d'être vigilant en augmentant l'aération ou l'agitation à des niveaux très élevés, car cette action peut engendrer la formation d'une grande quantité de mousse pouvant obstruer la sortie des gaz du fermenteur.

Par la suite, une diminution de l'OUR est observée (Figures 14a et 15a). Elle est généralement associée à la phase stationnaire (Yezza *et al.*, 2004). L'OTR peut donc être également réduit lors de la phase stationnaire en diminuant l'agitation et l'aération (Figures 14 b et 15 b).

Les valeurs maximales de K_{La} sont plus élevées dans les boues à 25 g/L (104 h^{-1}) que dans les boues à 35 g/L (89 h^{-1}). Ces variations peuvent être attribuées au changement dans la viscosité. En effet, Brar *et al.* (2004) ont démontré que l'augmentation de la concentration en MES des boues augmente la viscosité. L'augmentation de la viscosité amène une diminution des valeurs de K_{La} (Ozergin-Ulgen et Mavituna, 1998; Yezza *et al.*, 2005a). Malgré l'absence de données sur le K_{La} dans les boues à 40 g/L, ces observations suggèrent que les plus faibles activités protéolytiques obtenues dans les boues à cette concentration seraient causées par un transfert d'oxygène limitant pour la production de protéases.

Pour les concentrations à 20, 25 et 35 g/L, la seule mesure de l'activité protéolytique ne permet pas de déterminer précisément l'effet bénéfique de l'augmentation de la concentration des boues. Il est possible

que l'augmentation de l'activité protéolytique soit causée par une augmentation de la concentration en nutriments, permettant la production d'une plus grande quantité de protéases par les cellules bactériennes. Il est également possible que les boues contiennent des éléments ayant pour effet de stimuler l'activité des protéases. L'augmentation de la concentration de ces éléments aurait un effet bénéfique sur l'activité des protéases produites : l'activité spécifique par gramme de protéines serait plus importante dans les boues plus concentrées. Ainsi, il serait souhaitable dans des expériences ultérieures de mesurer la quantité de protéases produites par *B. licheniformis* au cours de la fermentation et de caractériser les protéases pour vérifier s'il y a surproduction et/ou production de protéases avec des fonctionnalités protéolytiques accrues.

La Figure 16 illustre la relation entre la sporulation et l'activité protéolytique obtenue pour les boues à différentes concentrations en MES. Ainsi, la variation de la concentration des boues en MES a une influence sur la relation entre la sporulation et l'activité protéolytique. En effet, selon la concentration en MES des boues, les profils de la relation entre le nombre de spores et l'activité protéolytique varient. Pour des concentrations de 20 à 35 g/L de MES, la production de protéases débute lorsque les cellules entrent en phase de sporulation et il y a relation entre la sporulation et l'activité protéolytique du temps 15 h au temps 24 h. En effet, pendant cette période, l'activité protéolytique et le nombre de spores augmentent. Cependant, après 24 h, le nombre de spores ,'augmente plus de façon importante, alors que l'activité protéolytique continue d'augmenter considérablement.

Dans les boues à 40 g/L de MES, la relation entre la sporulation et l'activité protéolytique est moins visible. Ainsi, le nombre de spores augmente à partir du temps 12 h alors que l'activité protéolytique ne commence à augmenter seulement après 21 h. Une étude plus poussée serait nécessaire afin de déterminer pourquoi l'activité protéolytique demeure nulle sur une plus longue période dans les boues à 40 g/L.

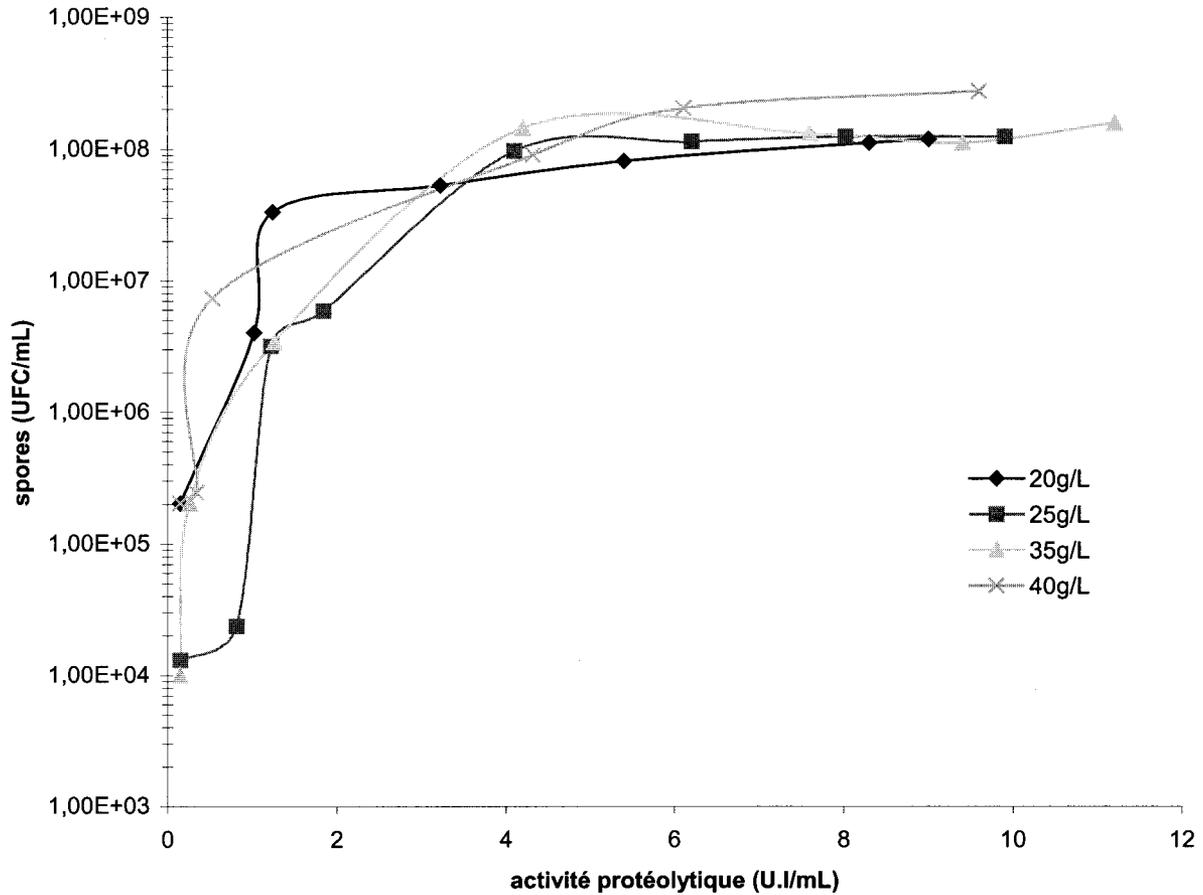


Figure 16 Relation entre la concentration de spores et l'activité protéolytique obtenue pour les différents essais réalisés dans les boues à différentes concentrations en MES.

En somme, ces résultats indiquent que les boues constituent un excellent substrat pour la production de protéases. En effet, l'activité protéolytique maximale obtenue dans les boues (35 g/L de MES) est du même ordre de grandeur que celle obtenue dans le milieu synthétique. Il est donc possible que les boues permettent la synthèse d'un nombre presque aussi élevé de protéases que le milieu synthétique. Également, il est possible que les boues contiennent des éléments ayant pour effet de stimuler la production de protéases aux fonctionnalités protéolytiques accrues (Barnabé, 2004). Ainsi, le nombre de protéases produites dans les boues pourrait être moins important, mais l'activité spécifique par gramme de protéases produites serait plus importante. Lors de travaux futurs, il sera donc nécessaire de mesurer et de comparer la quantité de protéases produites dans les boues et dans le milieu synthétique.

5.6 Effet du pré-traitement hydrolytique des boues d'épuration sur la croissance de *Bacillus licheniformis* et sur l'activité protéolytique

Les boues d'épuration sont un milieu de culture complexe constitué d'éléments nutritifs plus ou moins biodisponibles. Barnabé (2004) a exploré l'application d'un pré-traitement physico-chimique des boues pour accroître la biodisponibilité des éléments nutritifs et accroître le rendement de la bactérie *B. thuringiensis* en termes de cellules, de spores et de toxines insecticides. L'auteur a étudié plusieurs pré-traitements et l'hydrolyse thermo-alcaline s'est avérée la plus efficace. L'effet bénéfique de l'hydrolyse thermo-alcaline a également été observé chez Leblanc (2003), lors de travaux portant aussi sur la production de bioinsecticide à base de *B. thuringiensis*. Brar *et al.* (2004) ont démontré que l'hydrolyse des boues permet, d'une part, de dégrader les molécules complexes en molécules plus simples et d'autre part, d'améliorer les caractéristiques rhéologiques des boues. Ces modifications permettent une meilleure assimilation des nutriments par la bactérie. Il est donc pertinent de vérifier si un pré-traitement thermo-alcalin des boues pourrait permettre d'améliorer la production de protéases de *B. licheniformis*.

Les expériences en bioréacteur à 25 et 35 g/L de MES (présentées à la section 5.4) sont celles qui ont permis l'atteinte des activités protéolytiques maximales. Ces expériences ont été reprises en appliquant préalablement un pré-traitement d'hydrolyse thermo-alcalines aux boues. La procédure d'hydrolyse est décrite à la section 4.1.3.2.2. La Figure 17 illustre la croissance de *B. licheniformis* dans les boues à 25 et 35 g/L ayant subi une hydrolyse.

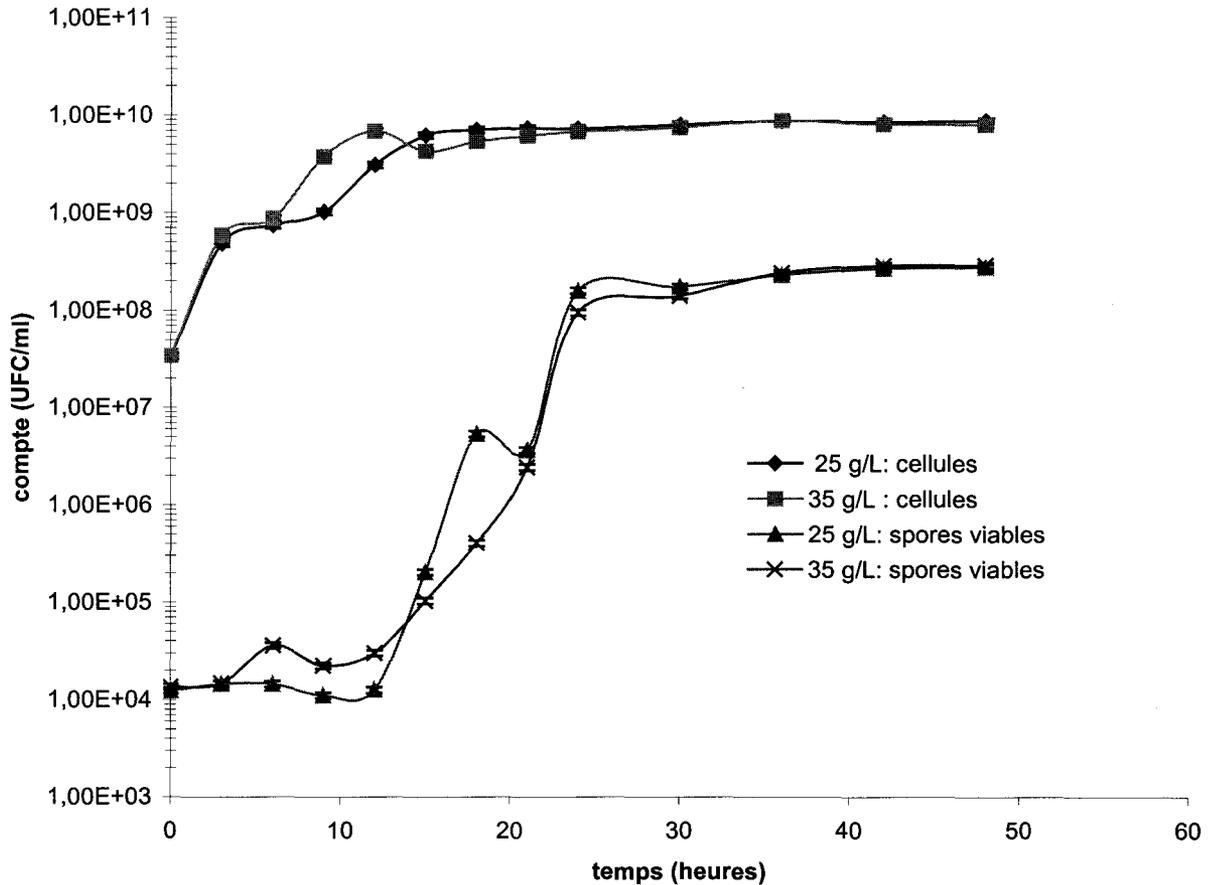


Figure 17 Évolution du nombre de cellules et de spores viables de *B. licheniformis* en fonction du temps lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues hydrolysées à 25 et 35 g/L de MES. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 7 %.

