

**PAUL GUAY**

**VALORISATION DE RÉSIDUS ORGANIQUES  
PAR PRODUCTION DE PROTÉINES  
D'ORIGINE UNICELLULAIRE**

**Mémoire  
présenté  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)**

**Département de Génie civil  
FACULTÉ DE SCIENCES ET GÉNIE  
UNIVERSITÉ LAVAL**

**DÉCEMBRE 1999**

**© Paul Guay, 1999**



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-49022-X

Canada

## RÉSUMÉ

Les résidus organiques d'origine alimentaire (principalement: fruits et légumes) constituent un déchet valorisable, pouvant servir à la production de protéines d'origine unicellulaire (POU). L'effet de la charge organique dans la fermentation de ces résidus a été étudié. Les fermentations, en cuvée, sont réalisées avec *C.utilis* ATCC-9255 dans des fioles de 250 ml. L'effet inhibiteur de l'éthanol sur la croissance des levures est démontré. Le taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) passe de  $0,126 \text{ h}^{-1}$  à  $0,044 \text{ h}^{-1}$  lorsque la concentration en éthanol dans le milieu de culture passe de  $2,5 \text{ g/L}$  à  $27,3 \text{ g/L}$ . La dilution du milieu de culture ne permet pas d'éliminer le métabolisme fermentaire. Le rendement des fermentations varie entre  $0,06$  à  $0,52 \text{ g}$  de biomasse /  $\text{g}$  de sucre. La production de POU à partir de résidus organiques est possible mais l'optimisation du rendement des fermentations est nécessaire à sa rentabilité.

## REMERCIEMENTS

Je désire remercier ceux qui ont rendu ce projet de recherche possible et m'ont assisté dans sa réalisation. Mes premiers remerciements son dédiés à mon directeur de recherche, Paul Lessard, pour ses précieux conseils et pour sa grande disponibilité. Je remercie également mon codirecteur, Gérardo Buelna, pour sa contribution. Un merci très spécial à Marie-Josée Hardy, agente de recherche au Centre de Recherche Industrielle du Québec (CRIQ), pour sa générosité, sa patience et son support. Finalement, je remercie l'équipe de techniciens du CRIQ pour leur participation au projet.

Ce projet n'aurait pas été possible sans l'apport financier du fond FCAR-CRIQ.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	i
REMERCIEMENTS .....	ii
TABLE DES MATIÈRES .....	iii
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	2
1.1 Les protéines d'origine unicellulaire .....	2
1.1.1 Avantages et désavantages des POU.....	3
1.1.2 Moyens de production des POU .....	4
1.1.2.1 Choix d'un micro-organisme .....	4
1.1.2.2 Choix d'un substrat .....	5
1.1.2.3 Conditions de culture .....	5
1.1.2.4 Le fermenteur .....	6
1.1.2.5 Récolte et séchage .....	8
1.1.3 La composition des POU .....	8
1.1.3.1 Acides aminés .....	9
1.1.3.2 Vitamines .....	10
1.1.4 Valeur nutritive .....	10
1.1.5 Tolérance par les humains .....	11
1.1.5.1 Acides nucléiques .....	11
1.1.6 Autres traitements .....	12
1.2 Travaux préliminaires .....	12
1.2.1 Études sur la disponibilité des résidus .....	12
1.2.2 Essais de fermentations .....	13
1.2.2.1 Première série d'essais .....	13
1.2.2.2 Deuxième série d'essais .....	13
1.2.2.3 Troisième série d'essais .....	14
1.3 Effet inhibiteur de l'éthanol .....	14
1.3.1 Méthodes d'évaluations .....	15
1.3.2 Mécanisme de la toxicité de l'éthanol .....	15
1.3.3 Site primaire de la toxicité de l'éthanol .....	17

1.3.4 Calcul de la valeur de $\mu$ .....	18
1.4 Les voies métaboliques .....	18
1.4.1 Le métabolisme fermentaire .....	19
1.4.2 Le métabolisme oxydatif .....	20
1.4.3 Régulation du métabolisme du glucose .....	20
1.4.4 Classification des levures .....	22
1.5 Objectif spécifique et hypothèses de recherche .....	23
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	24
2.1 Stratégie de recherche .....	24
2.2 Matériel .....	25
2.2.1 Filtrat .....	25
2.2.2 Souche et inoculum .....	29
2.2.3 Les fermentations .....	29
2.3 Méthodes .....	34
CHAPITRE III : RÉSULTATS – DISCUSSION .....	36
3.1 Effet inhibiteur de l'éthanol .....	36
3.1.1 Essai préliminaire .....	36
3.1.2 Effet de la charge organique .....	38
3.1.3 Première phase et forte concentration en glucose .....	43
3.1.4 Fermentations avec dosages rapprochés .....	49
3.2 Voies métaboliques .....	58
3.3 Le rendement .....	61
3.4 Traitement des résidus organiques .....	65
CONCLUSION .....	69
BIBLIOGRAPHIE .....	72
ANNEXE A: Volatilisation de l'éthanol .....	77
ANNEXE B: Comparaison entre les filtrats .....	78
ANNEXE C: Dosage fructose .....	80

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Composition de différentes levures séchées (%) .....	8
Tableau 1.2: Composition en acides aminés des levures .....	9
Tableau 1.3: Contenu en vitamines des levures .....	10
Tableau 2.1: Résidus organiques sélectionnés pour les fermentations .....	27
Tableau 2.2: Les expérimentations .....	32
Tableau 2.3: Les méthodes d'analyses employées .....	34
Tableau 3.1: Essai préliminaire .....	37
Tableau 3.2: Effet de la charge organique, fermentation A ... ..	39
Tableau 3.3: Effet de la charge organique, fermentation B .....	39
Tableau 3.4: Effet de la charge organique, fermentation C .....	39
Tableau 3.5: Effet de la charge organique, fermentation D .....	39
Tableau 3.6: Première phase et forte concentration, fermentation E .....	44
Tableau 3.7: Première phase et forte concentration, fermentation F .....	44
Tableau 3.8: Taux de croissance spécifique en fonction du temps, E et F.....	46
Tableau 3.9: Dosages rapprochés, fermentation G .....	49
Tableau 3.10: Dosages rapprochés, fermentation H .....	49
Tableau 3.11: Dosages rapprochés, fermentation I .....	50
Tableau 3.12: Dosages rapprochés, fermentation J .....	50
Tableau 3.13: Taux de croissance spécifique en fonction du temps, G à J .....	54
Tableau 3.14: Voies métaboliques, fermentation K .....	58
Tableau 3.15: Voies métaboliques, fermentation L .....	58
Tableau 3.16: Rendement des fermentations sur le glucose .....	61

Tableau 3.17: Composition du mélange de résidus (% massique) .....	62
Tableau 3.18: Rapport entre le fructose et le glucose .....	63
Tableau 3.19: Rendement des fermentations sur le glucose et le fructose .....	64
Tableau 3.20: DCO initiales et finales des fermentations .....	67
Tableau 3.21: DCO corrigées des fermentations .....	68

### LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Fermenteur complètement mélangé.....	7
Figure 2.1: Fruits et légumes .....	26
Figure 2.2: Autres éléments .....	26
Figure 2.3: Brassage .....	28
Figure 2.4: Fioles après fermentation .....	32
Figure 2.5: Incubateur vue 1 .....	33
Figure 2.6: Incubateur vue 2 .....	33

### LISTE DES GRAPHIQUES

Graphique 3.1: Essai préliminaire .....	37
Graphique 3.2: Effet de charge organique, fermentation A .....	40
Graphique 3.3: Effet de charge organique, fermentation B .....	40
Graphique 3.4: Effet de charge organique, fermentation C .....	41
Graphique 3.5: Effet de charge organique, fermentation D .....	41
Graphique 3.6: Première phase et forte concentration, fermentation E .....	44
Graphique 3.7: Première phase et forte concentration, fermentation F .....	45
Graphique 3.8: Taux de croissance en fonction de [éthanol], fermentation E ....	47



Graphique 3.9: Taux de croissance en fonction de [éthanol], fermentation F ....	47
Graphique 3.10: Courbes de croissance, fermentations E et F .....	48
Graphique 3.11: Dosages rapprochés, fermentation G .....	50
Graphique 3.12: Dosages rapprochés, fermentation H .....	51
Graphique 3.13: Dosages rapprochés, fermentation I .....	51
Graphique 3.14: Dosages rapprochés, fermentation J .....	52
Graphique 3.15: Taux de croissance en fonction de [éthanol], fermentation G ...	54
Graphique 3.16: Taux de croissance en fonction de [éthanol], fermentation H ...	55
Graphique 3.17: Taux de croissance en fonction de [éthanol], fermentation I ....	55
Graphique 3.18: Taux de croissance en fonction de [éthanol], fermentation J ....	56
Graphique 3.19: Taux de croissance en fonction de [éthanol], E à J .....	57
Graphique 3.20: Voies métaboliques, fermentation K .....	59
Graphique 3.21: Voies métaboliques, fermentation L .....	59
Graphique 3.22: DCO en fonction du temps, fermentation préliminaire .....	65
Graphique 3.23: DCO en fonction du temps, fermentations A et B .....	66
Graphique 3.24: DCO en fonction du temps, fermentations C et D .....	66

## **INTRODUCTION**

Il se produit annuellement au Québec plus de 7 millions de tonnes de déchets solides (MEF, 1994). L'enfouissement ou l'incinération de ces déchets coûte cher, plus de trente dollars la tonne en moyenne, et engendre des problèmes environnementaux. Le bureau d'audiences publiques sur l'environnement (BAPE) a recommandé au ministère de l'environnement du Québec d'interdire la mise en décharge de déchets putrescibles d'ici l'an 2003. Également, il recommande qu'au moins 50 % des résidus soient détournés vers les « 3RV » soit le recyclage, le réemploi, la réduction et la valorisation. Il y a donc un besoin réel pour des technologies permettant de supporter les recommandations du BAPE et d'effectuer ce virage vers les 3RV.

Une bonne proportion des déchets produits est de nature organique comme les résidus agricoles et ceux de l'industrie forestière. Selon certains auteurs, la proportion atteint 30 % sur une base massique<sup>1</sup>. Ce type de déchet peut être facilement valorisé. Le meilleur exemple de méthode de valorisation de résidus organiques est le compostage. Il s'agit d'une méthode simple, accessible et largement répandue. Une autre méthode, moins connue, est la production de protéines d'origine unicellulaire. Cette méthode consiste à utiliser la matière organique comme substrat pour la production d'une biomasse microbienne. Cette biomasse possède un contenu très élevé en protéines et en vitamines et peut être utilisée comme supplément alimentaire par les animaux ou par les humains.

L'objectif général du projet de recherche est de valoriser des résidus organiques d'origine alimentaire, principalement des fruits et légumes, en les utilisant comme substrat dans la production d'une biomasse microbienne destinée à l'alimentation animale.

Ces travaux de recherche ont été réalisés dans les laboratoires du CRIQ (Centre de Recherche Industrielle du Québec). Ils ont été rendus possible grâce à une aide financière du fond FCAR-CRIQ.

## CHAPITRE I

### 1.0 REVUE DE LA LITTÉRATURE

Ce chapitre se divise en cinq parties. En premier lieu, il sera question des protéines d'origine unicellulaire. Par la suite, un résumé des travaux préliminaires sera présenté. Suivra une section sur l'effet inhibiteur de l'éthanol ainsi qu'une autre sur les voies métaboliques. Enfin, les hypothèses de recherche seront définies.

#### **1.1 LES PROTÉINES D'ORIGINE UNICELLULAIRE (POU)**

On appelle POU ou protéines d'origine unicellulaire (mieux connue sous le terme anglais SCP ou « single cell proteins »), toute biomasse microbienne destinée à l'alimentation. Il peut s'agir aussi bien d'alimentation humaine que d'alimentation animale. Ce terme, défini au Massachusetts Institute of Technology (MIT), a une valeur psychologique puisqu'il évite toute connotation désagréable avec des termes tels que « bactéries » ou « microbes »<sup>2</sup>.

L'apparition des POU n'est pas récente. En effet, les Aztèques utilisaient déjà, il y a plusieurs siècles, une micro-algue appelée *Spirulina* dans leur alimentation<sup>2</sup>. Dans l'histoire plus récente, des chercheurs allemands ont entrepris d'utiliser des levures comme supplément protéique lors de la première guerre mondiale<sup>2</sup>. Des années 50 jusqu'au début des années 70, les compagnies pétrolières s'intéressèrent à la production de POU à partir de charbon ou de pétrole<sup>3</sup>. Elles croyaient que la production d'une grande variété d'aliments

à partir des hydrocarbures était possible. Les compagnies pétrolières étaient décidées à investir dans ce type de production. Toutefois, l'arrivée de la crise du pétrole a rendu l'utilisation des hydrocarbures comme substrat dans la production de POU hors de prix. Les compagnies pétrolières se sont donc désintéressées de la production des POU<sup>3</sup>. Quelques années plus tard, il y a eu un regain de popularité des POU dans le domaine de la protection de l'environnement<sup>4</sup>. L'idée d'utiliser les déchets organiques comme substrat dans la production de POU permet de régler un problème environnemental tout en obtenant un produit commercialisable.

Lorsque les premiers travaux de recherche sur la production de POU ont débuté, la motivation première était de contrer le problème de sous-alimentation dans le monde. En effet, ce produit constitue une bonne source de protéines et peut être utilisé directement par les humains ou servir pour l'alimentation des animaux d'élevage. Cependant, dans les pays qui, comme le Canada, ne vivent pas de graves problèmes de sous-alimentation, l'utilisation de POU en alimentation humaine est très limitée. On s'y intéresse plutôt comme moyen pour traiter les déchets tout en générant une source de protéines utilisées en alimentation animale<sup>5</sup>.

### **1.1.1 Avantages et désavantages des POU**

Traditionnellement, les protéines alimentaires proviennent des produits de l'élevage ou de l'agriculture. La production de protéines d'origine unicellulaire possède certains avantages par rapport à l'élevage et à l'agriculture<sup>2,3,6</sup>:

- permet de résoudre un problème environnemental ;
- a une croissance rapide en biomasse (50 fois plus rapide que la production bovine) ;
- demande peu d'espace et peu d'eau ;
- est indépendante des conditions climatiques ;
- offre un contenu protéique élevé ;
- génère peu de résidus ;
- permet la modification génétique des micro-organismes.

Toutefois, certaines caractéristiques des POU représentent un désavantage, toujours par rapport à l'élevage et à l'agriculture <sup>2,3,6</sup>:

- peuvent produire des toxines ou autres métabolites nuisibles ;
- possèdent des propriétés physiologiques qui peuvent ne pas convenir à la consommation directe par les humains ;
- présentent un contenu élevé en acides nucléiques (voir 1.1.5.1).