La comparaison de la Figure 17 (boues hydrolysées) et de la Figure 12 (boues non hydrolysées) permet de constater que l'hydrolyse thermo-alkaline des boues à 25 ou 35 g/L permet d'atteindre un nombre plus élevé de cellules lors de la fermentation. Également, pour une concentration en MES de 25 g/L, le μ_m est légèrement plus élevé dans les boues hydrolysées que dans les boues nonhydrolysées. Les mêmes observations s'appliquent pour les boues à 35 g/L de MES (Tableau 12).

Tableau 12 Comparaison des μ_m et du nombre maximum de cellules et de spores obtenus lors des fermentations dans les boues hydrolysées et non hydrolysées.

Concentration en MES (g/L)	Type de boues	Nombre maximum de cellules obtenues* ($\times 10^9$ UFC/mL)	Nombre maximum de spores obtenues* ($\times 10^8$ UFC/mL)	Taux de croissance spécifique maximum (h^{-1})
25	Non hydrolysées	8,57 (42 h)	1,29 (48 h)	0,36
25	hydrolysées	8,72 (36 h)	2,74 (48 h)	0,38
35	Non hydrolysée	8,00 (42 h)	1,63 (48 h)	0,60
35	hydrolysée	8,79 (36 h)	2,87 (48 h)	0,60

* Le temps entre parenthèses correspond au temps où la valeur a été obtenue.

Le pré-traitement hydrolytique a aussi un effet marqué sur l'activité protéolytique. La Figure 18 illustre l'évolution de l'activité enzymatique au cours de ces essais. Les résultats obtenus dans les boues à 25 et 35 g/L non hydrolysées (Figure 13) sont également présentés sur la Figure 17 à des fins de comparaison.

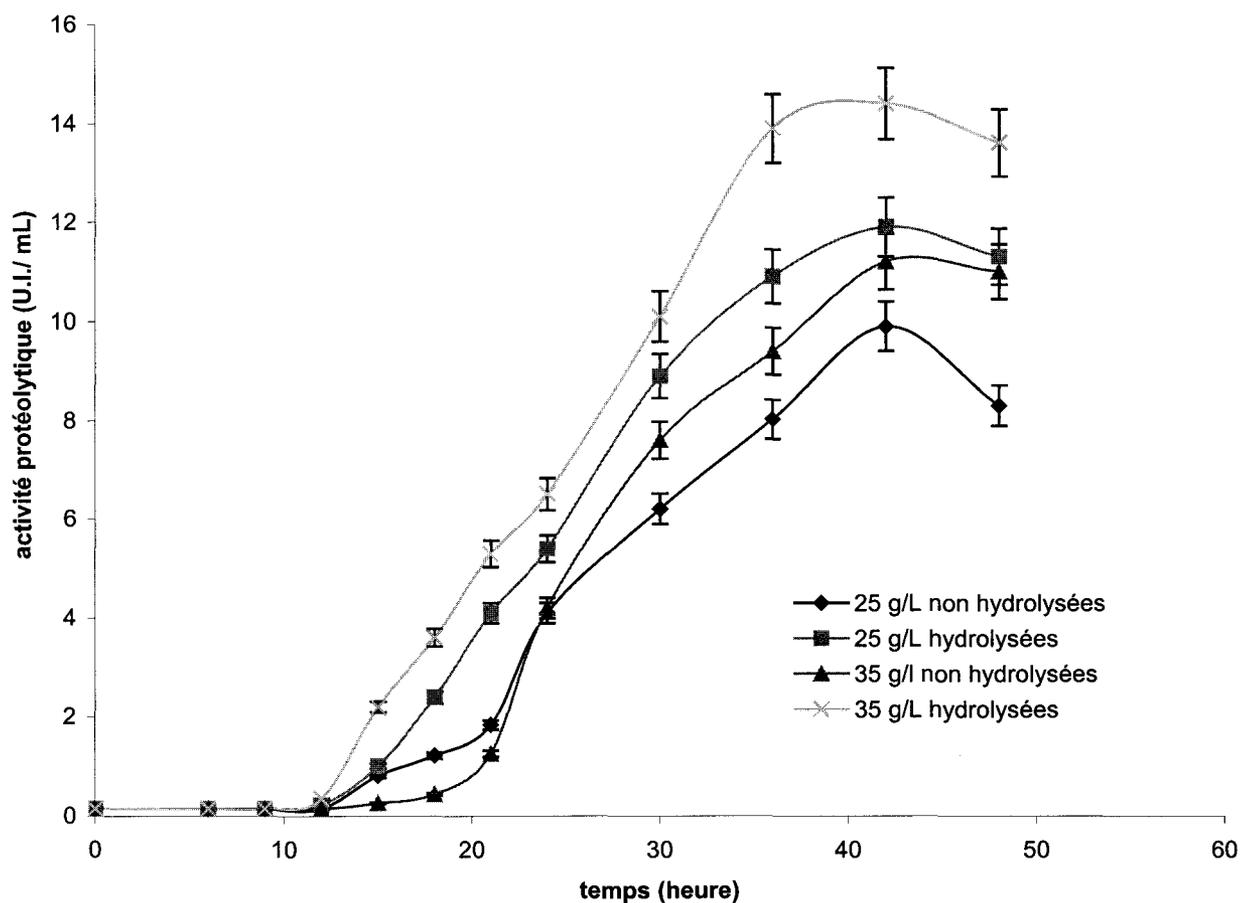


Figure 18 Évolution de l'activité enzymatique lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans des boues à 25 g/L et 35 g/L de MES hydrolysées et non hydrolysées. L'écart type correspond à l'erreur de la méthode, soit 5 %.

La Figure 18 indique que la production de protéases dans les boues hydrolysées ou non hydrolysées semble nulle pendant la phase de croissance exponentielle (activité protéolytique nulle) et débute lors de la phase stationnaire. Le profil de la relation entre les spores et l'activité protéolytique dans les boues hydrolysées (Figure 19) est le même que celui pour les boues non hydrolysées (Figure 16). La Figure 19 suggère une relation entre la sporulation et l'activité protéolytique du temps 12 h au temps 24 h. En effet, pendant cette période, plus le nombre de spores augmente, plus l'activité protéolytique est élevée. Par contre, après 24 h, le nombre de spores n'augmente plus de façon majeure alors que l'activité protéolytique continue d'augmenter considérablement.

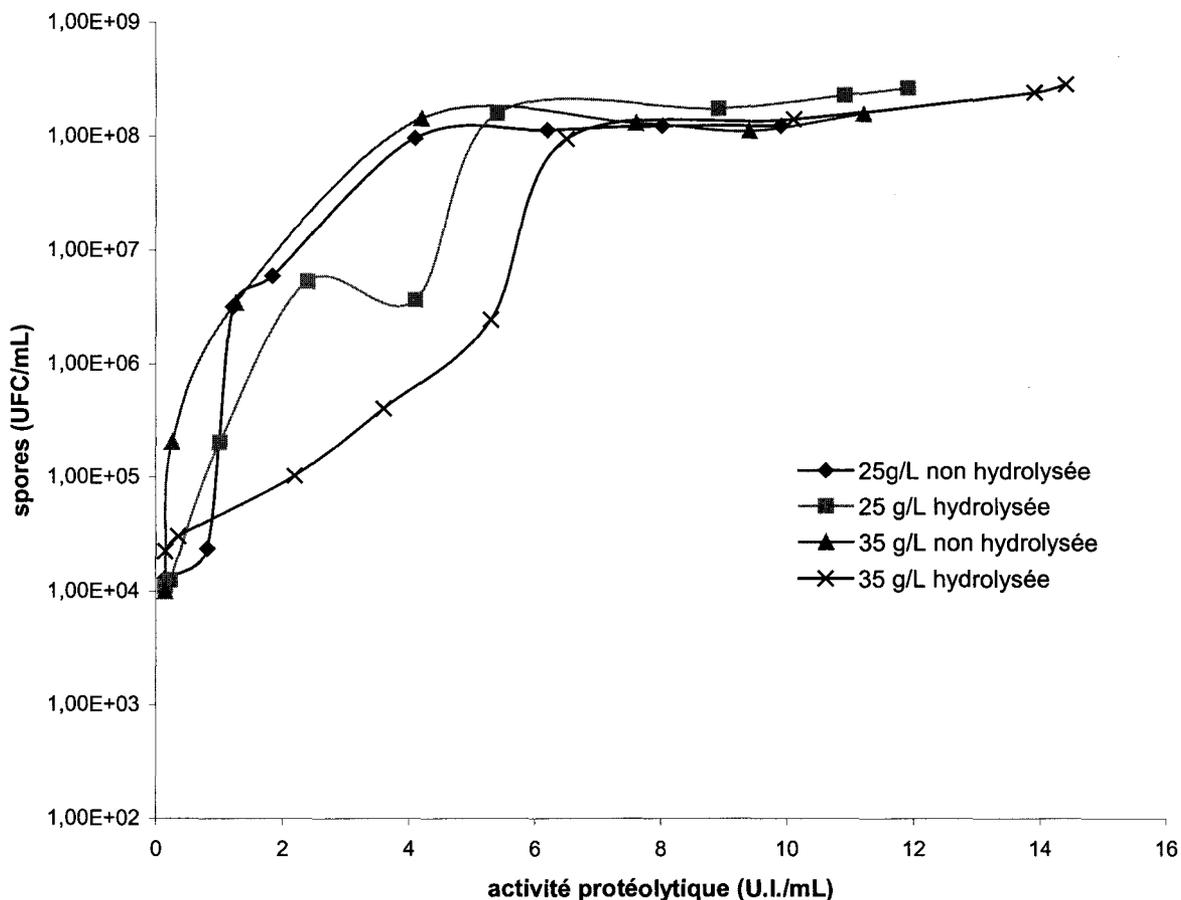


Figure 19 Relation entre la concentration de spores et l'activité protéolytique obtenue dans les boues hydrolysées et non-hydrolysées à 25 et 35 g/L de MES

Pour les deux essais, l'activité protéolytique maximale est obtenue après 42 h de fermentation comme dans les boues non-hydrolysées. Les fermentations dans les boues hydrolysées ont cependant permis d'obtenir de plus fortes activités protéolytiques que dans les boues non hydrolysées. Les valeurs maximales d'activité protéolytique obtenues pour les essais dans les boues à 25 et 35 g/L hydrolysées et non-hydrolysées sont données au Tableau 13.

Tableau 13 Activités protéolytiques maximums obtenues lors des fermentations dans les boues hydrolysées et non-hydrolysées

Concentration en MES (g/L)	Type de boues	Activité protéolytique maximale (U.I/mL)*
25	non hydrolysées	9,9 (42 h)
25	hydrolysées	11,9 (42 h)
35	non hydrolysées	11,2 (42 h)
35	hydrolysées	14,3 (42 h)

* Le temps entre parenthèses correspond au temps où la valeur a été obtenue.

Les meilleurs taux de croissance obtenus dans les boues hydrolysées (Tableau 12) pourraient s'expliquer par le fait que l'hydrolyse améliore la disponibilité des éléments nutritifs. En effet, l'hydrolyse brise les amas de matière organique présents dans les boues, ce qui permet de rendre la matière organique plus accessible pour la bactérie. Également, l'hydrolyse permet une dégradation des matières complexes contenues dans les boues. Cette meilleure disponibilité des éléments nutritifs aurait pour effet de stimuler la croissance de la bactérie (Barnabé, 2004). Elle pourrait également stimuler la production de protéases. Ainsi, l'hydrolyse pourrait permettre d'hydrolyser les protéines complexes en polypeptides de faible poids moléculaire, plus facilement attaquables par les protéases. Ceci expliquerait les activités protéolytiques supérieures obtenues dans les boues hydrolysées.

Il est également possible que l'hydrolyse stimule la production de protéases aux fonctionnalités protéolytiques accrues qui se manifesterait par une augmentation de l'activité protéolytique spécifique (U.I./g de protéases). Il est recommandé lors des travaux ultérieurs de mesurer la quantité de protéases afin de vérifier cette hypothèse.

L'hydrolyse des boues a aussi un impact sur le transfert d'oxygène lors de la fermentation. En effet, l'hydrolyse des boues permet de diminuer la viscosité de celles-ci. (Brar *et al.*, 2004). Comme une viscosité élevée est une contrainte majeure pour le transfert d'oxygène, la diminution de la viscosité permettrait un meilleur transfert d'oxygène. Afin de vérifier l'effet de l'hydrolyse thermo-alcaline sur le transfert d'oxygène, l'évolution du $K_L a$ a été suivie lors des fermentations effectuées dans les boues à 25 et 35 g/L hydrolysées. Les Figures 20 et 21 présentent l'évolution des paramètres mesurés lors de ces essais.

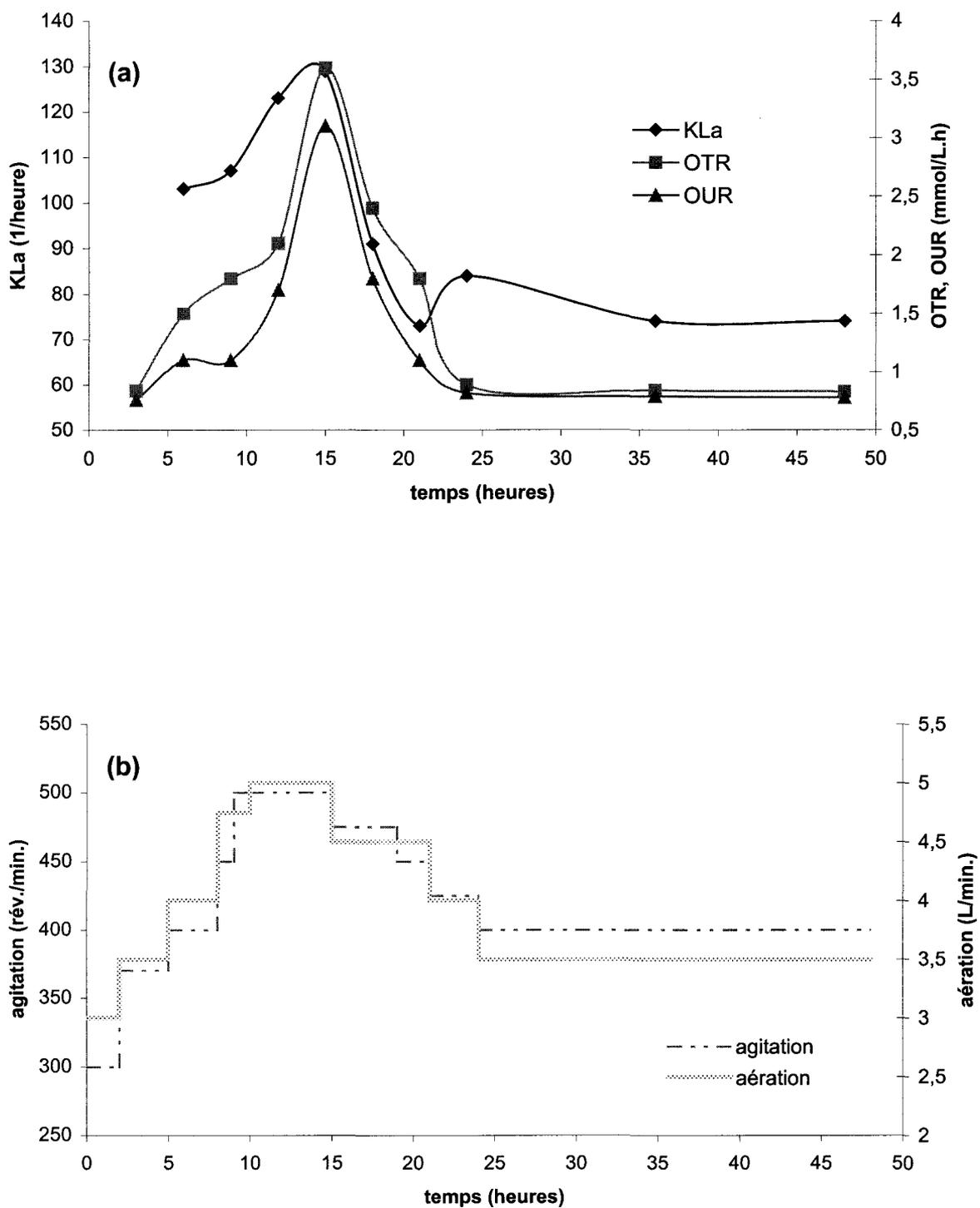


Figure 20 Évolution de K_{La} , de l'OTR, de l'OUR (a) et de l'agitation et de l'aération (b) lors d'une fermentation en bioréacteur effectuée dans les boues à 25 g/L de MES hydrolysées.

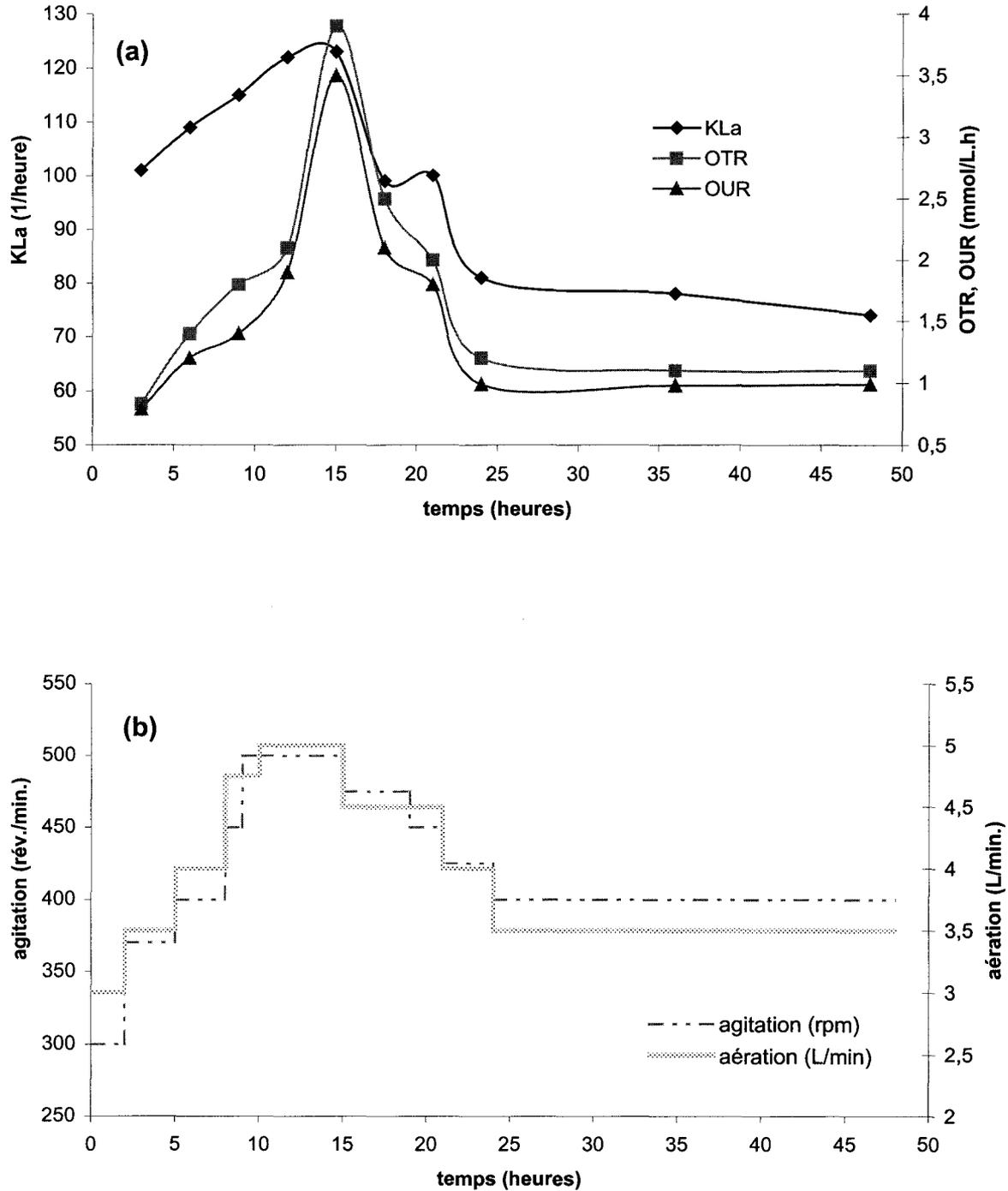


Figure 21 Évolution de K_{La} , de l'OTR, de l'OUR (a) et de l'agitation et de l'aération (b) lors d'une fermentation en bioréacteur effectuée dans les boues à 35 g/L de MES hydrolysés.

Les Figures 20 et 21 permettent de constater que les profils de l'évolution du K_{La} , de l'OTR et de l'OUR dans les boues hydrolysées sont semblables à ceux obtenus dans les boues non hydrolysées. Ainsi, les valeurs maximales de K_{La} , d'OTR et d'OUR sont également obtenues après 15 h de fermentation. Le Tableau 14 présente les paramètres mesurés lors de ces fermentations.

Tableau 14 Valeurs maximums des paramètres associés au transfert d'oxygène lors de différents essais de fermentation dans les boues.

Concentration en MES (g/L)	Type de boues	K_{La} maximum (h^{-1})	OTR maximum (mmol/L.h)	OUR maximum (mmol/L.h)
25	non hydrolysées	104	2,1	2,0
25	hydrolysées	129	3,6	3,1
35	non hydrolysée	89	2,2	1,8
35	hydrolysée	123	3,9	3,5

Les valeurs de K_{La} obtenues dans les boues hydrolysées (Figures 20 et 21) sont de beaucoup supérieures à celles obtenues dans les boues non-hydrolysées (Figures 15 et 16). Les meilleures valeurs de K_{La} obtenues dans les boues hydrolysées peuvent être attribuées aux changements dans la viscosité des boues lors de l'hydrolyse. En effet, Brar *et al.* (2004) ont démontré qu'un pré-traitement thermo-alkalin permet de diminuer la viscosité des boues. Le fait de réduire la viscosité du milieu de fermentation permet d'augmenter les valeurs de K_{La} (Ozergin-Ulgen et Mavituna, 1998). Ceci est dû au fait que, lorsque la viscosité du milieu diminue, l'oxygène est distribué plus facilement et de façon plus uniforme dans le milieu, sous forme de petites bulles d'air (Ozbek et Gayik, 2001). La vélocité plus lente de l'air causée par ces petites bulles permet à l'oxygène de demeurer plus longtemps dans le milieu de fermentation, ce qui permet une meilleure dissolution de l'oxygène dans le milieu. Également, les valeurs d'OUR et d'OTR sont plus élevées dans les boues hydrolysées que dans les boues non hydrolysées. Les valeurs d'OUR plus élevées dans les boues hydrolysées pourraient être reliées aux taux de croissance spécifique maximum (μ_m) supérieurs obtenus dans les boues hydrolysées. En effet, Rowe *et al.* (2003) ont noté que l'OUR augmente avec le μ_m .

L'augmentation des valeurs de K_{La} dans les boues ayant subi une hydrolyse a aussi été notée par Yezza *et al.* (2005a) lors de travaux portant sur la production de biopesticides (*B. thuringiensis*) dans les boues d'épuration. Ceci suggère que la diminution de viscosité associée à l'hydrolyse a un effet bénéfique sur la production de protéases. Comme le transfert d'oxygène est un facteur de première importance pour la

production de protéases (Calik *et al.*, 2000a), l'augmentation de l'activité protéolytique dans les boues hydrolysées serait donc également reliée à un meilleur transfert d'oxygène dans le milieu.

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

La présente étude confirme l'intérêt que présentent les boues d'épuration comme milieu de culture alternatif pour la production de protéases par *Bacillus licheniformis*. De façon globale, ce projet s'inscrit dans une approche qui consiste à : (i) minimiser l'exploitation des ressources renouvelables et non renouvelables; (ii) à réduire l'utilisation des produits chimiques en favorisant l'émergence d'une nouvelle industrie de produits biologiques économiquement plus abordables, basée sur des matériaux économiquement viables, le tout en respect avec le développement durable.

L'ensemble des stratégies explorées au cours de ce travail ont permis d'accroître de façon substantielle l'activité protéolytique obtenue dans les boues, par rapport aux résultats obtenus lors des travaux précédents (Meunier, 1999). Tout d'abord, des activités protéolytiques de 4,5 à 14,3 U.I./mL ont été obtenues sous des conditions contrôlées de pH et d'oxygène dissous (bioréacteur) par rapport à des valeurs variant entre 1 et 6 U.I./mL lorsque ces conditions ne sont pas contrôlées (erlenmeyer).

Ensuite, l'étude de l'inoculum a permis de déterminer qu'un inoculum préparé en deux étapes, et comprenant une pré-culture dans les boues, réduit substantiellement la phase de latence lors de la fermentation. De plus, les caractéristiques de la pré-culture (âge et volume) ont une grande influence sur le nombre de cellules et spores obtenues lors de la fermentation. Parmi toutes les conditions testées, une inoculation à 4,5 % avec une pré-culture âgée de 12 h permet d'atteindre un nombre maximum de cellules ($2,73 \times 10^9$ UFC/mL) et de spores ($3,77 \times 10^7$ UFC/mL) lors d'une fermentation effectuée en erlenmeyer, dans les boues à 25 g/L de MES.