### **1.1.2 Moyens de production des POU**

La production de POU consiste à faire croître des micro-organismes sur un substrat. Afin d'obtenir une production optimale, certains critères se doivent d'être respectés dans la sélection d'un type de micro-organisme et pour faire le choix du substrat. Le contrôle des conditions dans le milieu de culture est également d'une très grande importance. Enfin, le mode d'opération du fermenteur affecte la productivité de la fermentation. Pour terminer cette section, certains traitements nécessaires après la production sont présentés.

#### **1.1.2.1 Choix d'un micro-organisme**

Dans la production de POU, quatre types de micro-organismes sont utilisés. Il s'agit des micro-algues, des bactéries, des levures et des champignons (fungi) filamenteux <sup>3</sup>. Les critères qui doivent guider le choix d'un micro-organisme sont <sup>2</sup>:

- Taux de croissance élevé ;
- Facilité pour la récolte ;
- Bonne résistance aux variations dans les conditions d'opération ;
- Non pathogène ;
- Contenu en protéines élevé.

Les levures sont le type de micro-organisme le plus fréquemment employé <sup>6,7</sup>. Malgré que les levures aient un taux de croissance plus faible que les bactéries, elles sont plus faciles à récolter après la production <sup>7</sup>. De plus, le fait qu'elles croissent dans un milieu acide

diminue de façon importante les risques de contamination par des organismes pathogènes<sup>6</sup>. Les levures jouissent également d'une longue tradition dans la production de pain et de bière et sont beaucoup mieux acceptées par la population. Bien que la levure de boulangerie et de brassage de la bière, *Saccharomyces cerevisiae*, soit disponible en grande quantité, la levure de fourrage, *Candida utilis*, lui est préférée pour la production de POU puisqu'elle est moins sensible aux fortes concentrations de glucose<sup>7</sup>. Il existe une littérature abondante sur l'utilisation de levures pour la production de POU<sup>3,6</sup>. Pour toutes ces raisons, la levure est le type de micro-organisme choisi pour la réalisation des travaux de recherche.

#### 1.1.2.2 Choix du substrat

Plusieurs types de résidus organiques peuvent être utilisés lors de la production des POU; notamment, les résidus agricoles, de l'industrie forestière et des usines de transformation d'aliments. Les trois critères principaux qui servent au choix d'un substrat sont, par ordre d'importance, le prix (normalement nul ou négatif), les frais de transport et la qualité du substrat<sup>2</sup>.

#### 1.1.2.3 Conditions de culture

Les conditions de culture nécessitent un contrôle étroit afin de favoriser la croissance des micro-organismes. Un premier paramètre à contrôler est le rapport Carbone / Azote / Phosphore (C/N/P). En effet, en plus d'une source de carbone, les levures requièrent une source d'azote et de phosphore pour se reproduire. Si un de ces éléments est en quantité insuffisante, il y aura alors limitation de la croissance. Espinosa<sup>8</sup> a déterminé qu'un substrat idéal a un rapport C/N/P de 100 / 5 / 1. Comme les résidus ont souvent un faible contenu en azote, il faudra normalement ajouter des nitrates ou de l'ammoniaque comme source additionnelle d'azote.

Un autre paramètre important à contrôler est la température. Les levures croissent plus rapidement avec l'augmentation de la température mais seulement jusqu'à une température optimale. Le plus souvent, la température utilisée varie entre 30 et 35°C<sup>6</sup>. Dans certains

cas, il est préférable de maintenir le milieu de culture à une température inférieure à 30°C car un taux de croissance trop élevé peut affecter le procédé. Hang<sup>9</sup> a démontré que la température optimale pour la croissance de *Candida utilis* sur des saumures (waste brines) est de 25°C.

Le pH affecte moins les activités biologiques des cellules que la température car ces dernières sont capables de réguler leur concentration interne en ions hydronium. Toutefois, leur rendement énergétique s'en trouve affecté<sup>10</sup>. Le pH du milieu de culture risque également d'affecter la structure et la perméabilité de la membrane cytoplasmique. Normalement, pour la croissance des levures, il doit être maintenu entre 4,0 et 5,5<sup>1.5</sup>.

Un paramètre critique mais parfois difficile à contrôler est la concentration en oxygène dissout. En effet, l'efficacité de l'aération dépend de plusieurs facteurs comme la viscosité, la température, le mode de dispersion de l'oxygène, l'agitation, la taille du fermenteur et le volume de milieu de culture. Pour des fermentations aérobies, le milieu devrait être saturé à 40 % en oxygène<sup>11</sup>.

La concentration en substrat et de certains produits de fermentation, tel l'éthanol, dans le milieu de culture ont un effet majeur sur la croissance des levures et se doivent d'être contrôlées. Ces deux points seront traités plus en détails dans les sections 2.2 et 2.3.

Enfin, certaines levures demandent des composés bioactifs comme la biotine et l'extrait de levures pour la division cellulaire. Lorsque l'aération est adéquate, les besoins en biotine se situent aux environ de 0,25 µg/g de biomasse en base sèche<sup>12</sup> et ceux de l'extrait de levures varient entre 0,1 et 3,0 ng/m<sup>3</sup> de milieu.<sup>13</sup>

#### 1.1.2.4 Le fermenteur

La production de biomasse se fait normalement dans un fermenteur. Un fermenteur est un récipient dans lequel les besoins physiologiques et nutritionnels essentiels pour permettre une culture microbienne sont rencontrés<sup>14</sup>. Pour qu'une fermentation aérobie soit

optimale, l'aération se doit d'être adéquate <sup>15</sup>. Étant donné que le taux de transfert d'oxygène est souvent le facteur limitant, l'objectif premier dans la conception d'un fermenteur aérobie est d'obtenir un taux maximal de transfert d'oxygène avec un minimum de consommation d'énergie. Un type de fermenteur souvent utilisé est le complètement mélangé.

#### Fermenteur complètement mélangé:

Ce type de fermenteur est mélangé mécaniquement et muni de chicanes pour contrecarrer l'effet vortex (fig.1). L'agitation permet de maintenir les conditions de culture homogènes dans le réacteur, aide au transfert de la chaleur et augmente la surface de contact entre la phase liquide et l'air. La performance de ce type de fermenteur, c'est à dire la puissance requise par unité de masse d'oxygène transféré au milieu, diminue avec l'augmentation du volume <sup>16</sup>.

Il existe trois modes d'alimentation pour le fermenteur: l'alimentation en cuvée, en semi-continu ou en continu. L'alimentation en cuvée est plus simple d'opération mais a une productivité plus faible que les deux autres <sup>17</sup>.

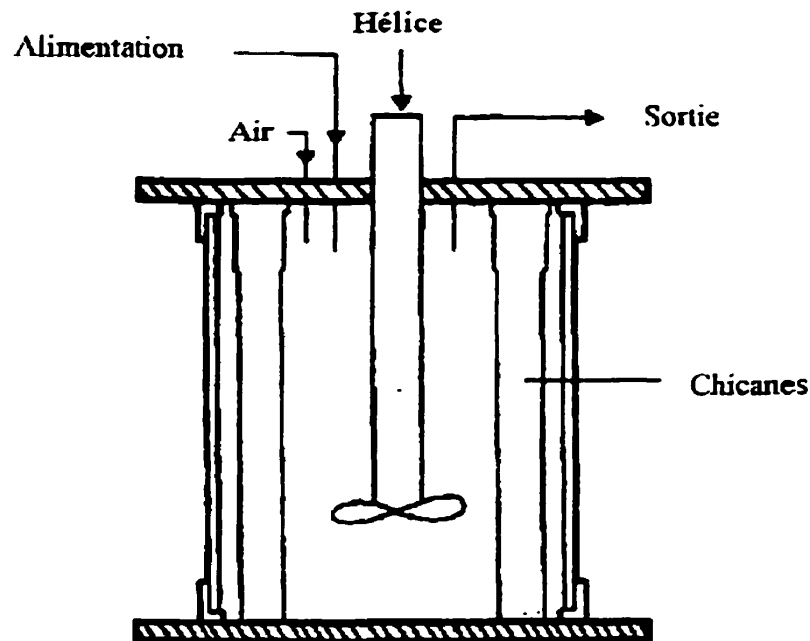


Fig. 1: Fermenteur complètement mélangé



### 1.1.2.5 Récolte et séchage

Après avoir terminé la production, les POU obtenus sont très dilués. En effet, la quantité de matière solide du bouillon de culture varie entre 1 et 5 % seulement. Plusieurs techniques ont été employées pour concentrer le produit. La filtration n'a pas eu un grand succès<sup>3</sup>. De meilleurs résultats ont été obtenus avec la centrifugation multiple. Elle permet d'augmenter la quantité de matière solide jusqu'à 10 ou même 20 %. Le coût pour le recouvrement des cellules par cette méthode est beaucoup plus élevé avec les bactéries qu'avec les levures. Ceci s'explique par leur taille de 0,5 à 2 µm par rapport à 4 à 8 µm pour les levures. Des méthodes telles que la microflottation et la floculation ont aussi été testées<sup>3</sup>. Après avoir été concentré, le produit est soit emmagasiné dans des barils soit séché afin d'obtenir une poudre exempte de toute cellule vivante.

### 1.1.3 La composition des POU

La composition des POU varie en fonction des conditions de production. Les proportions de protéines et de graisses sont fonction du rapport C / N (carbone / azote)<sup>3</sup>. Si l'azote est limité, il y aura une plus grande production de graisse, au détriment de la production de protéines. Le contenu en acides nucléiques, qui est un grave problème en alimentation humaine (voir 1.1.5.1), augmente en fonction du taux de croissance<sup>3</sup>. Le tableau 1.1 présente la composition de certaines levures utilisées comme POU.

**TABLEAU 1.1:** Composition de différentes levures séchées (%) (adapté de 6)

COMPOSANTS	Levure de boulangerie <sup>18</sup>	Saccharomyces cerevisiae <sup>19</sup>	Levure de bière <sup>20</sup>	Autre levure <sup>21</sup>	Autre levure <sup>3</sup>
Protéines brutes	38.0 - 60.0	53.0	-	-	46.9 - 53.1
Protéines vraies	31.0 - 48.0	46.0	48.0	45.0 - 49.0	40.9 - 44.1
Acides nucléiques	7.0 - 12.0	7.0	-	-	6.0 - 12.0
Lipides	4.0 - 10.0	10.0	1.0	4.0 - 7.0	2.0 - 6.0
Hydrates carbonés	25.5 - 35.0	18.0	36.0	26.0 - 36.0	-
Cendres	6.0 - 7.0	-	8.0	5.0 - 10.0	5.0 - 9.5
Eau	5.0 - 8.0	-	7.0	-	-

Ce tableau montre que le contenu en protéines varie entre 31 et 60 %. La variation s'explique en partie par le fait que deux méthodes sont employées pour calculer ce contenu.

Les protéines vraies sont calculées à partir du contenu en acides aminés alors que les protéines brutes le sont à partir du contenu en azote. Cette dernière méthode de calcul, moins précise, tend à surestimer le contenu en protéines. En effet, une partie de l'azote d'une cellule ne se retrouve pas sous forme de protéines. De 10 à 15 % de l'azote se retrouve sous forme de purines et de pyrimidines, des bases d'acides nucléiques, et un autre 10 à 15 % sous des formes telles que le glucosamine, le galactosamine et la choline. Donc, seulement 70 à 80 % de l'azote se retrouvent sous forme de protéines<sup>3</sup>.

### 1.1.3.1 Acides aminés

Le tableau 1.2 présente le profil en acides aminés de différentes levures utilisées comme POU. On constate que les acides aminés soufrés (méthionine et cystine) sont en quantité très faible. Autre donnée intéressante, les POU contiennent de bonnes quantités de lysine et, dans une moindre mesure, de thréonine. Le blé, qui est à la base de l'alimentation d'une grande partie de la population, contient très peu de ces deux acides aminés.

**TABLEAU 1.2:** Composition en acides aminés des levures <sup>(adapté de 6)</sup>  
(g /100 g de protéines vraie)

ACIDES AMINÉS	<i>Torula utilis</i> SES 6	<i>Torula utilis</i> NRRL-Y-1082	<i>Candida utilis</i> IFO-0576	<i>Candida utilis</i> IAM-4220
Lysine	8,52	9,07	8,91	8,71
Histidine	2,03	2,17	2,21	2,15
Arginine	5,01	4,71	5,47	5,29
Acide aspartique	8,65	8,45	8,46	8,92
Thréonine	5,26	4,95	5,34	5,23
Sérine	4,57	4,41	4,76	4,67
Acide glutamique	10,95	10,38	10,67	10,71
Proline	3,12	3,06	3,05	2,91
Glycine	4,27	4,20	4,46	4,38
Alanine	5,28	5,43	5,43	5,34
Cystine	0,20	0,12	0,73	0,41
Valine	5,39	5,51	5,75	5,99
Méthionine	0,57	0,12	1,17	0,99
Isoleucine	4,32	4,42	4,65	4,60
Leucine	6,34	6,75	7,13	7,10
Tyrosine	3,99	3,78	3,99	4,04
Phénylalanine	4,24	4,68	4,10	4,22
Tryptophane	1,26	1,21	1,20	1,30

### 1.1.3.2 Vitamines

Les levures constituent une bonne source de vitamines, plus spécialement celles du groupe B (tableau 1.3).

**TABLEAU 1.3:** Contenu en vitamines des levures ( $\mu\text{g/g}$ ) (adapté de 6)

VITAMINES	Levure de boulangerie	<i>Saccharomices cerevisae</i>	Levure de bière	<i>Candida arborea</i>	<i>Torula utilis</i>
Vitamine B1	9-40	29-90	50-360	32	6-53
Vitamine B2	-	-	36-42	46-69	26-62
Vitamine B6	16-65	-	25-100	0,3	35
A. Panthothénique	180-330	118-198	100	-	86-180
Niacine	29-30	190-585	310-1000	157-580	210-535
Acide folique	15-80	19-35	3	15-19	4-31
Biotine	-	0,5-1,8	-	-	1,1-1,9

### 1.1.4 Valeur nutritive

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer la valeur nutritive des POU. Elles se divisent en deux groupes: les méthodes biologiques (*in vivo*) et les méthodes chimiques (*in vitro*). Aucune de ces méthodes ne donnent, à elle seule, une évaluation adéquate de la valeur nutritive des POU. On doit donc faire appel à plusieurs méthodes et déterminer différents paramètres<sup>6</sup>. Les méthodes biologiques consistent à faire des tests d'alimentation avec des animaux, des humains ou même des micro-organismes. L'animal le plus utilisé est le rat de laboratoire. Voici trois exemples de paramètres déterminés en utilisant cet animal: le ratio d'efficacité des protéines (REP), la digestibilité (D) et la valeur biologique (VB)<sup>6</sup>:

$$\text{REP} = \frac{\text{Gain de poids}}{\text{Nb de gr de POU ingérés}} \quad (1)$$

$$D = \frac{\text{Azote absorbé}}{\text{Azote consommé}} * 100 \quad (2)$$

$$\text{VB} = \frac{\text{Azote retenu} - \text{Azote absorbé} - (\text{AU} - \text{AUE})}{\text{Azote Absorbé}} * 100 \quad (3)$$

où AU = Azote Urinaire et AUE = Azote Urinaire Endogène

Les levures ont une digestibilité de 80 à 95 %. Toutefois, dû à leur déficit en acides aminés soufrés, elles ont une valeur biologique faible. En ajoutant un supplément de méthionine, la valeur biologique des levures s'élève à plus de 86 %<sup>3</sup>.