Ces travaux ont également démontré que la concentration en MES des boues a une grande influence sur les performances du procédé. L'activité protéolytique maximum (11,2 U.I./mL) observée en bioréacteur a été obtenue dans les boues concentrées à 35 g/L de MES. Les résultats obtenus suggèrent que l'augmentation de la concentration en MES des boues a un effet positif sur l'activité protéolytique jusqu'à 35 g/L de MES. À des concentrations en MES supérieures, une diminution de l'activité protéolytique a été observée. Les résultats obtenus lors de l'étude sur le transfert d'oxygène suggèrent que la diminution de l'activité protéolytique à des concentrations supérieures à 35 g/L de MES s'explique par un mauvais transfert d'oxygène.

Enfin, ces travaux ont mis en évidence que l'hydrolyse thermo-alkaline des boues avant la fermentation a un effet bénéfique sur les performances du procédé. L'application du pré-traitement a permis d'atteindre

un nombre plus élevé de cellules et de spores, et il a permis d'augmenter l'activité protéolytique respectivement de 20,2 % et de 27,2 % dans les boues à 25 g/L de MES et à 35 g/L de MES. Ces augmentations suggèrent que le meilleur transfert d'oxygène dans les boues pré-traitées a un effet bénéfique sur la production de protéases. Également, il est possible que le pré-traitement ait permis une augmentation de la bio-disponibilité des éléments nutritifs suite à une dégradation des matières complexes contenues dans les boues.

En somme, les travaux réalisés au cours de cette étude démontrent le potentiel des boues d'épuration pour la production de protéases. Cependant, il reste plusieurs travaux à mener afin de répondre aux questions soulevées lors de ces travaux et afin de poursuivre l'optimisation du procédé. Les recommandations pour des travaux ultérieurs sont les suivantes :

- Lors de prochains travaux, il serait souhaitable de mesurer la quantité de protéases produites en plus de l'activité protéolytique. Il serait ainsi possible de déterminer si les augmentations d'activité protéolytique observées lors de ces travaux sont le résultat d'une synthèse accrue de protéases par les microorganismes, ou s'ils sont le résultat de la synthèse de protéases aux fonctionnalités protéolytiques accrues, se manifestant par une augmentation de l'activité protéolytique spécifique (U.I / g de protéases).
- Au cours de ces travaux, les paramètres du prétraitement d'hydrolyse thermo-alcaline (pH, température et durée) proviennent de travaux antérieurs et n'ont pas été optimisés pour la production de protéases. Il serait souhaitable d'étudier de façon approfondie les paramètres de l'hydrolyse thermo-alcaline et aussi d'autres pré-traitements (ex : oxydation partielle des boues avec un agent oxydant).
- Également, comme le pré-traitement des boues améliore transfert d'oxygène, il serait intéressant de l'appliquer à des boues plus concentrées, dans lesquelles le transfert d'oxygène se fait difficilement. Cela permettrait de mettre plus de nutriment à la disposition de la bactérie et de vérifier l'effet de cet apport accru en nutriments sur la production de protéases.
- Il serait intéressant d'étudier l'addition de divers rejets industriels ou agricoles riches en carbone ou en azote aux boues afin d'améliorer la composition en éléments nutritifs et le rapport C/N du milieu de fermentation. Meunier (1999), lors de travaux en erlenmeyer, était parvenue à atteindre des activités protéolytiques supérieures lors d'essais dans des boues mixtes additionnées de sources de carbone et d'azote supplémentaires. Cependant, ces sources de carbone et d'azote étaient de nature synthétique, ce qui implique des coûts supplémentaires à l'échelle industrielle.

Dufresne (2004) est quant à lui parvenu à augmenter considérablement le nombre de cellules de *Rhizobia* en les cultivant dans des boues d'épurations additionnées de résidus brassicoles de levures. L'ajout de résidus aux boues pourrait avoir un effet bénéfique sur la production de protéases.

- Également, il serait souhaitable d'entreprendre la caractérisation des protéases produites. Lamontagne (2004) a réalisé une étude à ce sujet en caractérisant les protéases de *B. thuringiensis* produits dans les boues d'épuration. En comparaison avec le milieu synthétique utilisé normalement pour produire *B. thuringiensis*, l'auteure a démontré que les protéases alcalines de la bactérie produites dans les boues étaient plus fonctionnelles, en terme d'activité protéolytique, à des températures de 40°C, 50°C et 60°C, et à des pH de 9 et 11. De plus, les protéases de *B. thuringiensis* produites dans les boues seraient plus thermostables que celles du milieu synthétique. La caractérisation des protéases permettrait de vérifier si les protéases que produit *B. licheniformis* dans les boues ont des propriétés différentes de celles qu'il produit dans un milieu synthétique conventionnel .
- Une étude d'extraction et de purification des protéases à partir des boues devra aussi être entreprise afin d'en vérifier la faisabilité. L'extraction et la purification sont deux étapes coûteuses pour préparer des formulations de protéases qui répondent aux exigences des marchés. Il faudrait entre autre vérifier que l'extraction et la purification des protéases produites dans les boues, plutôt qu'à partir d'un milieu synthétique, n'entraîne pas de coûts supplémentaires pouvant amenuiser les avantages économiques liés à l'emploi des boues comme milieu de culture.
- Il est suggéré d'entreprendre une étude plus poussée sur l'effet des variations dans la composition des boues sur les performances du procédé. En effet, les boues constituent un milieu de culture complexe et inconstant au niveau de sa composition, ce qui peut induire des perturbations au niveau des rendements. La composition des boues dépend de plusieurs facteurs dont la configuration des réseaux de collecte des eaux usées de la station d'épuration, la nature des rejets des activités industrielles ou des services qu'ils desservent, les pratiques de la population, la technologie de traitement, la saison et le mode d'entreposage des boues (Yezza, 2005c). Lors des travaux portant sur la production de bioinsecticides (*B. thuringiensis*) à partir des boues d'épuration, l'ajustement de la concentration en MES des boues est une façon de minimiser l'impact de la variation quotidienne et saisonnière de la composition des boues sur les performances du procédé en terme d'entomotoxicité (Barnabé, 2004). Par contre, aucune étude de cette nature n'a été entreprise pour la production de protéases.

- Une optimisation de l'aération et de l'agitation lors de la fermentation est aussi souhaitable. Tel que discuté lors de l'analyse des résultats, les boues d'épurations favorisent la formation de mousse. Il a été observé que, lors de la phase de croissance exponentielle, le maintien de fortes agitations et aérations engendrent la formation d'une quantité de mousse pouvant être problématique. Il apparaît qu'une bonne stratégie d'aération et d'agitation permettrait de mieux contrôler la mousse. Ceci éviterait l'utilisation de produits chimiques coûteux pour le contrôle de la mousse, qui peuvent s'avérer néfastes pour la production de protéases. De plus, comme le transfert d'oxygène a une grande influence sur la production de protéases, l'optimisation de la stratégie d'aération et d'agitation devra également se faire dans l'optique d'obtenir une stratégie de transfert d'oxygène optimale pour la production de protéases.
- Finalement, une étude de mise à échelle du procédé devra être entreprise ultérieurement. L'optimisation à l'échelle post-laboratoire est déterminante pour la réussite d'un tel procédé. Il faudra ainsi s'assurer que les performances du procédé ne soient pas affectées par le changement d'échelle ou de la configuration du bioréacteur.

La production de protéases alcalines de *B. licheniformis* dans les boues d'épuration est prometteuse. Il y a espoir que ce bioprocédé soit éventuellement transféré à l'industrie. Ce bioprocédé deviendra alors un exemple de biotechnologie respectant les fondements du développement durable.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AIBAS S., HUMPHREY A.E. et MILLIS N.F., 1973. *Biochemical Engineering*, 2^e Édition, Academic Press, New-York, États-Unis, 434 pages.
- APHA, AWWA et WPCF, 1989. *Standard methods for examination of water and wastewaters*, 17^e Édition. American Public Health Association, Washington, États-Unis.
- ARCHANA A. et SATYANARAYANA T., 2003. Purification and characterization of a cellulase-free xylanase of a moderate thermophile *Bacillus licheniformis* A99. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 53-57.
- ATLAS R.M. et BARTHA R., 1998. *Microbial ecology: Fundamentals and applications*, 4^e Édition. Addison-Wesley Publishing Compagny, Don Mills, Ontario, Canada, 694 pages.
- BANERJEE U.C., SANI R.K., AZMI W. et SONI R., 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry* 35: 213-219.
- BARNABÉ S., 2000. *Utilisation des boues d'épuration comme substrat pour la production de biopesticides: induction abiotique de la sporulation chez Bacillus thuringiensis*. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. 151 pages.
- BARNABÉ S., 2003. Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières? Vecteur environnement 36 (2): 50-62.
- BARNABÉ S., 2004. *Hydrolyse et oxydation partielle des boues d'épuration comme substrat pour produire Bacillus thuringiensis HD-1*. Thèse de doctorat. INRS-ETE, Université du Québec, Canada. 235 pages.
- BEG Q.K., SAXENA R.K. et GUPTA G., 2002. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. *Process Biochemistry* 37: 1103-1109.
- BEN REBAH F., 2001. *Utilisation des boues d'épuration comme milieu de culture pour la production d'inoculants à base de Rhizobium*. Thèse de doctorat. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. 191 pages.

BEN REBAH F., YAN S., FILALI-MEKNASSI Y., TYAGI R.D. et SURAMPALLI R.Y., 2004. Bacterial production of bioplastics. Dans: *Advances in water and wastewater treatment*, SURAMPALLI R.Y. et R.D. TYAGI, American Society of Civil Engineers, Reston, États-Unis, pp. 42-71.

BRAR S.K., VERMA M., TYAGI R.D., VALÉRO J.R. et SURAMPALLI R.Y., 2004. Comparative rheological studies of *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater sludge for biopesticide production. Article soumis pour publication à : *Journal of Environmental Engineering*.

CALIK P., CALIK G. et OZDAMAR T.H., 1998. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis* : Use of citric acid as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology* 23: 451-461.

CALIK P. et OZDAMAR T.H., 1999. Mass flux balance-based model and metabolic pathway engineering analysis for serine alkaline protease synthesis by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 621-635.

CALIK P., CALIK G. et OZDAMAR T.H., 2000a. Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology and Bioengineering* 69 (3): 301-311.

CALIK C., TAKAC C., CALIK G. et OZDAMAR T.H., 2000b. Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 45-60.

CALIK P., BILIR E., CALIK G. et OZDAMAR T.H., 2002. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 685-697.

CALIK G., PEHLIVAN N., OZCELIK L.S., CALIK P. et OZDAMAR T.H., 2004. Fermentation and oxygen transfert characteristics in serine alkaline protease production by recombinant *Bacillus subtilis* in molasses-based complex medium. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79: 1243-1250.

CHU I.M., LEE C. et LI T.S., 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbiological Technology* 14: 755-761.

CONINCK J., BOUQUELET S., DUMORTIER V., DUYME F. et VERDIER-DENANTES I., 2000. Industrial media and fermentation processes for improved growth and protease production by *Tetrahymena thermophila* BIII. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24: 285-290.

- COULTOULY G., 1991. *Génie enzymatique*. Masson éditeur, Paris, France, 244 pages.
- DALEV P.G., 1994. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresource Technology* 48: 265-267.
- DEMAIN A.L., 2000. Small bugs, big business : the economic power of the microbe. *Biotechnology Advances* 18 : 499-514.
- DENIZCI A.A., KAZAN D., ABELN E.C.A. et ERARSLAN A., 2004. Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. *Journal of Applied Microbiology* 96: 320-327.
- DE SOUZA JR C.G., LEDINGHAM W.M. et DE MORAIS JR M.A., 2001. Utilisation of cheese whey as an alternative growth medium for recombinant strains of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters* 23: 1413-1416.
- DEUTSCHER J., GALINIER A., MARTIN VERSTRAETE I., 2002. Carbonhydrate uptake and metabolism. Dans: *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*, SONENSHEIN A.L., J.A. HOCH . et R.LOSICK, ASM Press, Washington, États-Unis, pp. 129-150.
- DOI R.H., 1974. Role of proteases in sporulation. Dans: *Molecular microbiology*, KWAPINSKI J. B. G., Wiley, New-York, États-Unis, pp. 1-20.
- DUFRESNE G., 2004. *Valorisation de matières résiduelles pour la production de biofertilisants à base de rhizobium : optimisation du procédé de fermentation avec Sinorhizobium meliloti*. Mémoire de maîtrise. INRS-ETE, Université du Québec. Canada. 126 pages.
- ELLOUZ Y., BAYOUDH S., KAMMOUN S., GHARSALLAH N. et NASRI M., 2001. Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. *Bioresource Technology* 80: 49-51.
- ELLOUZ Y., GHORBEL B., SOUISSI N., KAMMOUN S. et NASRI M., 2003. Biosynthesis of protease by *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on fish substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 41-45.
- ERIKSEN N., 1996. Detergents. Dans: *Industrial enzymology*, 2^e Édition, GODFREY T. et S.I WEST, Stockton Press, New-York, États-Unis, pp. 187-200.

FERRERO M.A., CASTRO G.R., ABATE C.M., BAIGORI M.D. et SENERIZ F., 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29 : isolation, production and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 327-332.

FISHER S.H. et DÉBARBOUILLÉ M., 2002. Nitrogen source utilization and its Regulation. Dans : *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*, SONENSHEIN A.L., J.A.HOCH et R. LOSICK, ASM Press, Washington, États-Unis, pp. 181-192.

FLEMING A.B., TANGNEY M., JORGENSEN P.L., DIDERRICHSEN B. et PRIEST F.G., 1995. Extracellular enzyme synthesis in a sporulation-deficient strain of *Bacillus licheniformis*. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (11): 3775-3780.

FOGARTHY W.M. et KELLY C.T., 1990. *Microbial enzymes and biotechnology*, 2^e Édition. Elsevier Science Publishing, New-York, États-Unis, 472 pages.

FRANKENA J., VAN VERSEVELD H.W. et STOUTHAMER A.H., 1985. A continuous culture study of the bioenergetic aspects of growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 22: 169-176.

GIESECKE U.E., BIERBAUM G., RUDDE H., SPOHN U. et WANDREY C., 1991. Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35: 720-724.

GODFREY T. et WEST S.I., 1996. Introduction to industrial enzymology. Dans: *Industrial enzymology*, 2^e Édition, GODFREY T. et S.I WEST, Stockton Press, New-York, États-Unis, pp. 1-8.

GUPTA R., GUPTA K., SAXENA R.K. et KHAN S., 1999. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus sp.* *Biotechnology Letters* 21: 135-138.

GUPTA R., BEG Q.K. et LORENZ P., 2002a. Bacterial alkaline proteases : molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 15-32.

GUPTA R., BEG Q.K., KHAN S. et CHAUHAN B. 2002b. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 381-395.

HAMEED A., KESHAVARZ T. et EVANS C., 1999. Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *Journal of Chemical technology and Biotechnology* 74: 5-8.

HUMPHREY A., 1998. Shake flasks to fermentor: what have we learned? *Biotechnology Progress* 14: 3-7.

ICHIDA J.M., KRIZOVA L., LEFEBVRE C.A., KEENER H.M., ELWELL D.L. et BURT JR E.H., 2001. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiological Methods* 47: 199-208.

ITO S., KOBAYASHI T., ARA K., OZAKI K., KAWAI S. et HATADA Y., 1998. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles* 2(3): 185-190.

JOO H-S., KUMAR C.G., PARK G-C., KIM K.T., PAIK S.R. et CHANG C-S., 2002. Optimisation of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry* 38: 155-159.

KALISZ H.M., 1988. Microbial proteinases. *Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnology* 36: 1-65.

KAUR S., VORHA R.M., KAPOOR M., BEG Q.K. et HOONDAL G.S., 2001. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus sp.* P-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 125-129.

KEAY L., MOSELEY M.H., ANDERSON R.G., O'CONNOR R.J. et WILDI B.S., 1972. Production and isolation of microbial proteases. *Biotechnology and Bioengineering. Symposium* 3: 63-92.

KEMBHAVI A.A., KULKARNI A. et PANT A., 1993. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM no. 64. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 38: 83-92.

KUDRYA V.A. et SIMONENKO I.A., 1994. Alkaline serine protease and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41: 505-509.

KUMAR C.G. et TAKAGI H., 1999. Microbial alkaline proteases : From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 17: 561-594.

KUMAR G. et PARRACK P., 2003. Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 757-762.

KUNITZ M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *Journal of General Physiology* 30: 291-310.

LACHHAB K., TYAGI R.D. et VALÉRO J.R., 2001. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as raw material : effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry* 37: 197-208.

LAMONTAGNE E., 2004. *Caractérisation de nouvelles souches de Bacillus thuringiensis d'intérêt pour la production de biopesticides et d'enzymes par fermentation de boues d'épuration municipales*. Mémoire de maîtrise. INRS-ETE, Université du Québec, Canada. 112 pages.

LEBLANC M.E., 2003. *Effet des différentes stratégies et prétraitements des biosolides municipaux sur la croissance, la sporulation et l'entomotoxicité de Bacillus thuringiensis var. kurstaki*. Mémoire de maîtrise. INRS-ETE, Université du Québec, Canada. 126 pages.

MABROUK S.S., HASHEM A.M., EL-SHAYEB N.M.A., ISMAIL A.M.S. et ABDEL-FATTAH A.F., 1999. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology* 69: 155-159.

MANCZINGER L., ROZS M., VAGVOLGYI C. et KEVEI F., 2003. Isolation and characterization of a new Keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 35-39.

MENVIQ, 1986. *Sédiments-Détermination de l'azote et du carbone total, Analyse élémentaire (CHN) 86.09/305*. Ministère de l'Environnement du Québec, Québec, Canada.

MENVIQ, 1989. *Méthode de digestion des boues d'épuration 89.12/213- mét.1.3*. Ministère de l'Environnement du Québec, Québec, Canada.

MENV, 2004. *Guide de valorisation des matières résiduelles fertilisantes – Critères de référence et normes réglementaires*. Direction du milieu rural, Ministère de l'Environnement du Québec, Québec, Canada, 138 pages.

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

MOREIRA K.A., ALBUQUERQUE B.F., TEIXEIRA M.F.S., PORTO A.L.F. et LIMA FILHO J.L., 2002. Application of protease from *Nocardioopsis sp.* as a laundry detergent additive. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 307-312.

OZBEK B. et GAYIK S., 2001. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry* 36: 729-741

OZERGİN-ULGEN K. et MAVITUNA F., 1998. Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces Coelicolor* A3(2) culture in a batch bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 73: 243-250.

PEREGO P., CONVERTI A. et DEL BORGHI M., 2003. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolysate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology* 89: 125-131.

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

PRESCOTT L., HARLEY J.P. et KLEIN D.A., 1995. *Microbiologie*, 2^e Édition. DeBoeck-Wesmael, Bruxelles, Belgique, 1014 pages.

PURI S., BEG Q.K. et GUPTA R., 2002. Optimisation of alkaline protease production from *Bacillus sp.* by response surface methodology. *Current Microbiology* 44: 286-290.

RAHMAN R.N.Z.A., RAZAK C.N., AMPON K., BASRI M., YUNNUS W.M.Z.W. et SALLEH A.B., 1994. Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40: 822-827.

RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S. et DESHPANDE V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3): 597-625.

ROWE G.E., MARGARITIS A. et WEI N., 2003. Specific oxygen uptake rate variations during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD. *Biotechnology Progress* 19: 1439-1443.

SACHVEDA V., TYAGI R.D. et VALÉRO J.R., 1999. Factors affecting the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *Recent Research Developments in Microbiology* 3: 363-375.

SACHVEDA V., TYAGI R.D. et VALÉRO J.R., 2000. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water Science and Technology* 42: 211-216.

SINGH J., VOHRA R.M. et SAHOO D.K., 1999. Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *Bacillus sphaericus*. *Biotechnology Letters* 21: 921-924.

SINHA N. et SATYANARAYANA T., 1991. Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*. *Indian Journal of Microbiology* 31 (4) : 425-430.

TIRADO-MONTIEL M.L., 1997. *Utilisation des boues des usines de traitement comme moyen alternatif pour la production de l'insecticide microbien Bacillus thuringiensis*. Thèse de doctorat. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. 223 pages.

TYAGI R.D., SIKATI FOKO V., BARNABÉ S., VIDYARTHI A.S. et VALÉRO J.R., 2002. Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. *Water Science and Technology* 46 (10): 247-254.

VEGLIO F., BEOLCHINI F. et UBALDINI S., 1998. Empirical model for oxygen mass transfer : a comparison between shake flask and lab-scale fermentor and application to manganiferous ore bioleaching. *Process Biochemistry* 33 (4): 367-376.

VICCARO J.P., 1973. Alkaline protease, method for its production, and detergent composition. Brevet américain no. 3 748 233. 5 pages.

VIDYARTHI A.S., TYAGI R.D., VALÉRO J.R. et SURAMPALLI R.Y., 2002. Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research* 36 (19): 4850-4860.

YEZZA A., TYAGI R.D., VALÉRO J.R., SURAMPALLI R.Y. et SMITH J., 2004. Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology* 31: 545-552.

YEZZA A., TYAGI R.D., VALÉRO J.R. et SURAMPALLI R.Y., 2005a. Wastewater sludge pre-treatment for enhancing entomotoxicity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, accepté le 17 janvier 2005. Article sous presse.

YEZZA A., TYAGI R.D., VALÉRO J.R. et SURAMPALLI R.Y., 2005b. Protease synthesis and entomotoxicity potency in *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using sludge as a raw material. Article soumis pour publication à: *Enzyme and Microbial Technology*.

YEZZA A., 2005c. *Conception d'une stratégie de production opérationnelle de biopesticide à base de Bacillus thuringiensis utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation*. Thèse de doctorat. INRS-ETE, Université du Québec, Canada, 265 pages.

Annexes



ANNEXE 1

Données sur la comparaison de la croissance et de l'activité protéolytique de *B. licheniformis* en erlenmeyer et en bioréacteur.

Tableau 1 Évolution de la croissance de *B. licheniformis* et de l'activité protéolytique lors d'une fermentation de 48 h effectuée en erlenmeyer dans les boues d'épuration de la CUQ à 25 g/L de MES.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)	Ac. protéolytique (U.I./mL)
0	2,13E+07	0,05
4	2,20E+07	0,06
7	2,17E+07	-
10	4,03E+07	-
12	4,00E+07	0,06
15	8,50E+07	-
18	2,05E+08	-
21	3,57E+08	-
26	5,77E+08	0,12
30	5,47E+08	-
36	4,63E+08	0,33
42	4,77E+08	-
53	5,17E+08	0,28

Tableau 2 Évolution de la croissance de *B. licheniformis* et de l'activité protéolytique lors d'une fermentation de 48 h effectuée en bioréacteur dans les boues d'épuration de la CUQ à 25 g/L de MES.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)	Ac. protéolytique (U.I./mL)
0	1,06E+07	0,06
3	6,67E+06	0,97
6	1,03E+07	1,11
9	4,67E+07	1,13
12	2,07E+08	1,61
15	2,90E+08	2,82
18	2,74E+07	4,51
21	2,30E+09	3,44
24	9,67E+08	3,63
30	7,67E+06	2,35
36	9,90E+08	0,89
42	8,03E+08	1,24
48	8,13E+08	1,02

ANNEXE 2

Données sur l'étude de l'inoculum

Tableau 1 Croissance de *B. licheniformis* dans les boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES ayant été inoculées à 3 % (v/v) avec une culture de départ en bouillon nutritif âgée de 12 h. Fermentation effectuée en erlenmeyer.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)
0	1,59E+07
4	1,41E+07
12	1,04E+07
16	1,04E+07
24	8,77E+06
36	1,07E+07
48	1,27E+07

Tableau 2 Croissance de *B. licheniformis* dans les boues secondaires de la CUQ à 15 g/L de MES ayant été inoculées à 3 % (v/v) avec une culture de départ en bouillon nutritif âgée de 12 h. Fermentation effectuée en erlenmeyer.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)
0	1,61E+07
3	1,72E+07
6	2,05E+07
9	3,60E+07
12	8,40E+07
15	1,91E+08
18	3,47E+08
21	3,57E+08
24	3,43E+08
30	2,73E+08
36	2,87E+08
42	3,53E+08
48	3,90E+08