Les méthodes chimiques sont basées sur l'emploi d'enzymes provenant habituellement du système digestif. Plusieurs méthodes chimiques simulent les conditions physiologiques<sup>6</sup>.

### **1.1.5 Tolérance par les humains**

Il n'y a pas de consensus entre les chercheurs quant à la quantité de POU tolérée par les humains. Certaines études ont détecté des effets néfastes avec des quantités aussi faible que 3 g/j alors que d'autres affirment qu'il est possible de consommer jusqu'à 100 g/j<sup>3</sup>. Ces écarts importants peuvent s'expliquer en partie par les conditions dans lesquelles les POU ont été produites et par le traitement subi par les cellules. Par exemple, il a été suggéré que certaines levures utilisées étaient contaminées avec des agents antimousse<sup>3</sup>. Le cas des interférences psychologiques dues à l'image négative que les gens ont des micro-organismes a aussi été mentionné pour expliquer les écarts de tolérance<sup>3,6</sup>.

#### **1.1.5.1 Acides nucléiques**

Le contenu en acides nucléiques des POU limite leur utilisation en alimentation humaine. En effet, une grande consommation d'acides nucléiques par les humains élève la concentration en acide urique dans le plasma. Il y a alors un risque de précipitation d'urée dans les tissus et les articulations, symptôme analogue à la maladie de la goutte<sup>3</sup>. Les POU contiennent entre 8 à 25 g d'acides nucléiques pour 100 g de protéines, comparativement 0,15 à 5,7 g dans les aliments plus traditionnels<sup>3</sup>.

La consommation d'acides nucléiques par les animaux d'élevage n'occasionne pas cette problématique. En effet, la plupart des mammifères possèdent une enzyme, l'uricase, qui permet de transformer l'acide urique en allantoin, un métabolite facilement éliminé. Les humains ont perdu l'usage de cette enzyme<sup>3</sup>. C'est une des raisons pour laquelle les POU sont plus fréquemment utilisées en alimentation animale.

Selon les recommandations de la WHO (Organisation Mondiale de la Santé), la limite maximale pour la consommation humaine d'acides nucléiques est de 2 g / jour. Il est donc important de bien contrôler les quantités ingérées chaque jour<sup>3</sup>.

### **1.1.6 Autres traitements**

Certaines propriétés des protéines d'origine unicellulaire limitent leur utilisation<sup>3</sup> :

- Paroi cellulaire résistante ;
- Contenu élevé en acides nucléiques ;
- Texture gluante ;
- Couleur foncée ;
- Goût et odeur désagréables.

Différents traitements existent pour rendre les POU plus comestibles. Ces traitements permettent de briser la paroi cellulaire, de façon à rendre les protéines cytoplasmiques plus disponibles, ou alors favorisent l'extraction de ces protéines. Des traitements à la chaleur, aux produits chimiques, aux enzymes ou simplement mécaniques sont utilisés<sup>6</sup>.

## **1.2 TRAVAUX PRÉLIMINAIRES**

En 1995, le Centre de Recherche Industrielle du Québec (CRIQ) a entrepris un projet de recherche sur la production de biomasse à partir de résidus organiques. Voici un bref résumé des travaux réalisés avant le mois de janvier 1997.

### **1.2.1 Étude sur la disponibilité des résidus**

En premier lieu, une étude a été réalisée afin d'identifier les sources de résidus organiques ayant un potentiel pour la production de biomasse. L'étude a démontré qu'il y a environ 1 million de tonnes de résidus générés chaque année au Québec, répondant à ce critère. Plus de 50 % de ceux-ci se retrouvent dans la région de Montréal. Le type de résidus retrouvés en plus grande partie, sont de loin, les déchets de commerce de fruits et légumes frais. On retrouve également des résidus d'industries de transformation de fruits et légumes, des

rejets de boulangeries et de préparation de mets et plats cuisinés <sup>22</sup>.

## 1.2.2 Essais de fermentations <sup>1</sup>

Dans le but de mesurer le potentiel de valorisation des déchets organiques répertoriés, trois séries d'essais de fermentations ont été réalisées.

### 1.2.2.1 Première série d'essais

Dans cette série d'essais, le substrat utilisé était un mélange de résidus de fruits et de légumes provenant d'un marché d'alimentation. Il n'y a pas eu de stérilisation du milieu de culture afin de permettre une inoculation avec une souche connue. La flore endogène a plutôt été sollicitée. Le produit obtenu n'était pas stabilisé et son innocuité n'était pas garanti.

### 1.2.2.2 Deuxième série d'essais

Dans la deuxième série d'essais, une modification a été apportée à la chaîne de traitement. En effet, les résidus ont été séparés en deux phases : phase solide et phase liquide. Éventuellement, les deux phases seront traitées individuellement. Dans cette série d'essais, seule la phase liquide a été utilisée pour faire la préparation des milieux de culture. Il n'y a pas eu de traitement pour la phase solide. Suite aux résultats de la première série d'essais, il a été décidé de stériliser le milieu de culture et d'inoculer avec une souche de micro-organisme connue. Une revue de la littérature sur le sujet a permis d'identifier la levure comme étant le meilleur choix de micro-organisme (voir 1.1.2.1). Trois souches de levures ont été testées. Les deux premières, *Candida utilis* ATCC 9950 et *Candida utilis* ATCC 9255 <sup>23</sup>, ont été sélectionnées à partir de la littérature et la troisième était une souche indigène préalablement isolée. Un choix d'ingrédients et d'un mode de préparation pour le substrat a été fait. Il était composé à 84 % de fruits et de légumes (voir 2.2.1).

---

<sup>1</sup> Le terme « fermentation » est devenu, au fil du temps, très peu spécifique. Il a un sens différent pour le microbiologiste, le biochimiste, l'ingénieur ou l'industriel <sup>49</sup>. Dans cette étude, le terme « fermentation » est général et se rapporte au procédé de production des levures. Il ne signifie pas que le milieu est anaérobie ni que le métabolisme est nécessairement fermentaire.

Des performances intéressantes ont été obtenues avec les trois souches étudiées. La production de biomasse variait entre 7,0 et 9,5 g/L, pour 72 heures de fermentation. De plus, une partie importante de la matière organique a pu être dégradée. En effet, la DCO a été réduite de 63 %.

### 1.2.2.3 Troisième série d'essais

Cette série d'essais visait à augmenter la production de biomasse. Pour ce faire, il a été envisagé d'utiliser la cellulose contenue dans la phase solide des résidus. En effet, une fois hydrolysée, la cellulose permet d'obtenir du glucose. Ce glucose additionnel peut ensuite être ajouté au milieu de culture afin d'augmenter la quantité de matière organique facilement assimilable disponible pour la production de biomasse. Cette série d'essais se résumait donc à mesurer l'effet de l'augmentation de la concentration en glucose dans le milieu de culture sur la production de biomasse.

Les résultats n'ont pas été ceux attendus. En effet, il n'y a pas eu d'augmentation significative de la production de biomasse malgré l'augmentation de la concentration en glucose. Cependant, un suivi sur l'éthanol a indiqué une augmentation de la concentration de ce produit au cours de la fermentation.

La présente étude tentera d'expliquer les résultats obtenus lors de cette troisième série d'essais. Plus précisément, de déterminer s'il y a un phénomène d'inhibition par l'éthanol.

## 1.3 EFFET INHIBITEUR DE L'ÉTHANOL

Il y a longtemps que l'effet inhibiteur de l'éthanol sur la croissance et la fermentation de certaines levures est connue<sup>24, 25, 26, 27</sup>. Dans la littérature, il y a pratiquement consensus sur le fait que cette inhibition est non compétitive<sup>28,29,30,31,32</sup>. Cela signifie que l'éthanol affecte le taux spécifique maximal de croissance et de fermentation mais pas l'affinité au substrat (voir 1.3.2).

La tolérance d'une levure à l'éthanol varie en fonction des conditions de culture. Elle augmente avec<sup>24</sup> :

- la présence d'oxygène (elle joue le rôle de facteur de croissance),
- une température optimale,
- une alimentation en mode séquentiel par rapport au mode en cuvée,
- une source d'azote suffisante,
- des levures en phase exponentielle de croissance.

### 1.3.1 Méthodes d'évaluations

Il n'y a pas de méthode universelle et absolue pour déterminer la tolérance à l'éthanol d'une levure<sup>24</sup>. La méthode la plus employée, à cause de sa simplicité, consiste à déterminer la concentration d'éthanol qui inhibe complètement la croissance de la levure dans une fermentation en cuvée<sup>33</sup>. Ceci revient à définir la tolérance à l'éthanol par son effet sur la croissance des levures. Il existe d'autres façons de définir cette tolérance ; par exemple, par l'effet de l'éthanol sur l'activité fermentaire<sup>34</sup> ou sur la viabilité des cellules<sup>24,33</sup>. Enfin, une autre méthode d'évaluation définit la tolérance comme étant la concentration maximale d'éthanol que peut produire une levure<sup>35</sup>. Pour toutes ces méthodes d'évaluation, il est important de travailler dans des conditions de culture standard puisque la tolérance des levures change en fonction des conditions de cultures.

### 1.3.2 Mécanisme de la toxicité de l'éthanol

Dans le mécanisme de toxicité de l'éthanol, il existe deux concentrations d'éthanol limites. Il s'agit de la concentration seuil et de la concentration  $\mu = 0$ . La concentration seuil est la concentration minimale que doit atteindre l'éthanol avant qu'un effet inhibiteur ne puisse être observé. La concentration  $\mu = 0$  est la concentration à laquelle la croissance des levures s'arrête complètement. Les valeurs rapportées dans la littérature vont de 2 à 4 % (20 à 40 g/L) pour la concentration seuil et de 7 à 11 % (70 à 110 g/L) pour la concentration  $\mu = 0$ <sup>24</sup>.



Même si la croissance de micro-organismes est un phénomène très complexe, le taux de croissance spécifique  $\mu$  est normalement exprimé comme une fonction de la concentration du substrat limitant S par une relation de type Monod<sup>36</sup>:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_m + S} \quad (4)$$

où  $\mu_{\max}$  est le taux de croissance spécifique maximal et  $K_m$  la constante de Monod. Comme mentionné précédemment l'éthanol n'affecte que la valeur de  $\mu_{\max}$  (inhibition non compétitive). Plusieurs chercheurs ont travaillé à déterminer des relations entre  $\mu_i$ , le taux de croissance spécifique maximal en présence d'une concentration  $i$  d'éthanol, et  $\mu_{\max}$ , le taux de croissance spécifique maximal en absence d'éthanol, en fonction de la concentration en éthanol. Lorsque la concentration est inférieure à la concentration seuil, il n'y a pas d'inhibition et  $\mu_i$  est toujours égal à  $\mu_{\max}$ . Lorsque la concentration est plus grande ou égale à la concentration  $\mu = 0$ ,  $\mu_i$  est égal à 0. Lorsque la concentration en éthanol se situe entre la concentration seuil et la concentration  $\mu = 0$ , la valeur de  $\mu_i$  est inversement proportionnelle à la concentration en éthanol. Différents types de relations sont rapportés dans la littérature:

Linéaire<sup>37</sup> : (5)

$$\mu_i = \mu_{\max} \left( 1 - \frac{p_i}{p_m} \right)$$

Exponentiel<sup>27</sup> : (6)

$$\mu_i = \mu_{\max} e^{-k_2 p_i}$$

Hyperbolique<sup>38</sup> : (7)

$$\mu_i = \mu_{\max} \left( \frac{k_{1p}}{p_i + k_{1p}} \right)$$

$P_i$	=	Concentration en éthanol
$P_m$	=	Concentration maximal en éthanol
$K_{1p}$	=	Constante d'inhibition du produit sur le taux de croissance spécifique
$k_2$	=	Constante empirique

Il est très important de noter que dans ces recherches l'effet de l'éthanol ajouté au milieu a été étudié. En général, pratiquement aucune inhibition n'est observée à des concentrations inférieures à 2 %. Cependant, l'inhibition peut survenir à des concentrations beaucoup plus faibles si l'éthanol est produit de façon endogène, par les levures. Par exemple, une concentration de 0,5 % d'éthanol produit peut réduire le taux de croissance de *S. cerevisiae* ATCC 4126 de 50 %<sup>39</sup>. De plus, l'éthanol produit par *S. cerevisiae* UG5 serait 20 à 25 fois plus toxique que l'éthanol ajouté au milieu<sup>38</sup>.

Plusieurs chercheurs ont soutenu que cette plus grande toxicité était due à une accumulation d'éthanol à l'intérieur des cellules. Toutefois, il a été démontré que la membrane cytoplasmique des levures est très perméable à l'éthanol, autant pour entrer dans la cellule que pour en sortir<sup>40, 41</sup>. L'éthanol produit ne devrait donc pas être plus toxique que l'éthanol ajouté. Une autre explication possible est l'effet osmotique dû à une forte concentration en substrat. En effet, lorsqu'il y a production d'éthanol par les levures, normalement, la concentration en substrat est élevée. Il a été démontré que l'inhibition par l'éthanol est plus prononcée lorsque la concentration en substrat est élevée<sup>25, 38, 42</sup>. Néanmoins, les raisons exactes de cette différence de toxicité entre l'éthanol ajouté au milieu et l'éthanol produit par les levures ne sont pas encore bien connues<sup>25, 38, 43</sup>.

### 1.3.3 Site primaire de la toxicité de l'éthanol

Le site primaire de la toxicité de l'éthanol sur les levures est la membrane cytoplasmique. Cette membrane a pour fonction de contrôler le transport de nutriments à l'intérieur de la cellule et l'excrétion des déchets vers l'extérieur. L'éthanol aurait pour effet de diminuer la fluidité de la membrane. Il a été démontré<sup>44, 45</sup> que l'augmentation de la proportion d'acide gras non-saturés et de stérol dans la membrane augmente la tolérance de la levure à

l'éthanol. Ces deux composés agiraient sur la membrane en augmentant sa fluidité, venant ainsi contrecarrer l'effet de l'éthanol.