Tableau 3

Évolution du nombre de cellules et de spores de *B. licheniformis* lors de fermentations en erlenmeyer dans les boues secondaires de la CUQ (25 g/L de MES). Boues inoculées à 3 % (v/v) avec des pré-cultures en boue (15 g/L de MES) âgées de 9 h. Essais effectués en triplicata.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	7,90E+06	4,87E+06	6,00E+06	6,26E+06	1,53E+06
3	1,98E+07	1,86E+07	2,06E+07	1,97E+07	1,02E+06
6	8,13E+07	9,23E+07	6,17E+07	7,84E+07	1,55E+07
9	1,13E+08	1,37E+08	1,34E+08	1,28E+08	1,32E+07
12	4,90E+08	3,97E+08	6,27E+08	5,04E+08	1,16E+08
15	6,93E+08	8,03E+08	7,60E+08	7,52E+08	5,54E+07
18	7,60E+08	8,07E+08	7,53E+08	7,73E+08	2,91E+07
21	7,97E+08	8,23E+08	7,87E+08	8,02E+08	1,90E+07
24	7,50E+08	8,37E+08	7,90E+08	7,92E+08	4,34E+07
30	7,27E+08	8,20E+08	7,97E+08	7,81E+08	4,86E+07
36	7,80E+08	7,97E+08	8,00E+08	7,92E+08	1,07E+07
42	7,17E+08	7,90E+08	8,40E+08	7,82E+08	6,20E+07
48	7,97E+08	8,23E+08	8,03E+08	8,08E+08	1,39E+07

Temps (h)	Spores viables (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	2,43E+03	2,67E+03	4,40E+03	3,17E+03	1,07E+03
3	3,33E+03	3,37E+03	3,67E+03	3,46E+03	1,84E+02
6	1,60E+03	4,23E+03	3,77E+03	3,20E+03	1,41E+03
9	2,77E+03	3,43E+03	1,66E+03	2,62E+03	8,98E+02
12	1,77E+03	3,37E+03	5,80E+03	3,64E+03	2,03E+03
15	2,50E+04	3,87E+04	4,63E+04	3,67E+04	1,08E+04
18	2,73E+05	5,97E+05	5,33E+05	4,68E+05	1,71E+05
21	2,70E+06	2,37E+06	5,17E+06	3,41E+06	1,53E+06
24	8,37E+06	8,80E+06	1,03E+07	9,14E+06	9,96E+05
30	9,60E+06	7,37E+06	1,22E+07	9,72E+06	2,42E+06
36	1,13E+07	1,22E+07	1,27E+07	1,21E+07	7,42E+05
42	9,00E+06	1,07E+07	1,18E+07	1,05E+07	1,43E+06
48	8,37E+06	1,20E+07	1,28E+07	1,10E+07	2,35E+06

Tableau 4

Évolution du nombre de cellules et de spores de *B. licheniformis* lors de fermentations en erlenmeyer dans les boues secondaires de la CUQ (25 g/L de MES). Boues inoculées à 3 % (v/v) avec des pré-cultures en boue (15 g/L de MES) âgées de 12 h. Essais effectués en triplicata.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	1,34E+07	1,00E+07	1,15E+07	1,16E+07	1,67E+06
3	9,67E+07	7,80E+07	9,57E+07	9,01E+07	1,05E+07
6	3,50E+08	5,17E+08	3,40E+08	4,02E+08	9,92E+07
9	6,40E+08	6,33E+08	8,47E+08	7,07E+08	1,21E+08
12	9,00E+08	1,01E+09	9,07E+08	9,40E+08	6,36E+07
15	1,14E+09	1,19E+09	1,17E+09	1,17E+09	2,69E+07
18	9,23E+08	1,37E+09	1,26E+09	1,18E+09	2,31E+08
21	1,17E+09	1,22E+09	1,17E+09	1,18E+09	2,89E+07
24	9,63E+08	1,13E+09	1,11E+09	1,07E+09	9,07E+07
30	1,06E+09	1,24E+09	1,20E+09	1,17E+09	9,39E+07
36	1,14E+09	1,28E+09	1,12E+09	1,18E+09	8,91E+07
42	1,12E+09	1,23E+09	1,09E+09	1,15E+09	7,63E+07
48	9,03E+08	1,17E+09	1,18E+09	1,09E+09	1,58E+08

Temps (h)	Spores viables (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	2,50E+03	2,40E+03	2,53E+03	2,48E+03	6,94E+01
3	3,43E+03	3,43E+03	4,03E+03	3,63E+03	3,46E+02
6	2,67E+03	3,37E+03	4,93E+03	3,66E+03	1,16E+03
9	2,70E+03	3,30E+03	2,57E+03	2,86E+03	3,91E+02
12	3,57E+03	2,77E+03	3,63E+03	3,32E+03	4,82E+02
15	2,37E+04	2,47E+04	3,40E+04	2,74E+04	5,70E+03
18	3,67E+05	4,00E+05	4,77E+05	4,14E+05	5,64E+04
21	5,90E+06	4,37E+06	4,47E+06	4,91E+06	8,58E+05
24	2,06E+07	1,91E+07	1,80E+07	1,93E+07	1,29E+06
30	2,77E+07	3,43E+07	1,86E+07	2,69E+07	7,90E+06
36	3,57E+07	2,27E+07	1,76E+07	2,53E+07	9,32E+06
42	3,80E+07	3,70E+07	1,82E+07	3,11E+07	1,12E+07
48	4,03E+07	1,93E+07	2,01E+07	2,66E+07	1,19E+07

Tableau 5

Évolution du nombre de cellules et de spores de *B. licheniformis* lors de fermentations en erlenmeyer dans les boues secondaires de la CUQ (25 g/L de MES). Boues inoculées à 3 % (v/v) avec des pré-cultures en boue (15 g/L de MES) âgées de 15 h. Essais effectués en triplicata.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	2,30E+07	2,57E+07	2,40E+07	2,42E+07	1,35E+06
3	6,23E+07	7,47E+07	1,08E+08	8,18E+07	2,38E+07
6	1,53E+08	1,41E+08	1,55E+08	1,50E+08	7,76E+06
9	2,42E+08	2,18E+08	2,60E+08	2,40E+08	2,13E+07
12	3,27E+08	4,33E+08	4,30E+08	3,97E+08	6,06E+07
15	8,07E+08	7,47E+08	7,97E+08	7,83E+08	3,21E+07
18	8,13E+08	8,27E+08	8,13E+08	8,18E+08	7,70E+06
21	7,90E+08	7,87E+08	8,20E+08	7,99E+08	1,84E+07
24	8,13E+08	8,23E+08	7,93E+08	8,10E+08	1,53E+07
30	8,23E+08	8,03E+08	8,13E+08	8,13E+08	1,00E+07
36	8,13E+08	8,23E+08	7,47E+08	7,94E+08	4,17E+07
42	8,27E+08	8,10E+08	8,30E+08	8,22E+08	1,07E+07
48	8,43E+08	8,23E+08	7,63E+08	8,10E+08	4,16E+07

Temps (h)	Spores viables (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	3,13E+03	2,93E+03	3,30E+03	3,12E+03	1,84E+02
3	3,00E+03	3,10E+03	3,37E+03	3,16E+03	1,90E+02
6	2,87E+03	2,93E+03	3,03E+03	2,94E+03	8,39E+01
9	3,17E+03	3,63E+03	3,90E+03	3,57E+03	3,71E+02
12	4,30E+03	5,37E+03	3,63E+03	4,43E+03	8,74E+02
15	3,70E+04	6,37E+04	3,57E+04	4,54E+04	1,58E+04
18	4,53E+05	4,60E+05	4,50E+05	4,54E+05	5,09E+03
21	3,10E+06	3,37E+06	3,30E+06	3,26E+06	1,39E+05
24	8,93E+06	6,67E+06	6,47E+06	7,36E+06	1,37E+06
30	1,10E+07	1,15E+07	1,20E+07	1,15E+07	4,84E+05
36	1,19E+07	1,14E+07	1,29E+07	1,21E+07	7,64E+05
42	1,25E+07	1,22E+07	1,35E+07	1,27E+07	6,93E+05
48	1,11E+07	1,08E+07	1,35E+07	1,18E+07	1,46E+06

Tableau 6

Évolution du nombre de cellules et de spores de *B. licheniformis* obtenues lors de fermentations effectuées en erlenmeyer, dans les boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES. Boues inoculées à 1 % (v/v) avec une pré-culture préparée dans des boues à 15 g/L de MES et âgée de 12 h. Essais effectués en triplicata.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	1,11E+07	1,22E+07	1,30E+07	1,21E+07	9,51E+05
3	1,95E+07	1,86E+07	2,10E+07	1,97E+07	1,23E+06
6	8,83E+07	9,43E+07	6,80E+07	8,36E+07	1,38E+07
9	1,24E+08	1,37E+08	1,32E+08	1,31E+08	6,74E+06
12	5,90E+08	4,33E+08	5,97E+08	5,40E+08	9,24E+07
15	7,37E+08	8,03E+08	7,73E+08	7,71E+08	3,34E+07
18	7,93E+08	7,90E+08	7,90E+08	7,91E+08	1,92E+06
21	7,73E+08	8,03E+08	7,97E+08	7,91E+08	1,58E+07
24	8,23E+08	7,80E+08	8,03E+08	8,02E+08	2,17E+07
30	8,10E+08	8,20E+08	8,40E+08	8,23E+08	1,53E+07
36	7,63E+08	8,30E+08	7,97E+08	7,97E+08	3,33E+07
42	7,83E+08	8,10E+08	7,83E+08	7,92E+08	1,54E+07
48	7,93E+08	8,20E+08	7,67E+08	7,93E+08	2,67E+07

Temps (h)	Spores viables (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	2,23E+03	2,67E+03	4,33E+03	3,08E+03	1,11E+03
3	3,47E+03	3,37E+03	3,63E+03	3,49E+03	1,35E+02
6	2,10E+03	4,23E+03	3,93E+03	3,42E+03	1,15E+03
9	2,70E+03	3,43E+03	1,68E+03	2,60E+03	8,81E+02
12	2,33E+03	3,37E+03	5,67E+03	3,79E+03	1,71E+03
15	2,73E+04	3,87E+04	4,37E+04	3,66E+04	8,37E+03
18	3,33E+05	5,97E+05	5,00E+05	4,77E+05	1,33E+05
21	3,33E+06	2,37E+06	5,37E+06	3,69E+06	1,53E+06
24	3,73E+06	8,80E+06	1,06E+07	7,72E+06	3,57E+06
30	1,02E+07	7,37E+06	1,24E+07	9,98E+06	2,52E+06
36	1,20E+07	1,22E+07	1,29E+07	1,23E+07	4,67E+05
42	1,08E+07	1,07E+07	1,20E+07	1,12E+07	6,85E+05
48	1,16E+07	1,20E+07	1,18E+07	1,18E+07	2,01E+05

Tableau 7

Évolution du nombre de cellules et de spores de *B. licheniformis* obtenues lors de fermentations effectuées en erlenmeyer, dans les boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES. Boues inoculées à 2 % (v/v) avec une pré-culture préparée dans des boues à 15 g/L de MES et âgée de 12 h. Essais effectués en triplicata.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	1,33E+07	1,00E+07	1,15E+07	1,16E+07	1,62E+06
3	1,02E+08	7,80E+07	9,57E+07	9,18E+07	1,23E+07
6	4,60E+08	5,17E+08	3,40E+08	4,39E+08	9,02E+07
9	7,03E+08	6,33E+08	8,47E+08	7,28E+08	1,09E+08
12	1,05E+09	1,01E+09	9,07E+08	9,89E+08	7,31E+07
15	1,17E+09	1,26E+09	8,37E+08	1,09E+09	2,21E+08
18	1,12E+09	1,20E+09	1,13E+09	1,15E+09	4,33E+07
21	1,17E+09	1,22E+09	1,17E+09	1,19E+09	2,71E+07
24	1,11E+09	1,13E+09	1,11E+09	1,12E+09	8,82E+06
30	1,02E+09	1,24E+09	1,23E+09	1,16E+09	1,22E+08
36	1,07E+09	1,22E+09	1,15E+09	1,15E+09	7,53E+07
42	1,20E+09	1,23E+09	1,08E+09	1,17E+09	8,01E+07
48	1,10E+09	1,17E+09	1,18E+09	1,15E+09	4,33E+07

Temps (h)	Spores viables (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	6,20E+03	6,23E+03	5,87E+03	6,10E+03	2,03E+02
3	7,37E+03	6,23E+03	5,70E+03	6,43E+03	8,51E+02
6	6,40E+03	7,03E+03	6,30E+03	6,58E+03	3,98E+02
9	5,30E+03	7,80E+03	6,33E+03	6,48E+03	1,26E+03
12	6,30E+03	7,70E+03	6,50E+03	6,83E+03	7,57E+02
15	3,23E+04	2,47E+04	3,40E+04	3,03E+04	4,98E+03
18	3,67E+05	4,00E+05	5,57E+05	4,41E+05	1,01E+05
21	5,90E+06	4,37E+06	6,00E+06	5,42E+06	9,16E+05
24	1,51E+07	1,51E+07	1,39E+07	1,47E+07	6,93E+05
30	1,66E+07	1,76E+07	1,80E+07	1,74E+07	7,40E+05
36	1,71E+07	1,78E+07	1,70E+07	1,73E+07	4,22E+05
42	1,72E+07	1,77E+07	1,72E+07	1,74E+07	2,99E+05
48	1,74E+07	1,77E+07	1,69E+07	1,73E+07	4,35E+05

Tableau 8

Évolution du nombre de cellules et de spores de *B. licheniformis* obtenues lors de fermentations effectuées en erlenmeyer, dans les boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES. Boues inoculées à 3 % (v/v) avec une pré-culture préparée dans des boues à 15 g/L de MES et âgée de 12 h. Essais effectués en triplicata.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	2,30E+07	2,40E+07	2,11E+07	2,27E+07	1,47E+06
3	9,27E+07	1,08E+08	1,06E+08	1,02E+08	8,53E+06
6	4,43E+08	5,73E+08	5,67E+08	5,28E+08	7,32E+07
9	6,23E+08	7,00E+08	6,77E+08	6,67E+08	3,93E+07
12	7,33E+08	8,33E+08	7,97E+08	7,88E+08	5,06E+07
15	9,63E+08	9,37E+08	8,17E+08	9,06E+08	7,81E+07
18	1,32E+09	1,44E+09	1,22E+09	1,33E+09	1,10E+08
21	1,40E+09	1,55E+09	1,32E+09	1,42E+09	1,13E+08
24	1,42E+09	1,43E+09	1,22E+09	1,36E+09	1,17E+08
30	1,24E+09	1,40E+09	1,17E+09	1,27E+09	1,17E+08
36	1,35E+09	1,30E+09	1,13E+09	1,26E+09	1,15E+08
42	1,32E+09	1,32E+09	1,12E+09	1,25E+09	1,19E+08
48	1,46E+09	1,29E+09	1,24E+09	1,33E+09	1,19E+08

Temps (h)	Spores viables (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	9,13E+03	9,33E+03	8,93E+03	9,13E+03	2,00E+02
3	8,53E+03	9,47E+03	9,60E+03	9,20E+03	5,81E+02
6	9,50E+03	1,00E+04	9,57E+03	9,70E+03	2,91E+02
9	1,49E+04	1,36E+04	9,17E+03	1,26E+04	3,01E+03
12	7,70E+04	8,23E+04	9,60E+04	8,51E+04	9,80E+03
15	3,87E+05	4,33E+05	3,00E+05	3,73E+05	6,77E+04
18	1,94E+06	1,69E+06	1,74E+06	1,79E+06	1,31E+05
21	4,30E+06	3,47E+06	4,20E+06	3,99E+06	4,55E+05
24	1,00E+07	9,07E+06	8,67E+06	9,24E+06	6,84E+05
30	2,01E+07	2,00E+07	1,84E+07	1,95E+07	9,44E+05
36	2,14E+07	2,08E+07	2,05E+07	2,09E+07	4,62E+05
42	2,15E+07	2,19E+07	2,10E+07	2,15E+07	4,68E+05
48	2,07E+07	2,17E+07	2,12E+07	2,12E+07	5,34E+05

Tableau 9

Évolution du nombre de cellules et de spores de *B. licheniformis* obtenues lors de fermentations effectuées en erlenmeyer, dans les boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES. Boues inoculées à 4 % (v/v) avec une pré-culture préparée dans des boues à 15 g/L de MES et âgée de 12 h. Essais effectués en triplicata.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	3,00E+07	3,07E+07	2,73E+07	2,93E+07	1,76E+06
3	5,07E+07	6,93E+07	4,67E+07	5,56E+07	1,21E+07
6	9,13E+07	1,17E+08	8,87E+07	9,89E+07	1,55E+07
9	1,54E+08	2,88E+08	2,24E+08	2,22E+08	6,74E+07
12	9,43E+08	8,30E+08	1,05E+09	9,40E+08	1,08E+08
15	1,29E+09	1,40E+09	1,64E+09	1,44E+09	1,81E+08
18	2,37E+09	2,27E+09	2,40E+09	2,34E+09	6,94E+07
21	2,16E+09	2,47E+09	2,20E+09	2,28E+09	1,66E+08
24	2,14E+09	2,37E+09	2,00E+09	2,17E+09	1,85E+08
30	2,22E+09	2,30E+09	2,40E+09	2,31E+09	9,02E+07
36	2,19E+09	2,23E+09	2,00E+09	2,14E+09	1,23E+08
42	2,20E+09	2,57E+09	2,17E+09	2,31E+09	2,21E+08
48	2,16E+09	2,50E+09	2,23E+09	2,30E+09	1,78E+08

Temps (h)	Spores viables (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	1,22E+04	1,28E+04	1,35E+04	1,28E+04	6,17E+02
3	1,20E+04	1,33E+04	1,47E+04	1,34E+04	1,35E+03
6	1,23E+04	1,40E+04	1,29E+04	1,31E+04	8,69E+02
9	2,04E+04	2,00E+04	2,22E+04	2,09E+04	1,15E+03
12	2,68E+04	2,33E+04	2,89E+04	2,63E+04	2,81E+03
15	5,80E+04	4,60E+04	7,80E+04	6,07E+04	1,62E+04
18	3,37E+05	6,07E+05	4,97E+05	4,80E+05	1,36E+05
21	2,13E+06	2,43E+06	2,50E+06	2,36E+06	1,95E+05
24	7,03E+06	8,47E+06	7,50E+06	7,67E+06	7,31E+05
30	2,31E+07	2,28E+07	2,32E+07	2,30E+07	2,46E+05
36	2,57E+07	2,73E+07	2,67E+07	2,66E+07	8,39E+05
42	2,90E+07	2,83E+07	3,07E+07	2,93E+07	1,20E+06
48	2,83E+07	2,73E+07	3,03E+07	2,87E+07	1,53E+06

Tableau 10

Évolution du nombre de cellules et de spores de *B. licheniformis* obtenues lors de fermentations effectuées en erlenmeyer, dans les boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES. Boues inoculées à 4,5 % (v/v) avec une pré-culture préparée dans des boues à 15 g/L de MES et âgée de 12 h. Essais effectués en triplicata.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	3,80E+07	3,70E+07	3,63E+07	3,71E+07	8,39E+05
3	9,83E+07	9,07E+07	9,67E+07	9,52E+07	4,03E+06
6	4,47E+08	3,07E+08	3,40E+08	3,64E+08	7,31E+07
9	7,27E+08	9,53E+08	8,43E+08	8,41E+08	1,13E+08
12	1,03E+09	1,50E+09	9,13E+08	1,15E+09	3,13E+08
15	2,10E+09	1,92E+09	2,05E+09	2,02E+09	9,34E+07
18	2,43E+09	2,30E+09	2,37E+09	2,37E+09	6,67E+07
21	2,67E+09	2,47E+09	2,53E+09	2,56E+09	1,02E+08
24	2,67E+09	2,47E+09	2,57E+09	2,57E+09	1,00E+08
30	2,67E+09	2,53E+09	2,60E+09	2,60E+09	6,67E+07
36	2,73E+09	2,70E+09	2,77E+09	2,73E+09	3,33E+07
42	2,73E+09	2,70E+09	2,70E+09	2,71E+09	1,92E+07
48	2,67E+09	2,60E+09	2,77E+09	2,68E+09	8,39E+07

Temps (h)	Spores viables (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	1,37E+04	1,30E+04	1,30E+04	1,32E+04	4,23E+02
3	1,45E+04	1,46E+04	1,39E+04	1,43E+04	4,06E+02
6	1,55E+04	1,67E+04	1,16E+04	1,46E+04	2,66E+03
9	1,96E+04	1,80E+04	1,11E+04	1,62E+04	4,55E+03
12	2,31E+04	1,62E+04	1,82E+04	1,92E+04	3,57E+03
15	4,37E+04	6,33E+04	3,50E+04	4,73E+04	1,45E+04
18	3,53E+05	4,13E+05	5,67E+05	4,44E+05	1,10E+05
21	2,70E+06	4,40E+06	4,00E+06	3,70E+06	8,89E+05
24	9,13E+06	1,08E+07	2,01E+07	1,33E+07	5,88E+06
30	3,83E+07	3,57E+07	3,77E+07	3,72E+07	1,39E+06
36	3,63E+07	3,50E+07	3,57E+07	3,57E+07	6,67E+05
42	3,80E+07	3,70E+07	3,80E+07	3,77E+07	5,77E+05
48	3,37E+07	3,40E+07	3,53E+07	3,43E+07	8,82E+05

Tableau 11

Évolution du nombre de cellules et de spores de *B. licheniformis* obtenues lors de fermentations effectuées en erlenmeyer, dans les boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES. Boues inoculées à 5 % (v/v) avec une pré-culture préparée dans des boues à 15 g/L de MES et âgée de 12 h. Essais effectués en triplicata.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	4,63E+07	4,80E+07	4,30E+07	4,58E+07	2,55E+06
3	1,05E+08	1,15E+08	1,06E+08	1,09E+08	5,55E+06
6	4,43E+08	5,73E+08	5,67E+08	5,28E+08	7,32E+07
9	8,90E+08	7,90E+08	6,77E+08	7,86E+08	1,07E+08
12	1,25E+09	1,09E+09	1,06E+09	1,13E+09	1,00E+08
15	1,68E+09	1,56E+09	1,61E+09	1,62E+09	6,05E+07
18	2,12E+09	2,17E+09	2,12E+09	2,13E+09	2,89E+07
21	2,13E+09	2,18E+09	2,16E+09	2,16E+09	2,50E+07
24	2,20E+09	2,27E+09	2,33E+09	2,27E+09	6,67E+07
30	2,23E+09	2,20E+09	2,13E+09	2,19E+09	5,09E+07
36	2,50E+09	2,13E+09	2,23E+09	2,29E+09	1,90E+08
42	2,13E+09	2,10E+09	2,17E+09	2,13E+09	3,33E+07
48	2,03E+09	2,17E+09	2,30E+09	2,17E+09	1,33E+08

Temps (h)	Spores viables (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	1,48E+04	1,65E+04	1,70E+04	1,61E+04	1,15E+03
3	1,73E+04	1,89E+04	1,77E+04	1,80E+04	7,95E+02
6	2,05E+04	2,06E+04	1,65E+04	1,92E+04	2,34E+03
9	5,67E+04	3,17E+04	4,33E+04	4,39E+04	1,25E+04
12	4,30E+04	6,27E+04	7,37E+04	5,98E+04	1,55E+04
15	7,77E+04	6,93E+04	6,40E+04	7,03E+04	6,89E+03
18	4,03E+05	4,43E+05	5,13E+05	4,53E+05	5,57E+04
21	3,63E+06	3,50E+06	4,23E+06	3,79E+06	3,91E+05
24	9,13E+06	1,01E+07	9,57E+06	9,59E+06	4,67E+05
30	2,18E+07	2,19E+07	2,21E+07	2,19E+07	1,58E+05
36	3,33E+07	3,37E+07	3,30E+07	3,33E+07	3,33E+05
42	3,37E+07	3,37E+07	3,30E+07	3,34E+07	3,85E+05
48	3,27E+07	3,57E+07	3,30E+07	3,38E+07	1,64E+06

Tableau 12

Évolution du nombre de cellules et de spores de *B. licheniformis* obtenues lors de fermentations effectuées en erlenmeyer, dans les boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES. Boues inoculées à 6 % (v/v) avec une pré-culture préparée dans des boues à 15 g/L de MES et âgée de 12 h. Essais effectués en triplicata.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	5,93E+07	5,90E+07	6,10E+07	5,98E+07	1,07E+06
3	1,25E+08	1,16E+08	1,08E+08	1,16E+08	8,18E+06
6	4,60E+08	4,73E+08	5,67E+08	5,00E+08	5,81E+07
9	9,73E+08	7,93E+08	6,67E+08	8,11E+08	1,54E+08
12	1,32E+09	1,15E+09	1,00E+09	1,16E+09	1,62E+08
15	1,44E+09	1,56E+09	1,27E+09	1,42E+09	1,46E+08
18	1,45E+09	1,68E+09	1,37E+09	1,50E+09	1,59E+08
21	1,36E+09	1,55E+09	1,39E+09	1,43E+09	1,00E+08
24	1,35E+09	1,49E+09	1,30E+09	1,38E+09	9,66E+07
30	1,31E+09	1,44E+09	1,41E+09	1,39E+09	7,18E+07
36	1,35E+09	1,53E+09	1,38E+09	1,42E+09	9,71E+07
42	1,45E+09	1,43E+09	1,36E+09	1,41E+09	4,79E+07
48	1,42E+09	1,38E+09	1,31E+09	1,37E+09	5,87E+07