### 1.3.4 Toxicité et calcul de la valeur de $\mu$

Le calcul de la valeur du taux de croissance spécifique  $\mu$ , peut permettre de déterminer s'il y a un effet inhibiteur au cours d'une fermentation. Dans l'équation de Monod (équation 1), lorsque S est beaucoup plus grand que  $K_m$ ,  $\mu$  devient égal à  $\mu_{max}$  et est une valeur constante. Il s'agit de la situation qui est rencontrée pendant la phase de croissance exponentielle des levures, lors d'une fermentation en cuvée. Pendant cette phase, la biomasse, ou le nombre de cellules, double régulièrement dans le temps. La croissance du nombre de cellules peut être décrite de la façon suivante <sup>46</sup> :

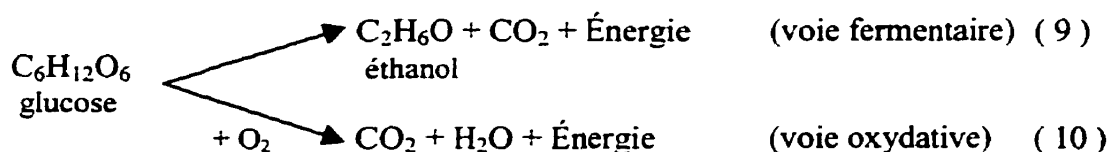
$$\mu = \frac{\ln(x/x_0)}{(t-t_{lat})} \quad (8)$$

où x est la concentration en biomasse au temps t et  $x_0$  la concentration en biomasse au temps  $t_{lat}$ . Le temps  $t_{lat}$  correspond à la durée de la phase de latence et marque le début de la phase exponentielle. Cette dernière équation permet de calculer la valeur de  $\mu$  en fonction de la concentration en biomasse et du temps.

La valeur de  $\mu$  demeure constante sur toute la durée de la phase exponentielle. Normalement, cette phase s'étend de la fin de la phase de latence jusqu'à épuisement du substrat. Toutefois, l'accumulation d'un produit inhibiteur, comme l'éthanol, fera chuter le taux de croissance plus tôt. Une baisse de la valeur de  $\mu$  avant épuisement du substrat implique un phénomène d'inhibition.

## 1.4 LES VOIES MÉTABOLIQUES

Il existe deux voies métaboliques qui peuvent être empruntées par les levures pour dégrader des sucres tel que le glucose: la voie fermentaire et la voie oxydative.



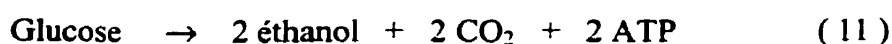
Au cours des fermentations qui ont été réalisées dans le cadre des travaux préliminaires, une production d'éthanol a été observée. Ceci implique un métabolisme fermentaire. Ce type de métabolisme offre un rendement plutôt faible, de l'ordre de 0,10 à 0,17 gramme de biomasse produite par gramme de glucose consommé<sup>47</sup>. D'autre part, il est connu que le métabolisme oxydatif permet d'atteindre des rendements de 0,5 g de biomasse / g de glucose<sup>47</sup>. Cette seconde voie métabolique serait donc beaucoup plus intéressante pour faire la production de POU.

Le métabolisme des levures varie selon les espèces. Il dépend de la nature de la source carbonée et des conditions de culture. Comme toutes les levures sont capables de croître sur du glucose pour seule source de carbone<sup>48</sup>, les aspects fondamentaux du métabolisme des levures ont été établis à partir d'études sur l'utilisation de ce sucre. Les deux paramètres principaux qui orientent le métabolisme sont la concentration en glucose dans le milieu de culture et l'apport en oxygène<sup>49</sup>.

#### 1.4.1 Le métabolisme fermentaire

Le métabolisme fermentaire peut être défini comme un ensemble de réactions assurant la croissance des levures sans l'intervention de l'oxygène. Ces réactions produisent du CO<sub>2</sub>, de l'éthanol et des produits secondaires. La transformation du glucose en éthanol par la voie d'EMBDEN-MEYERHOFF est à la base du métabolisme fermentaire. Cette fermentation alcoolique fournit l'énergie nécessaire à la synthèse de la biomasse et au maintien de l'activité physiologique des cellules<sup>50</sup>.

Le bilan de la réaction est le suivant<sup>6</sup> :

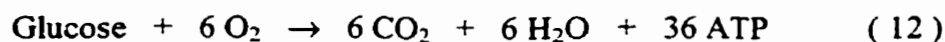


Cette réaction permet de produire de l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine triphosphate), à raison de 2 moles pour chaque mole de glucose.

Le rendement en biomasse avec cette voie métabolique est de 0,10 gramme par gramme de glucose consommé en anaérobiose stricte. Il atteint à 0,17 g/g lorsque la culture est aérée<sup>47</sup>. Ce dernier type de fermentation est souvent appelé fermentation aérobie.

#### 1.4.2 Le métabolisme oxydatif

Pasteur fut le premier à observer que l'air stimule la production de la biomasse et élimine la production d'éthanol<sup>51</sup>. En présence d'oxygène, l'oxydation complète du glucose produit du CO<sub>2</sub> et de l'eau :



Potentiellement, cette réaction peut produire jusqu'à 36 moles d'ATP par mole de glucose dégradée. Toutefois, la production est souvent inférieure à celle-ci et varie selon les espèces. Le rendement en biomasse avec un métabolisme oxydatif est de l'ordre de 0,5 gramme par gramme de glucose consommé. Ce rendement est trois fois plus élevé que celui de la fermentation aérobie et cinq fois supérieur à l'anaérobiose stricte<sup>47</sup>.

Le contrôle du métabolisme est donc d'une grande importance pour favoriser la production de biomasse.

#### 1.4.3 Régulation du métabolisme du glucose

Il a déjà été mentionné que l'apport en oxygène et la concentration en glucose dans le milieu de culture oriente le métabolisme des levures. L'effet régulateur de ces deux paramètres se décrit par des concepts tels que l'effet Pasteur, l'effet Crabtree et la capacité respiratoire limite.

### Effet Pasteur

En 1872, en faisant une étude sur la bière, Louis Pasteur observe qu'en présence d'oxygène, les levures perdent une partie de leur caractère fermentaire<sup>51</sup>. Il a interprété ce phénomène comme une inhibition de la fermentation par la respiration<sup>52</sup>. Le phénomène s'appelle aujourd'hui l'effet Pasteur.

### Effet Crabtree

Crabtree, en 1929, étudie le métabolisme des sucres chez les cellules animales. Il observe que la respiration n'exerce pas d'effet inhibiteur sur la fermentation, mais qu'à l'inverse, la respiration est inhibée par l'activité fermentaire des cellules<sup>53</sup>. Suite à cette découverte, des travaux ont permis de définir l'effet Crabtree comme l'inhibition d'une voie énergétique, la respiration, par une autre voie énergétique, la fermentation. Il s'agit d'un phénomène contradictoire à l'effet Pasteur. Il est parfois nommé « contre-effet » Pasteur.

Une étude similaire sur les levures a été réalisée par DeDeken en 1966<sup>52</sup>. L'auteur montre que plusieurs types de levures présentent le même comportement que les cellules animales étudiées par Crabtree. Il a observé que lorsqu'une souche de *S.cerevisiae* utilise du glucose ou du fructose comme source de carbone en présence d'air, le métabolisme est principalement fermentaire. Ce serait le résultat d'une répression de la synthèse d'enzymes du métabolisme respiratoire dû à une vitesse de fermentation élevée.

### Capacité respiratoire limite

Les études sur la régulation du métabolisme du glucose donnent souvent une vision statique du phénomène. La seule présence du glucose est le facteur régulateur. Il a été démontré qu'en culture continue, la régulation du métabolisme dépend du taux de croissance<sup>54, 55, 56</sup>. Lorsque le taux de croissance est faible, le métabolisme est purement oxydatif et la production d'éthanol n'apparaît qu'à partir d'un taux de dilution donné, appelé taux de dilution critique. Pour des taux de dilution supérieurs à cette valeur critique, l'activité de certaines enzymes et la consommation spécifique d'oxygène diminuent parallèlement à l'augmentation de la vitesse spécifique de production d'éthanol.

L'étude de Barford et Hall <sup>57</sup> a démontré que la répression de la respiration n'est qu'un phénomène transitoire <sup>57</sup>. Elle disparaît lorsque les levures sont cultivées en métabolisme oxydatif sur de longues périodes due à l'adaptation des cellules. La vitesse spécifique de consommation d'oxygène augmente alors proportionnellement au taux de croissance jusqu'à un maximum puis devient constante et indépendante du taux de croissance. Sur la base de ces travaux, un modèle pour expliquer la régulation de la source de carbone chez *Saccharomyces cerevisiae* est proposé et le concept de capacité respiratoire limite est introduit <sup>47</sup>.

Avec ce concept, le métabolisme fermentaire ne s'explique pas par une répression ou une inhibition de la respiration mais par une capacité limite du microorganisme à dégrader la source de carbone de façon purement oxydative. Pour un flux de substrat inférieur à une valeur critique, la dégradation devient totalement oxydative à condition que l'oxygène nécessaire soit disponible. Pour un flux supérieur à la valeur critique, la capacité respiratoire n'est pas suffisante ; seule une partie est oxydée et l'excédent est métabolisé par voie fermentaire.

#### **1.4.4 Classification des levures**

L'effet de l'oxygène et de la concentration en glucose sur les levures varie en fonction des espèces. Une classification de ces micro-organismes a été proposée par Käppeli en 1986 <sup>47</sup> et elle est basée sur leur réponse, en terme de voie métabolique utilisée, face à la disponibilité du glucose et de l'oxygène.

1. Levures purement oxydatives : Elles utilisent toujours la voie oxydative et ne produisent jamais d'éthanol.
2. Levures sensibles à l'oxygène : Elles utilisent la voie fermentaire, donc produisent de l'éthanol, seulement si elles sont limitées en oxygène. Autrement, elles utilisent la voie oxydative.

3. Levures sensibles au glucose: Elles utilisent la voie oxydative seulement avec de faibles concentrations de glucose et ce, si l'apport en oxygène est suffisant. Lorsque le glucose est en excès ou s'il n'y a pas suffisamment d'oxygène, elles utilisent la voie fermentaire.

## 1.5 OBJECTIF ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

L'objectif général de ce projet de recherche est de valoriser des résidus organiques d'origine alimentaire, principalement des fruits et légumes, en les utilisant comme substrat dans la production d'une biomasse microbienne destinée à l'alimentation animale. De manière à rentabiliser cette valorisation, il est important de maximiser la production de biomasse. L'objectif spécifique du projet de recherche est d'établir l'effet de la charge organique sur la croissance des levures lors de la fermentation des résidus organiques.

Dans la section sur les travaux préliminaires, il est souligné qu'une augmentation de la concentration de glucose dans le substrat ne permet pas d'augmenter de façon substantielle la production de biomasse. Aussi, une augmentation de la concentration en éthanol dans le milieu de culture est mesurée. Étant donné que ce produit peut avoir un effet inhibiteur sur la croissance des levures (voir 1.3), une première hypothèse de recherche est posée :

La croissance de *Candida utilis* ATCC 9255 sur un substrat, dont la composition et la préparation est décrite en 3.2.1, est inhibée par sa propre production d'éthanol.

La production d'éthanol qui a été observée témoigne d'un métabolisme fermentaire. Comme le métabolisme oxydatif, en plus d'éviter la production d'éthanol, permet d'augmenter la production de biomasse, une deuxième hypothèse de recherche est donc posée :

Le métabolisme fermentaire observé lors de la fermentation de résidus organiques, décrit en 3.2.1, est dû à une concentration trop élevée en substrat.



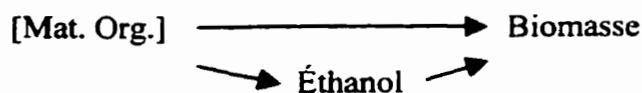
## CHAPITRE II

### 2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le deuxième chapitre se divise en trois parties. En premier lieu, la stratégie de recherche employée pour vérifier les hypothèses de recherches sera présentée. Par la suite, il y aura une description du matériel employé au cours des travaux de recherches. Enfin, les méthodes d'analyses utilisées seront présentées.

#### **2.1 STRATÉGIE DE RECHERCHE**

La stratégie de recherche employée dans cette étude consiste, dans un premier temps, à faire une série de fermentations en faisant varier la concentration en matière organique dans le milieu de culture. L'objectif étant de déterminer son effet sur la production de biomasse et d'éthanol. Il est aussi possible de mesurer l'effet de la concentration en éthanol sur le taux de croissance des micro-organismes. Ceci permettra de déterminer si ce produit a un effet inhibiteur sur la croissance des levures.



Dans un deuxième temps, deux fermentations seront réalisées sur des milieux de culture ayant de faibles concentrations en matières organiques. L'objectif est de vérifier s'il est

possible d'éliminer de cette façon la voie métabolique fermentaire au profit de la voie oxydative.

Un filtrat préparé principalement à partir de fruits et de légumes (voir 2.2.1), a été utilisé comme base pour les différents milieux de culture. Afin de varier la concentration en matière organique dans le milieu de culture, soit du glucose est ajouté pour l'augmenter soit le milieu est dilué pour l'abaisser.

## **2.2 MATÉRIEL**

Dans cette section, les étapes de préparation du filtrat, servant à la préparation du milieu de culture, et de l'inoculum seront présentées. Ceci permettra, par la suite, de décrire les étapes de préparation des fermentations.