Temps (h)	Spores viables (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	1,83E+04	1,86E+04	1,86E+04	1,85E+04	1,73E+02
3	1,88E+04	2,02E+04	2,05E+04	1,98E+04	9,45E+02
6	2,51E+04	2,06E+04	1,81E+04	2,13E+04	3,55E+03
9	5,67E+04	3,17E+04	4,50E+04	4,44E+04	1,25E+04
12	7,53E+04	6,97E+04	7,37E+04	7,29E+04	2,91E+03
15	8,23E+04	8,90E+04	1,07E+05	9,28E+04	1,28E+04
18	4,27E+05	4,23E+05	7,37E+05	5,29E+05	1,80E+05
21	5,23E+06	3,23E+06	3,93E+06	4,13E+06	1,01E+06
24	1,03E+07	8,90E+06	1,08E+07	1,00E+07	9,77E+05
30	2,02E+07	1,75E+07	1,84E+07	1,87E+07	1,34E+06
36	2,77E+07	3,27E+07	2,70E+07	2,91E+07	3,10E+06
42	3,13E+07	2,90E+07	3,10E+07	3,04E+07	1,26E+06
48	2,80E+07	2,97E+07	2,90E+07	2,89E+07	8,39E+05

Tableau 13

Évolution du nombre de cellules et de spores de *B. licheniformis* obtenues lors de fermentations effectuées en erlenmeyer, dans les boues secondaires de la CUQ à 25 g/L de MES. Boues inoculées à 10 % (v/v) avec une pré-culture préparée dans des boues à 15 g/L de MES et âgée de 12 h. Essais effectués en triplicata.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	9,40E+07	9,63E+07	9,90E+07	9,64E+07	2,50E+06
3	1,38E+08	1,45E+08	1,35E+08	1,39E+08	5,32E+06
6	4,43E+08	3,50E+08	3,40E+08	3,78E+08	5,70E+07
9	6,83E+08	7,27E+08	7,77E+08	7,29E+08	4,67E+07
12	1,03E+09	1,12E+09	9,70E+08	1,04E+09	7,36E+07
15	1,05E+09	1,12E+09	1,13E+09	1,10E+09	4,48E+07
18	1,04E+09	1,05E+09	1,10E+09	1,06E+09	3,40E+07
21	1,11E+09	1,11E+09	1,11E+09	1,11E+09	1,92E+06
24	9,90E+08	1,04E+09	1,22E+09	1,08E+09	1,23E+08
30	1,01E+09	1,10E+09	1,11E+09	1,07E+09	5,89E+07
36	1,04E+09	1,16E+09	1,25E+09	1,15E+09	1,05E+08
42	1,04E+09	1,20E+09	1,11E+09	1,12E+09	8,35E+07
48	1,06E+09	1,11E+09	1,16E+09	1,11E+09	5,34E+07

Temps (h)	Spores viables (UFC/mL)				
	essai 1	essai 2	essai 3	moyenne	écart type
0	2,77E+04	3,00E+04	3,23E+04	3,00E+04	2,33E+03
3	4,33E+04	3,20E+04	3,23E+04	3,59E+04	6,45E+03
6	4,30E+04	4,37E+04	4,33E+04	4,33E+04	3,33E+02
9	6,60E+04	4,13E+04	5,30E+04	5,34E+04	1,23E+04
12	1,07E+05	9,77E+04	1,05E+05	1,03E+05	4,98E+03
15	1,20E+05	1,07E+05	1,13E+05	1,13E+05	6,35E+03
18	3,97E+05	4,47E+05	5,70E+05	4,71E+05	8,92E+04
21	2,70E+06	4,50E+06	4,00E+06	3,73E+06	9,29E+05
24	9,77E+06	1,10E+07	1,09E+07	1,06E+07	6,96E+05
30	1,50E+07	1,34E+07	1,74E+07	1,53E+07	1,98E+06
36	2,97E+07	2,97E+07	2,91E+07	2,95E+07	3,76E+05
42	2,97E+07	3,10E+07	3,03E+07	3,03E+07	6,67E+05
48	3,20E+07	2,70E+07	3,00E+07	2,97E+07	2,52E+06

ANNEXE 3

Données sur la comparaison de la croissance et de l'activité protéolytique de *B. licheniformis* dans les boues à 25 g/L de MES et dans le milieu synthétique

Tableau 1 Évolution du nombre de cellules, de spores et de l'activité protéolytique de *B. licheniformis* lors d'une fermentation effectuée en bioréacteur dans le milieu synthétique ayant été inoculé avec un inoculum optimisé.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)	Spores viables (UFC/mL)	Ac. protéolytique (U.I./mL)
0	8,03E+06	7,33E+02	0,15
3	1,29E+07	6,47E+02	0,15
6	3,70E+07	2,87E+02	0,22
9	9,00E+07	4,37E+02	0,16
12	1,53E+08	7,87E+02	0,15
15	5,07E+08	1,29E+03	0,4
18	7,57E+06	2,80E+05	0,67
21	5,87E+07	7,45E+05	1,61
24	2,00E+08	2,40E+06	3,86
27	-	-	4,15
30	2,73E+08	1,44E+08	4,52
36	1,06E+09	1,30E+08	9,22
42	1,00E+09	1,11E+08	12,54
48	8,23E+08	1,29E+08	12,03

Tableau 2 Évolution du nombre de cellules, de spores et de l'activité protéolytique de *B. licheniformis* lors d'une fermentation effectuée en bioréacteur dans les boues à 25g/L ayant été inoculées avec un inoculum optimisé.

Temps (h)	Compte total (UFC/mL)	Spores viables (UFC/mL)	Ac. protéolytique (U.I./mL)
0	4,33E+07	1,37E+04	0,15
3	1,02E+08	3,43E+03	0,15
6	5,70E+08	3,00E+04	0,15
9	9,63E+08	2,70E+03	0,15
12	2,13E+09	1,30E+04	0,15
15	4,60E+09	2,37E+04	0,81
18	5,83E+09	3,17E+06	1,22
21	6,50E+09	5,90E+06	1,84
24	5,00E+09	9,63E+07	4,1
30	4,83E+09	1,13E+08	6,2
36	7,17E+09	1,23E+08	8,02
42	8,57E+09	1,23E+08	9,9
48	5,80E+09	1,29E+08	8,3

ANNEXE 4

Données sur l'effet de la concentration en MES des boues d'épuration sur la croissance de *Bacillus licheniformis* et sur l'activité protéolytique

Tableau 1 Évolution du nombre de cellules, de spores de *B. licheniformis* lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues à différentes concentrations en MES. Milieux inoculés avec un inoculum optimisé.

Temps (h)	20 g/L		35 g/L		40 g/L	
	Compte total (UFC/mL)	Spores (UFC/mL)	Compte total (UFC/mL)	Spores (UFC/mL)	Compte total (UFC/mL)	Spores (UFC/mL)
0	3,20E+07	1,20E+04	3,23E+07	1,20E+04	9,40E+06	2,70E+03
3	4,93E+08	1,00E+04	5,93E+08	1,33E+04	6,34E+07	3,33E+04
6	7,01E+08	1,11E+04	9,13E+08	1,45E+04	3,80E+08	1,11E+04
9	1,12E+09	1,23E+04	3,77E+09	1,23E+04	1,54E+09	3,45E+04
12	4,01E+09	1,34E+04	6,93E+09	1,00E+04	1,37E+09	1,48E+04
15	5,20E+09	2,03E+05	4,40E+09	2,03E+05	8,33E+08	2,03E+05
18	5,23E+09	4,03E+06	1,33E+09	5,03E+06	3,03E+09	2,45E+05
21	4,97E+09	3,32E+07	8,00E+08	3,44E+06	3,09E+09	3,36E+07
24	4,23E+09	5,31E+07	6,97E+09	1,44E+08	8,67E+08	7,41E+07
30	4,31E+09	8,08E+07	7,23E+09	1,30E+08	9,03E+08	9,03E+07
36	4,44E+09	1,11E+08	9,33E+08	1,11E+08	1,11E+09	2,03E+08
42	4,23E+09	1,18E+08	8,00E+09	1,56E+08	2,33E+09	2,72E+08
48	4,37E+09	1,44E+08	5,97E+09	1,63E+08	2,57E+09	2,85E+08

Tableau 2 Évolution de l'activité protéolytique de *B. licheniformis* lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues à différentes concentrations en MES. Milieux inoculés avec un inoculum optimisé.

Temps (h)	20 g/L	35 g/L	40 g/L
	Activité protéolytique (U.I./mL)	Activité protéolytique (U.I./mL)	Activité protéolytique (U.I./mL)
0	0,15	0,15	0,15
6	0,15	0,15	0,15
9	0,15	0,15	0,15
12	0,15	0,15	0,15
15	0,15	0,26	0,15
18	1,02	0,44	0,34
21	1,24	1,26	0,15
24	3,22	4,2	0,53
30	5,4	7,6	4,32
36	8,3	9,4	6,1
42	9	11,2	9,6
48	8,8	11	8,7

Tableau 3 Évolution du K_{La} , de l'OTR et de l'OUR lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues à 25 et 35 g/L de MES. Milieux inoculés avec un inoculum optimisé.

Temps (h)	25 g/L			35 g/L		
	K_{La} (1/h)	OTR (mmol/L.h)	OUR (mmol/L.h)	K_{La} (1/h)	OTR (mmol/L.h)	OUR (mmol/L.h)
3	66	0,76	0,71	55	0,78	0,66
6	75	0,97	0,93	53	0,94	0,89
9	74	1,2	0,99	59	1,3	0,91
12	95	1,5	1,3	69	1,6	1,1
15	104	2,1	2,0	89	2,2	1,8
18	78	0,92	0,87	66	0,89	0,79
21	64	0,79	0,78	62	0,74	0,74
24	63	0,84	0,83	63	0,72	0,69
36	60	0,72	0,71	61	0,72	0,71
48	64	0,75	0,72	60	0,75	0,61

ANNEXE 5

Données sur l'effet du pré-traitement hydrolytique des boues d'épuration sur la croissance de *Bacillus licheniformis* et sur l'activité protéolytique

Tableau 1 Évolution du nombre de cellules, de spores de *B. licheniformis* lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues hydrolysées à 25 et 35 g/L de MES. Milieux inoculés avec un inoculum optimisé.

Temps (h)	25 g/L		35 g/L	
	Compte total (UFC/mL)	Spores (UFC/mL)	Compte total (UFC/mL)	Spores (UFC/mL)
0	3,41E+07	1,24E+04	3,43E+07	1,36E+04
3	4,82E+08	1,45E+04	5,87E+08	1,47E+04
6	7,42E+08	1,45E+04	8,73E+08	3,59E+04
9	1,02E+09	1,11E+04	3,77E+09	2,23E+04
12	3,08E+09	1,26E+04	6,85E+09	3,00E+04
15	6,22E+09	2,03E+05	4,27E+09	1,03E+05
18	7,05E+09	5,33E+06	5,33E+09	4,03E+05
21	7,33E+09	3,64E+06	6,10E+09	2,44E+06
24	7,21E+09	1,58E+08	6,76E+09	9,44E+07
30	7,97E+09	1,74E+08	7,44E+09	1,40E+08
36	8,72E+09	2,29E+08	8,79E+09	2,41E+08
42	8,46E+09	2,65E+08	8,00E+09	2,85E+08
48	8,69E+09	2,74E+08	7,97E+09	2,87E+08

Tableau 2 Évolution de l'activité protéolytique de *B. licheniformis* lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues hydrolysées à 25 et 35 g/L de MES. Milieux inoculés avec un inoculum optimisé.

Temps (h)	25 g/L	35 g/L
	Activité protéolytique (U.I./mL)	Activité protéolytique (U.I./mL)
0	0,15	0,15
6	0,15	0,15
9	0,15	0,15
12	0,23	0,35
15	1,01	2,2
18	2,4	3,6
21	4,1	5,3
24	5,4	6,5
30	8,9	10,1
36	10,9	13,9
42	11,9	14,4
48	11,3	13,6

Tableau 3 Évolution du K_La , de l'OTR et de l'OUR lors de fermentations effectuées en bioréacteur dans les boues hydrolysées à 25 et 35 g/L de MES. Milieux inoculés avec un inoculum optimisé.

Temps (h)	25 g/L			35 g/L		
	K_La (1/h)	OTR (mmol/L.h)	OUR (mmol/L.h)	K_La (1/h)	OTR (mmol/L.h)	OUR (mmol/L.h)
3	115	0,84	0,76	101	0,83	0,79
6	103	1,5	1,1	109	1,4	1,2
9	107	1,8	1,1	115	1,8	1,4
12	123	2,1	1,7	122	2,1	1,9
15	129	3,6	3,1	123	3,9	3,5
18	91	2,4	1,8	99	2,5	2,1
21	73	1,8	1,1	100	2	1,8
24	84	0,89	0,82	81	1,2	0,99
36	74	0,84	0,79	78	1,1	0,98
48	74	0,83	0,78	74	1,1	0,99