### **2.2.1 Filtrat**

Le substrat utilisé au cours des fermentations est un mélange de résidus organiques. Le choix des éléments de ce mélange a été fait de façon à reproduire autant que possible ce qui a été identifié dans l'étude sur la disponibilité des résidus<sup>22</sup>. Pour représenter les déchets de commerces de fruits et de légumes frais, les rejets de fruits et de légumes d'un marché d'alimentation ont été utilisés. Pour reproduire les résidus d'industries de transformation de fruits et légumes, des pelures de carottes et de pommes de terres ont été incluses dans le mélange. Les rejets de boulangeries ont été simulés avec de la pâte à pain. Enfin, du chou et des restes de poulet ont été incorporés au mélange en guise de mets et plats cuisinés. Le tableau 2.1 indique la provenance des différents éléments ainsi que leur proportion dans le mélange. Il est à constater que le mélange est constitué à 87 % de fruits et légumes, le reste étant de la pâte à pain (11%) et du poulet (2 %). Les figures 2.1 et 2.2 présentent les éléments du mélange



**Figure 2.1 : Fruits et légumes**



**Figure 2.2 : Autres éléments**

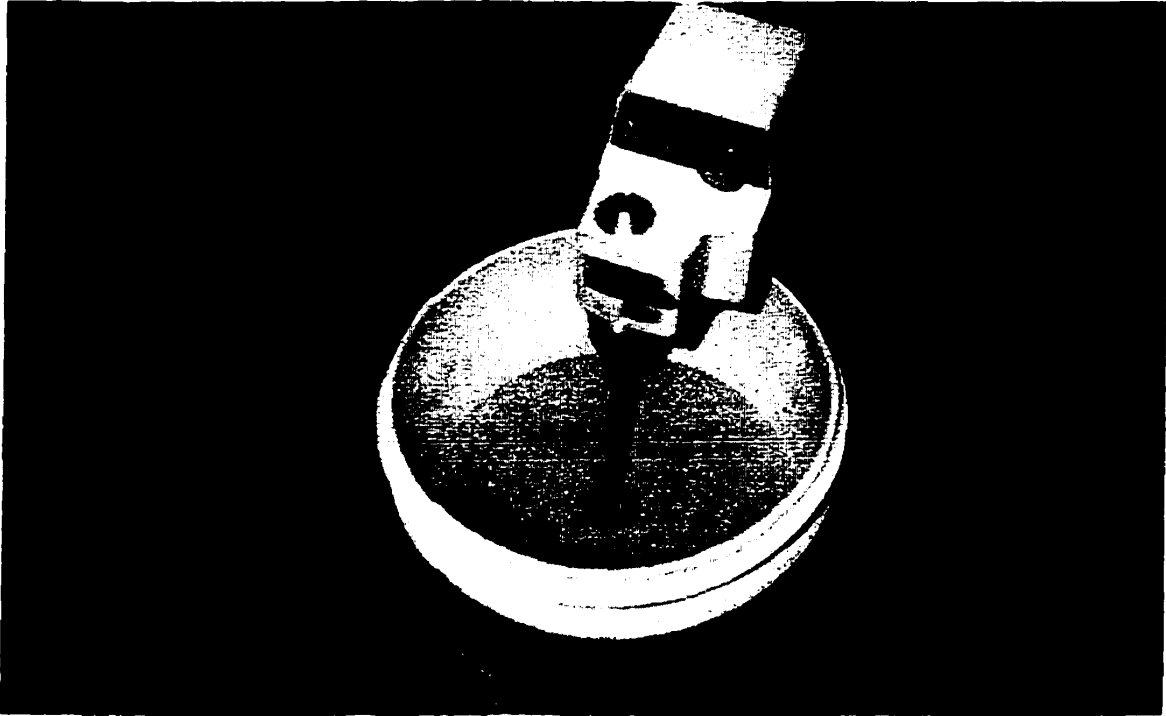
**Tableau 2.1: Résidus organiques sélectionnés pour les fermentations**

Intrant	Provenance	% du mélange
Fruits et légumes	Supermarché Métro 707 Boul. Charest Ouest, Québec	63
Pelures de carottes et pommes de terres	Agro-Noël St-Pierre, île d'Orléans	22
Pâte à pain blanc Weston	Supermarché Métro 707 Boul. Charest Ouest. Québec	11
Choux	Idem	2
Os de poulet	Idem	2

Dans les essais réalisés au cours des travaux préliminaires, la production de biomasse était plus grande lorsque seule la phase liquide des résidus était utilisée comme substrat. Une méthode de préparation d'un filtrat, c'est-à-dire la phase liquide des résidus, a donc été mise au point. Elle se divise en trois étapes: broyage, mise en solution, filtration et centrifugation.

**Broyage :** À l'aide d'un couteau de cuisine, les intrants sont coupés en cubes d'environ deux à trois cm d'arête. Par la suite, ces cubes sont broyés dans un hache-viande Moulinex HV6.

**Mise en solution :** Une fois broyés, les ingrédients sont dilués à 50% avec de l'eau du robinet (Ville de Ste-Foy). Le pH est ajusté à 4,1 plus ou moins 0,1 avec de l'acide sulfurique 18 N. Il s'agit d'un pH optimal pour la croissance de la levure. Ensuite, pour favoriser la mise en solution d'un maximum de matière organique, le mélange est brassé pendant une heure avec un malaxeur (série 20, modèle 700-5410 de Barnant) à force 5 (figure 2.3).



**Figure 2.3 : Brassage**

**Filtration et centrifugation :** Le mélange est filtré sur du coton fromage (VWR<sup>®</sup> certifié classe 1000, 100 % coton, 46\*92 cm) en utilisant deux épaisseurs simple. Ensuite, il est centrifugé à 5000 rpm pendant 20 minutes (Damon/IEC division, DPR- 6000). Après la centrifugation, le mélange est filtré à nouveau sur du coton fromage pour enlever, autant que possible, la pellicule d'huile et de graisses.

Le filtrat ainsi obtenu a été mélangé dans un seau pour assurer une bonne homogénéité. Il a été entreposé dans des bouteilles de plastiques de deux litres et congelé de façon à éviter toute dégradation. Lorsque nécessaire le filtrat a été décongelé dans un bain d'eau tiède sur une période de quatre à cinq heures. Des mesures de DCO ont été faites au début des fermentations pour s'assurer que le filtrat n'avait subi aucune dégradation.

La première préparation de filtrat avait un volume total de 22 litres. Elle a été utilisée dans les cinq premières séries de fermentations. Une deuxième préparation de 15 litres a été

faite pour mener la sixième série de fermentations. Dans cette dernière série d'essais, un mélange 50-50 des deux préparations de filtrat a été utilisé.

### **2.2.2 Souche et inoculum**

Le choix de la levure comme type de micro-organisme a été fait suite à une revue de la littérature réalisée au cours des travaux préliminaires<sup>22</sup>. La souche de levure utilisée est *Candida Utilis* ATCC 9255. Il s'agit de la souche ayant produit la plus grande quantité de biomasse au cours des travaux préliminaires.

Dans une première étape, la pureté de la souche a été vérifiée sur un plat de Pétri. Par la suite, la souche a été repiquée dans des tubes de gélose inclinée de milieu YM modifié (des laboratoires DIFCO, Bacto® YM Broth, formule par litre : 3g de Bacto yeast extract, 3g de Bacto malt extract, 5g de Bacto peptone et 10g de Bacto dextrose. Modification : ajout de 10g de D-Glucose monohydrate en poudre de A&C). Ces tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

Pour préparer l'inoculum, une préfermentation est effectuée dans des fioles (erlenmeyers) de 250 ml. Dans chaque fiole, un volume de 100 ml de milieu YM modifié est stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes en mode humide (AMSCO 2021 Gravity, Eagle series). Un volume supplémentaire de deux ou trois millilitres est stérilisé. Ce volume supplémentaire est introduit dans un tube de gélose inclinée et la souche est remise en suspension. Un volume de 0,75 ml de cette suspension estensemencée dans chacune des fioles et elles sont incubées à 26°C, avec une agitation de 225 rpm, pendant environ 36 heures (Incubator shaker Modèle G25 de New-Brunswick Scientific Co.). Un maximum de 3 fioles peuvent êtreensemencées avec un tube de gélose. Étant donné les pertes par évaporation pendant la stérilisation, chaque fiole permet de préparer environ 97 ml d'inoculum.

### **2.2.3 Les fermentations**

Les essais de fermentation ont été réalisés dans des fioles de 250 ml (erlenmeyer). Cette méthode a l'avantage d'être simple, rapide et peu coûteuse. Cependant, elle souffre de

certains désavantages face à l'utilisation de fermenteurs. En effet, le fermenteur permet un meilleur contrôle sur l'aération et sur le pH et est aussi plus flexible sur le mode d'alimentation. En effet, il peut fonctionner aussi bien en cuvée, en semi-continue ou en continue. La fermentation en fioles implique une alimentation en cuvée ; ce qui signifie que la concentration en substrat ira en diminuant et celle de la biomasse et des produits, s'il y a lieu, ira en augmentant tout au long de la culture. Cependant, la méthode en fiole permet de réaliser plusieurs essais à la fois.

Dans la préparation du milieu de culture, il faut s'assurer d'une source suffisante en azote et en phosphore pour les levures. Pour ce faire, 7 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et 2 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sont ajoutés au filtrat. L'ajustement de la concentration en matière organique dans le milieu de culture se fait en ajoutant du glucose (D-Glucose monohydrate en poudre de A&C), pour augmenter la concentration, ou en procédant à des dilutions avec de l'eau déminéralisée, pour la diminuer.

La préparation du milieu de culture se fait en cinq étapes :

1. Le filtrat est décongelé et le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sont ajoutés. Un agitateur magnétique est utilisé pour favoriser la dissolution de ces deux sels ainsi que l'homogénéisation du milieu de culture jusqu'à ce qu'il soit transféré dans les fioles.
2. Le glucose nécessaire pour les milieux concentrés en matière organique est pesé et introduit dans les fioles correspondantes.
3. À l'aide d'une pompe (MasterFlex precision dispenser, modèle No. 7528-00), le milieu de culture préparé en 1 est transféré dans les fioles préparées pour des milieux non-modifiés et dans celles préparées pour les milieux concentrés (ces dernières contiennent déjà du glucose).
4. Le filtrat est dilué et transféré dans les fioles correspondantes.

5. Les fioles sont bouchées (Bouchons DISPO pour ouverture de 35 à 45 mm de CanLab) et recouvertes avec du papier d'aluminium avant d'être stérilisées à l'autoclave (AMSCO 2021 Gravity, Eagle series) pendant 15 minutes en mode humide.

Dans toutes ces fioles, le volume de filtrat transféré est de 93 ml. En considérant les pertes occasionnées par la stérilisation (estimé à 3 ml), le volume final des milieux de culture est de 90 ml. Ces milieux sont conservés à 4°C pour un maximum de trois jours afin d'éviter tout risque de contamination.

Lorsque les fioles contenant les milieux de culture sont prêtes et que la pré-fermentation pour la préparation de l'inoculum arrive à échéance, les fermentations peuvent être démarrées. Pour ce faire, il faut procéder à l'inoculation des fioles. Pour s'assurer d'une bonne homogénéité, toutes les fioles d'inoculum sont regroupées dans un erlenmeyer de 500 ou 1000 ml et avant chaque prélèvement, l'erlenmeyer est agité vigoureusement. Un volume de 10 ml d'inoculum, soit 10 % du volume total de 100 ml, est pipeté et ensemencé dans chaque fiole.

Lorsque l'ensemencement est terminé, les fioles sont placées dans l'incubateur (fig. 2.5 et 2.6) à une température de 26°C, avec une agitation de 225 rpm ce qui marque le début de la fermentation. Cette agitation permet l'aération.

Au total, il y a eu six séries de fermentation comprenant entre une et quatre fermentations réalisées en parallèle (tableau 2.2). Dans chacune des fermentations, il y a eu deux fioles de préparées pour chacun des dosages, de façon à obtenir des duplicatas. La fréquence des dosages variait entre 2 et 24 heures. Les deux fioles étaient retirées de l'incubateur au moment du dosage et il se faisait à même ces fioles. Le dosage de la biomasse se faisait immédiatement. Par la suite, une partie du bouillon de culture était filtré sur un filtre Millipore de 0,45 µm. Du filtrat recueilli, 2 ml était congelé pour permettre le dosage ultérieur du glucose et de l'éthanol sur HPLC. Un volume d'environ 20 ml de ce même filtrat était acidifié et conservé à 4°C et servait à faire une DCO dans les jours qui suivaient la fermentation. Les échantillons pour le dosage de la DBO<sub>5</sub>, le COT, l'azote et le

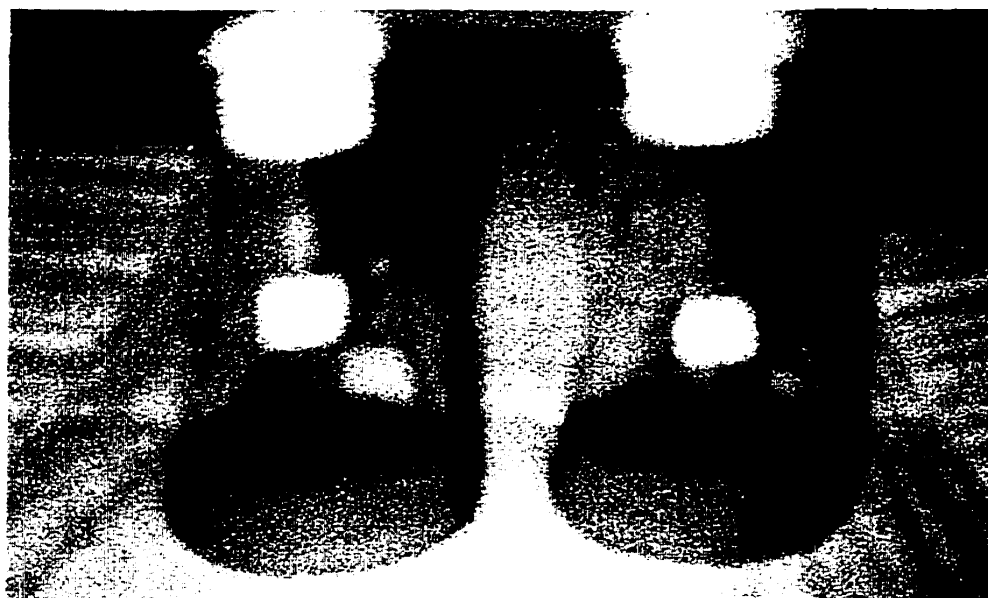


phosphore étaient tous, lorsqu'il y avait lieu, préparés avec ce filtrat.

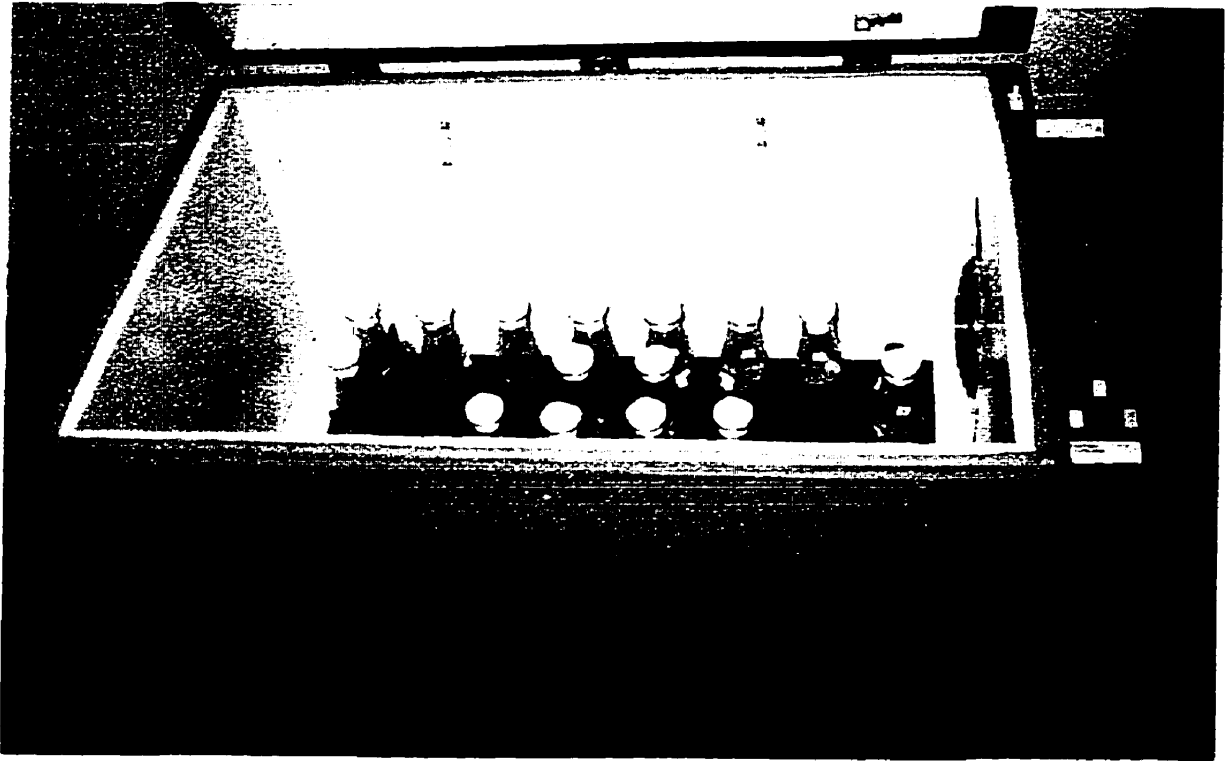
**Tableau 2.2:** Les expérimentations

Numéro	Nombre de fermentations	Objectifs
1	1	Se familiariser avec les méthodes et comparer les résultats avec ceux des travaux préliminaires.
2	4	Déterminer l'effet d'une variation de la charge organique.
3	4	Étudier l'effet d'une alimentation en plusieurs étapes.
4	2	Investiguer les 24 premières heures de fermentation et connaître l'effet d'une plus forte concentration en glucose.
5	2	Déterminer si une baisse importante de la concentration en glucose permet d'éliminer la voie métabolique fermentaire.
6	4	Définir la courbe de croissance avec plus de précision et déterminer la durée de la phase de latence.

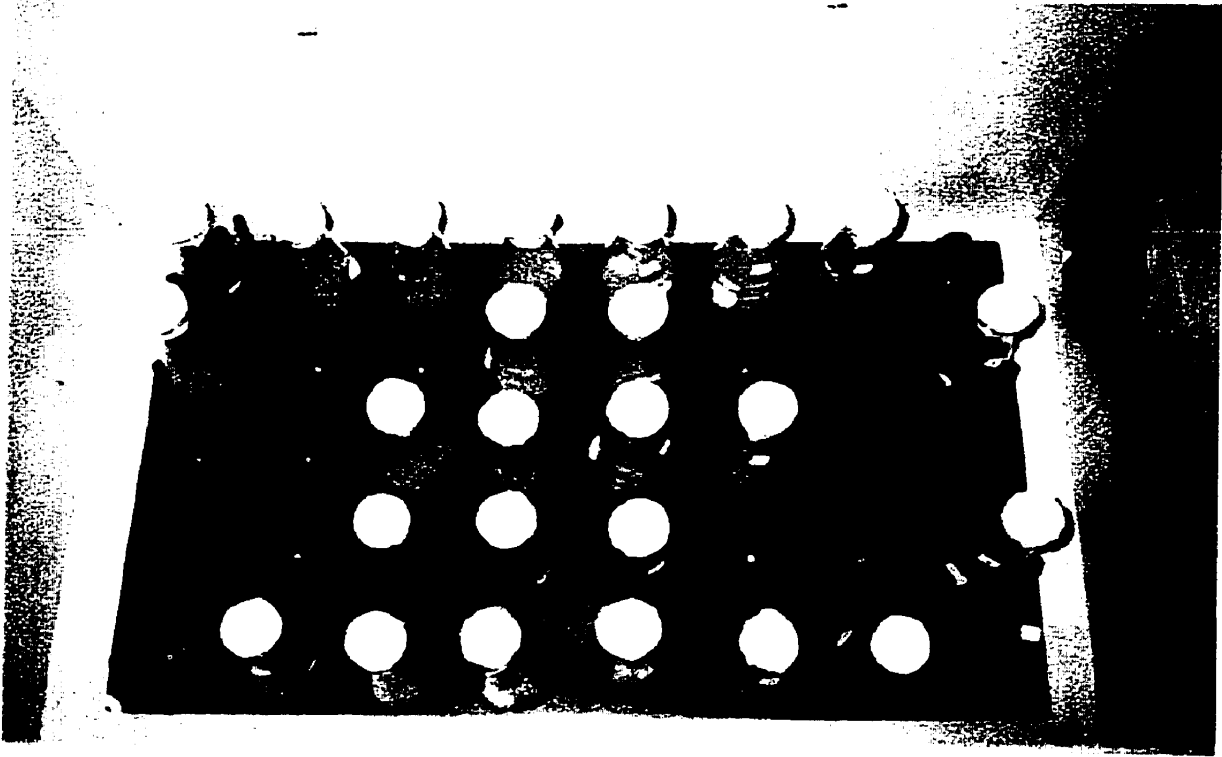
La figure 2.4 montre un exemple de fioles à la fin d'une fermentation. Sur les figures 2.5 et 2.6, le fermenteur est représenté.



**Figure 2.4 :** fioles après fermentation



**Figure 2.5 : Incubateur vue 1**



**Figure 2.6 : Incubateur vue 2**

## 2.3 MÉTHODES

Les méthodes d'analyses employées au cours de cette étude sont résumées dans le tableau 2.3 .

**Tableau 2.3:** Les méthodes d'analyses employées

PARAMÈTRE MESURÉ	MÉTHODES EMPLOYÉES	MATÉRIEL
Biomasse	Poids secs	Filtre Millipore type HA 0,45 µm, entonnoir 47 mm
Éthanol, glucose	Chromatographie liquide	HPLC Waters 600 <sup>E</sup> Colonne HPX-87P 300 * 7,8 mm Phase mobile: eau 0,6 ml/min., 85°C
Matière organique	DCO DBO <sub>5</sub> COT	CRIQ 1996 <sup>58. 63</sup> CRIQ 1996 <sup>59. 63</sup> TOC-500, SHIMADZU
Azote	Azote total	CRIQ 1996 <sup>60. 63</sup>
Phosphore	Phosphore total	CRIQ 1996 <sup>61. 64</sup>
Concentration minimale Inhibitrice d'éthanol et de glucose	MIC	CRIQ 1995 <sup>62</sup>

La méthode du poids sec consiste à filtrer un volume de 10 ml de bouillon de culture sur un filtre pré-pesé de 0,45 µm. Par la suite, il est séché pendant 24 heures à 105°C et pesé de nouveau. Par différence de poids, connaissant le volume de l'échantillon, il est possible de calculer la concentration en biomasse.

Les méthodes d'analyse pour la DCO (demande chimique en oxygène), la DBO<sub>5</sub> (demande biologique en oxygène, cinq jours) ainsi que l'Azote totale sont basées sur les méthodes du « Standard methods for the examination of water and waste water » <sup>63</sup>. Elles ont été adaptées par le CRIQ en 1996.

La méthode MIC consiste à mettre du milieu YM modifié (voir 2.2.2) dans des tubes de verre stériles et d'ajouter un volume donné du produit à tester (éthanol ou glucose). Une série de dilutions sont préparées de façon à obtenir des concentrations de plus en plus faibles du produit à tester. Les tubes sont inoculés et incubés pendant 16 à 20 heures. Les tubes dont le milieu est demeuré clair, donnent un résultat positif au test de toxicité. Les tubes dont le milieu est devenu brouillé indiquent que la concentration du produit testé n'est pas toxique aux micro-organismes. La concentration minimale inhibitrice est la concentration la plus faible du produit ayant donné un résultat positif.

Au cours des quatre premières fermentations, la concentration en matière organique dans le milieu de culture était mesurée avec chacune des trois méthodes présentées dans le tableau (DCO, DBO<sub>5</sub>, COT ). Dans les fermentations suivantes, pour des raisons pratiques, seule la DCO a été employée.

## **CHAPITRE III**

### **3.0 RÉSULTATS – DISCUSSION**

La présentation des résultats se fait en quatre parties. D'abord, les résultats associés à la première hypothèse de recherche sont regroupés. Il y est question de l'effet inhibiteur de l'éthanol. Suivent les résultats se rapportant à la deuxième hypothèse de recherche portant sur les voies métaboliques. Par la suite, le rendement des fermentations est étudié et, enfin, dans la dernière partie, le traitement des résidus organiques est évalué.

#### **3.1 EFFET INHIBITEUR DE L'ÉTHANOL**

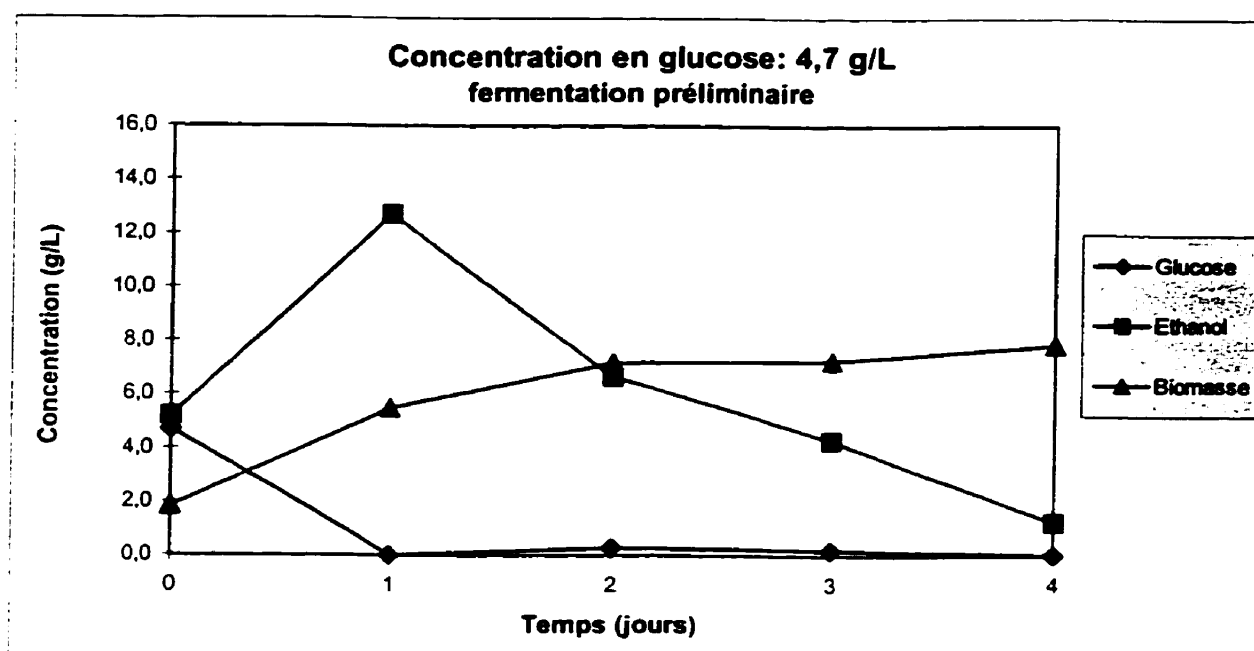
Afin de vérifier la première hypothèse de recherche, quatre séries de fermentations ont été réalisées. Il s'agit de déterminer si l'éthanol entraîne une chute du taux de croissance des levures avant épuisement du substrat.

##### **3.1.1 Essai préliminaire**

La première fermentation (la première série ne comprend qu'une seule fermentation) a été réalisée dans le but de comparer les résultats obtenus avec ceux des travaux préliminaires. Cette fermentation a été réalisée avec un milieu de culture non modifié, ayant une concentration de 4,7 g/L de glucose au départ. Les résultats des mesures de concentrations en glucose, en biomasse et en éthanol se retrouvent au tableau 3.1. Les courbes de croissance des levures, de consommation du glucose et de production d'éthanol sont présentées par le graphique 3.1.

**Tableau 3.1: Essai préliminaire**

Temps (jours)	Glucose (g/L)	Biomasse (g/L)	Éthanol (g/L)
0	4,7	1,84	5,2
1	0,0	5,49	12,7
2	0,3	7,19	6,7
3	0,2	7,24	4,3
4	0,0	7,84	1,2

**Graphique 3.1: Essai préliminaire**

La lecture de ces résultats permet de constater que le milieu de culture préparé est moins concentré en glucose et plus concentré en éthanol qu'il ne l'était lors des travaux préliminaires. En effet, il ne contient que 4,7 g/L de glucose comparativement à 8,0 g/L lors des travaux préliminaires et 5,2 g/L d'éthanol par rapport à 2,3 g/L. Il semble y avoir eu une pré-fermentation du glucose pendant la préparation du filtrat. Ce sujet sera traité plus en détails en 3.1.4.

Le graphique 3.1 indique une croissance relativement forte des levures au cours des 24 premières heures, accompagnée d'une production d'éthanol. De plus, pendant cette même période de temps, tout le glucose a été épuisé. Par la suite, il y a une croissance plus faible et disparition de l'éthanol. Il semble y avoir une croissance sur le glucose avec production d'éthanol en début de fermentation suivie d'une croissance plus faible sur l'éthanol après épuisement du glucose.

Étant donné la volatilité de l'éthanol, deux essais ont été réalisés pour s'assurer que sa disparition n'était pas due à de l'évaporation (annexe A). Ces essais ont démontré que l'évaporation était négligeable.

Le mode de croissance décrit par le graphique 3.1 a souvent été rapporté dans la littérature, notamment avec des souches de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>45, 46</sup>. Pendant la première phase de la fermentation, la voie métabolique fermentaire domine malgré la présence d'oxygène. Par la suite, lorsque le glucose est éliminé, l'éthanol est oxydé. Ce comportement s'explique par l'effet Crabtree ou par la capacité respiratoire limitée, selon les auteurs (voir 1.4.3). Ce mode de croissance en deux phases avait déjà été rencontré lors des travaux préliminaires. Pour la suite de l'étude, l'effet inhibiteur de l'éthanol sera considéré seulement dans la première phase de la fermentation, lorsque la croissance se fait sur le glucose. En effet, la croissance sur l'éthanol de la deuxième partie est de peu d'intérêt pour ce projet puisqu'en plus d'être une phase de croissance lente, elle découle d'un métabolisme fermentaire. Ce métabolisme doit justement être minimisé car il ne favorise pas la production de biomasse.

### **3.1.2 Effet de la charge organique**

La deuxième série de fermentations vise à déterminer l'effet d'une variation de la charge organique dans le milieu de culture sur la croissance des levures et sur la production d'éthanol. Quatre niveaux de concentrations en glucose ont été employés :

Fermentation A,	milieu dilué:	1,9 g/L de glucose
Fermentation B,	milieu non-modifié:	4,5 g/L de glucose
Fermentation C,	milieu concentré:	15,0 g/L de glucose
Fermentation D,	milieu concentré:	25,4 g/L de glucose

Les résultats sont présentés sur les tableaux et graphiques 3.2, 3.3, 3.4 et 3.5.

**Tableau 3.2:** Effet de la charge organique, fermentation A (g/L)

Temps (j)	Glucose	Biomasse	Éthanol
0	1,9	0,94	2,3
1	0,0	4,20	1,9
2	0,0	4,90	0,2
3	0,3	4,34	0,0
4	0,2	4,36	0,0

**Tableau 3.3:** Effet de la charge organique, fermentation B (g/L)

Temps (j)	Glucose	Biomasse	Éthanol
0	4,5	1,32	3,7
1	0,4	5,58	5,9
2	0,3	6,36	3,3
3	0,1	7,99	0,7
4	0,2	8,13	0,0

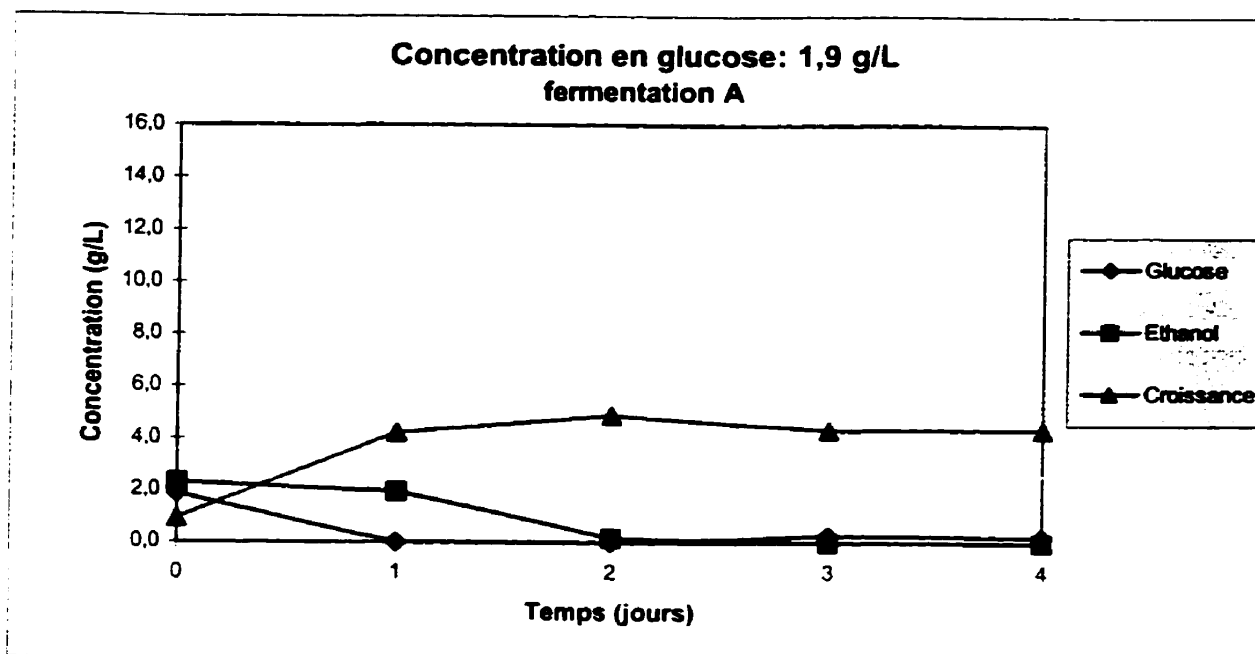
**Tableau 3.4:** Effet de la charge organique, fermentation C (g/L)

Temps (j)	Glucose	Biomasse	Éthanol
0	15,0	1,30	4,7
1	0,0	6,31	10,2
2	0,0	7,29	8,5
3	0,0	7,34	6,3
4	0,0	9,02	3,0

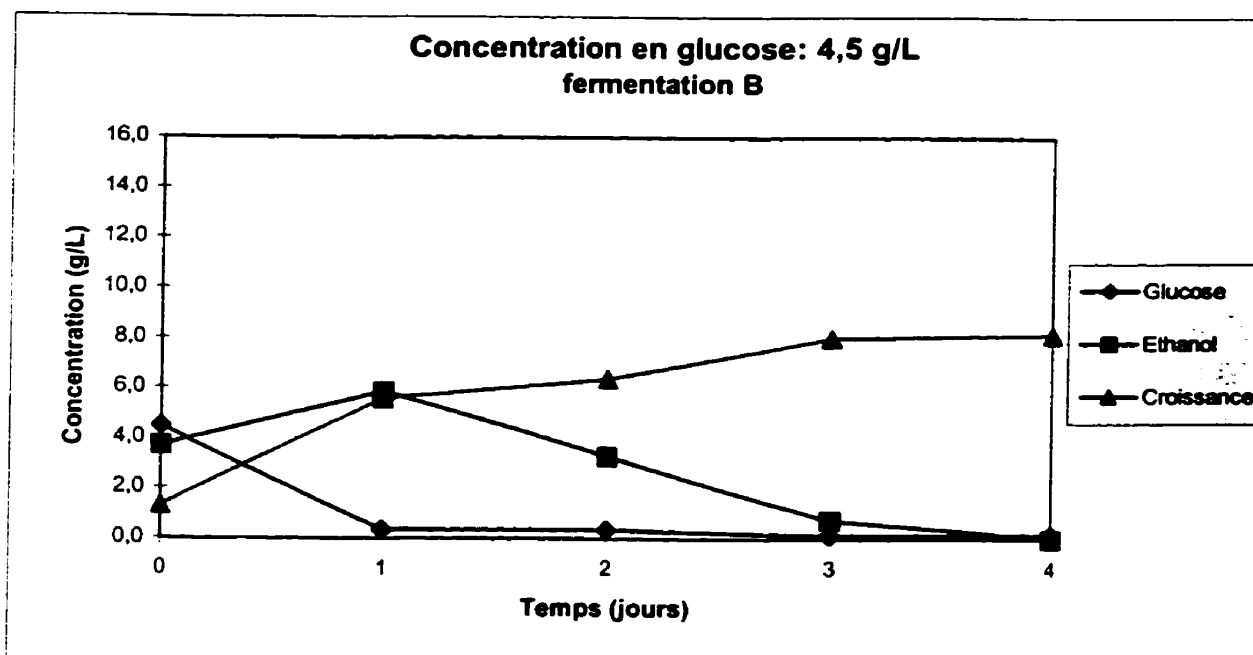
**Tableau 3.5:** Effet de la charge organique, fermentation D (g/L)

Temps (j)	Glucose	Biomasse	Éthanol
0	25,4	1,33	4,2
1	0,0	5,77	15,8
2	0,0	6,90	13,1
3	0,0	7,99	10,0
4	0,0	8,76	8,4

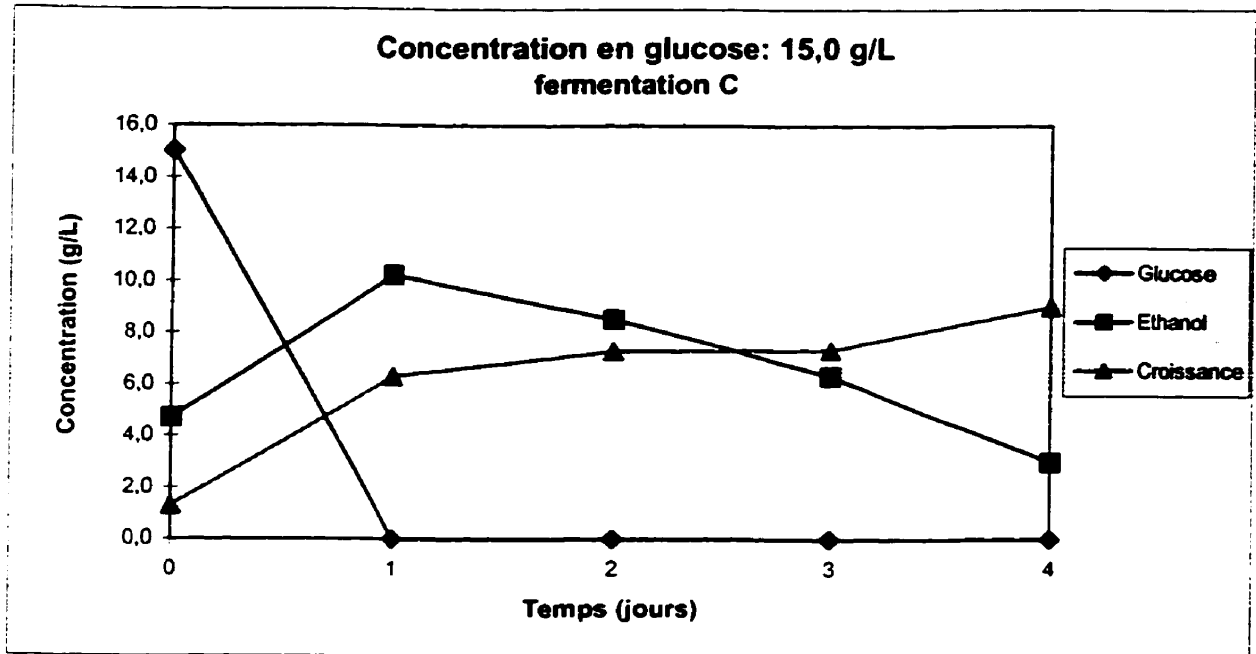




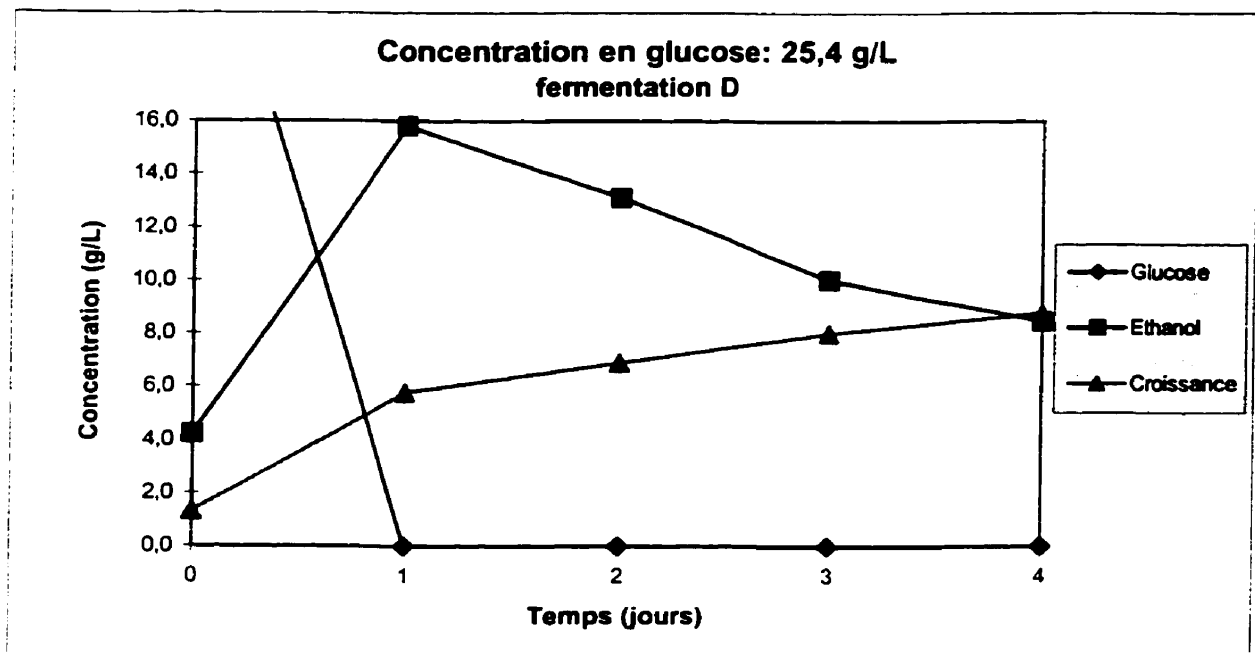
**Graphique 3.2:** Effet de la charge organique, fermentation A



**Graphique 3.3:** Effet de la charge organique, fermentation B



**Graphique 3.4:** Effet de la charge organique, fermentation C



**Graphique 3.5:** Effet de la charge organique, fermentation D

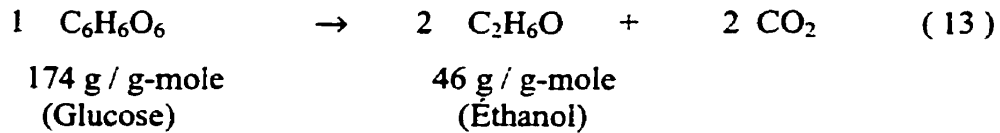
La croissance en deux phases qui a été observée sur le graphique 3.1 se retrouve clairement sur les graphiques 3.3, 3.4, 3.5; ça ne semble toutefois pas être le cas sur le graphique 3.2. En effet, ce dernier graphique ne montre aucune production d'éthanol. Dans la deuxième partie de ce chapitre (voir section 3.2), avec des dosages d'éthanol réalisés à des intervalles plus rapprochés que 24 heures, il sera démontré que cette fermentation se fait également en deux phases.

La fermentation A a une concentration en glucose au départ qui est 58 % plus faible que dans la fermentation B, 1,9 vs 4,5 g/L. Cette baisse amène une réduction de la production finale de biomasse de 50 %. En effet, la fermentation A a eu une production finale de 3,4 g/L comparativement à 6,8 g/L pour la fermentation B. Un fait à noter : la croissance est nulle au-delà de 2 jours pour la fermentation A, alors qu'elle se poursuit jusqu'à la fin, soit quatre jours, pour la fermentation B.

L'augmentation de la concentration de glucose a permis de produire un peu plus de biomasse. En effet, il y a eu une augmentation de la production de l'ordre de 10 % dans les fermentations C et D par rapport à B. Étonnamment, l'augmentation est plus importante avec 15,0 g/L de glucose (fermentation C, 11 % d'augmentation) qu'avec 25,4 g/L de glucose (fermentation D, 9% d'augmentation). Ceci pourrait s'expliquer par la concentration résiduelle d'éthanol plus élevée à la fin de la fermentation D. Elle est de 8,4 par rapport à 3,0 g/L pour la fermentation C. Comme l'éthanol sert de substrat aux levures dans la deuxième phase de la fermentation, lorsque le glucose est épuisé, le potentiel de production de biomasse est plus grand à la fin de la fermentation D. Une fermentation plus longue permettrait aux levures d'utiliser l'éthanol résiduel pour poursuivre leur croissance.

La production d'éthanol semble être directement proportionnelle à la quantité de glucose ajouté. Dans la fermentation C, avec un ajout de 10 g/L de glucose, la concentration maximale d'éthanol mesurée est de 10,2 g/L. Il s'agit d'une augmentation de 4,3 g/L par rapport à la fermentation B où il n'y a pas eu de glucose ajouté. Dans la fermentation D, pour un ajout de 20 g/L de glucose, la concentration maximale en éthanol atteint 15,8 g/L, soit 9,9 g/L de plus que dans la fermentation B. Il y a donc dans le premier cas 0,43 g/L

d'éthanol produit pour 1,00 g/L de glucose ajouté et dans le deuxième cas, 0,49 g/L. Étant donné que les dosages ne s'effectuaient qu'une fois toutes les 24 heures, il est probable que ces valeurs soient sous estimées. Cet éthanol provient de la dégradation du glucose par voie fermentaire. La dégradation d'une mole de glucose selon cette voie génère deux moles d'éthanol :



Si tout le glucose était dégradé par voie fermentaire, il y aurait 0,53 g d'éthanol produit par gramme de glucose dégradé. Comme les valeurs obtenues dans les fermentations C et D se rapprochent de cette valeur, on peut penser que presque tout le glucose ajouté est métabolisé par voie fermentaire.

Dans toutes ces fermentations, le glucose est consommé en moins de 24 heures et ce pour des concentrations initiales variant entre 1,9 et 25,4 g/L. L'épuisement du glucose signifie la fin de la première phase de croissance. Comme il n'y a eu aucun dosage pendant ces 24 premières heures, il n'est donc pas possible de déterminer s'il y a une inhibition de la croissance des levures pendant cette phase.

### 3.1.3 Première phase de croissance et forte concentration en glucose

Cette série d'expérimentations avait pour objectifs d'effectuer des mesures pendant la première phase de fermentations et de connaître l'effet d'une plus forte concentration en glucose dans le substrat de départ. Deux fermentations ont été réalisées :

Fermentation E,	milieu concentré:	13,0 g/L de glucose
Fermentation F,	milieu très concentré :	54,3 g/L de glucose

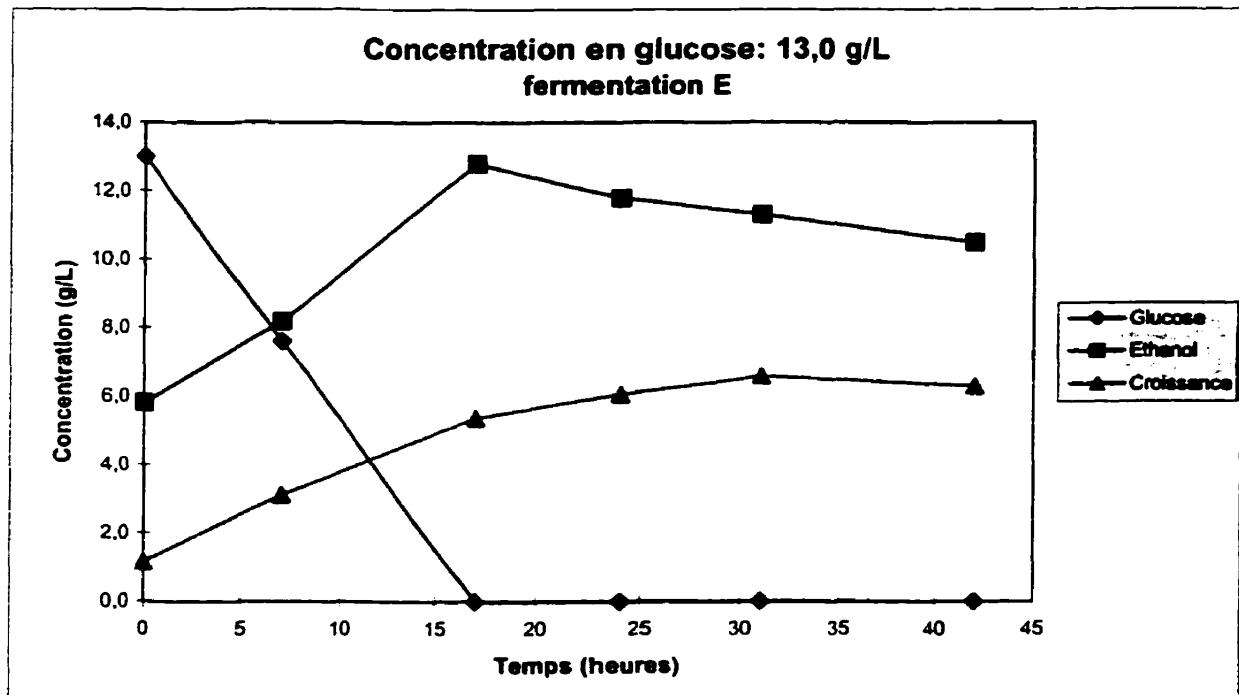
Les résultats des mesures de concentrations ainsi que les différentes courbes obtenues se retrouvent sur les tableaux et graphiques 3.6 et 3.7.

**Tableau 3.6:** Première phase et forte concentration, fermentation E (g/L)

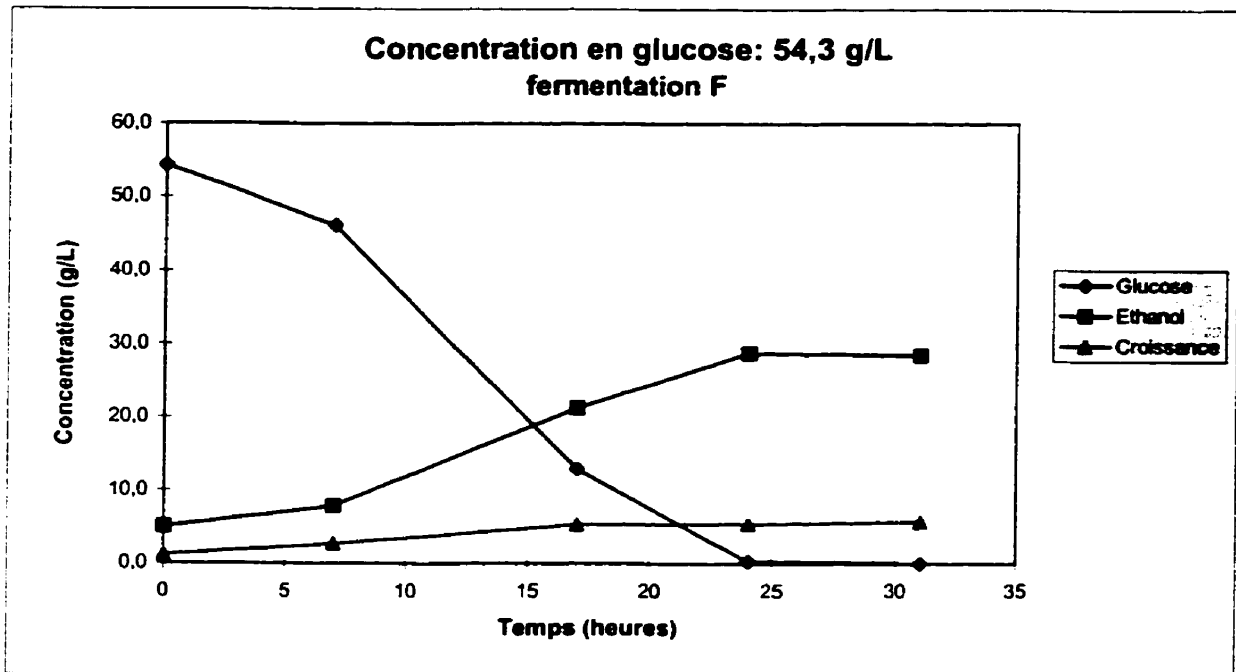
Temps (h)	Glucose	Biomasse	Éthanol
0	13,0	1,17	5,8
7	7,6	3,11	8,2
17	0,0	5,37	12,8
24	0,0	6,06	11,8
31	0,0	6,59	11,3
42	0,0	6,30	10,5

**Tableau 3.7:** Première phase et forte concentration, fermentation E (g/L)

Temps (h)	Glucose	Biomasse	Éthanol
0	54,3	1,17	5,0
7	46,1	2,71	7,9
17	12,9	5,37	21,3
24	0,3	5,46	28,8
31	0,0	5,72	28,5
42	-	-	-



**Graphique 3.6 :** Première phase et forte concentration, fermentation E



**Graphique 3.7:** Première phase et forte concentration, fermentation F

Dans la fermentation E, tout le glucose est consommé en un peu moins de 17 heures et la concentration en éthanol atteint un maximum de 12,8 g/L. Lorsque que la quantité de glucose dans le filtrat est quatre fois plus grande, comme dans la fermentation F, la consommation s'échelonne sur un peu plus de 24 heures et la concentration en éthanol atteint 28,8 g/L.

Ces fermentations ont permis d'obtenir quelques dosages dans la première phase de croissance. Il est donc possible de procéder à des calculs du taux de croissance spécifique, ( $\mu$ ). Pour ce faire, il faut d'abord déterminer la durée de la phase de latence ( $t_{lat}$ ) ainsi que la concentration en biomasse à la fin de cette phase ( $x_0$ ). Toutefois, le nombre de points sur la courbe de croissance est insuffisant pour permettre de faire une estimation de la durée de la phase de latence. Ainsi, pour fin de calculs, la durée de cette phase est supposée nulle. La concentration en biomasse  $x_0$  sera donc égale à la concentration initiale. Voici un

exemple de calcul utilisant l'équation présentée en 1.3.4 et les données du tableau 3.6, après sept heures de fermentation :

$$\mu = \frac{\ln(x/x_0)}{(t - t_{lat})} \quad (\text{équation 8})$$

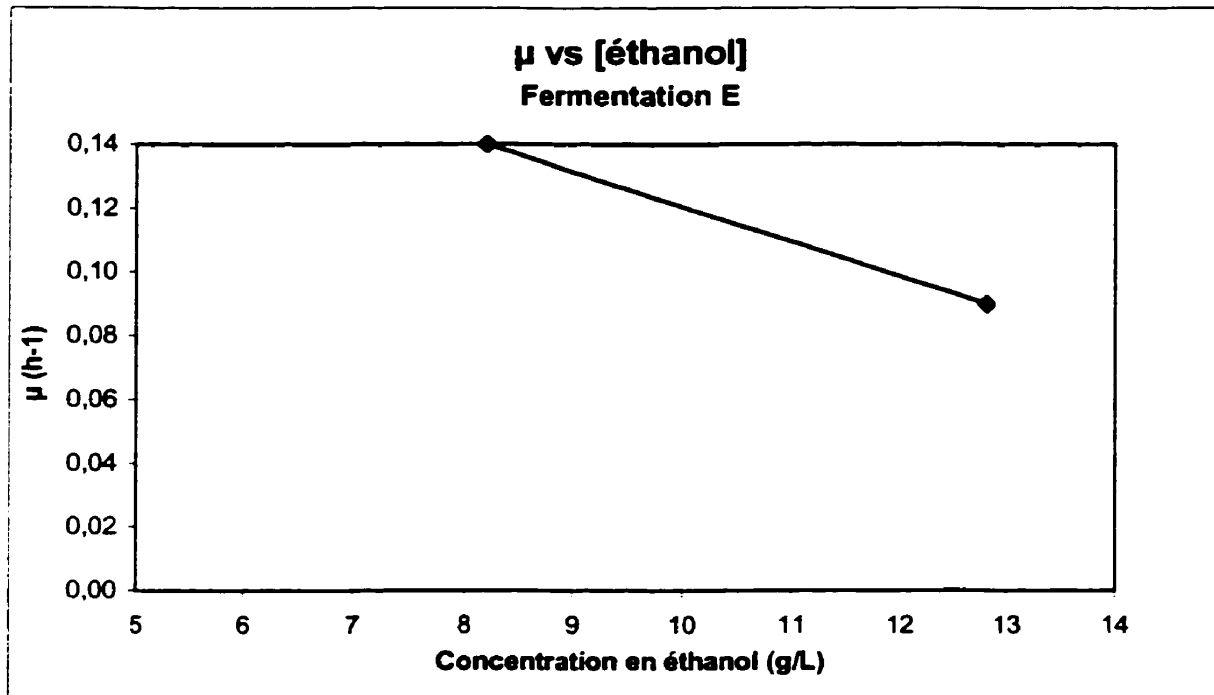
$$\mu = \frac{\ln(3,11/1,17)}{(7 - 0)} = 0,14 \text{ h}^{-1}$$

Les résultats des calculs pour les différents points sont présentés au tableau 3.8 :

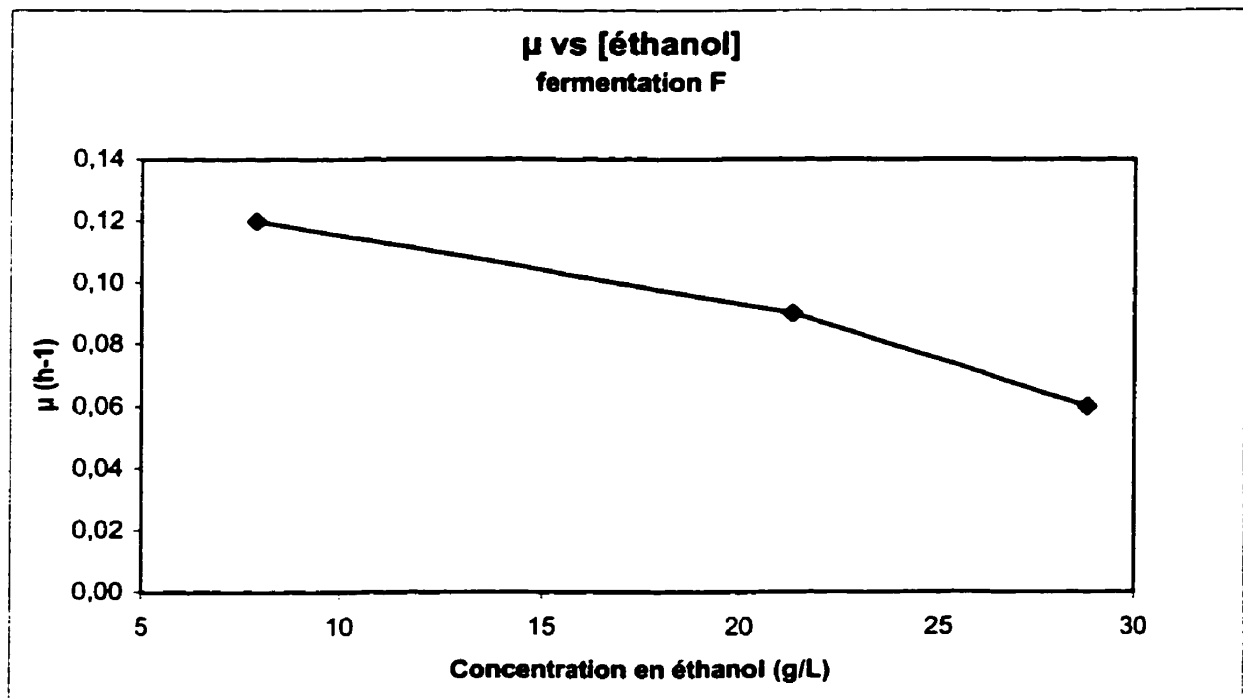
**Tableau 3.8 :** Taux de croissance spécifique en fonction du temps

Temps (h)	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	
	Fermentation E	Fermentation F
7	0,14	0,12
17	0,09	0,09
24	-	0,06

À l'aide de ces résultats ainsi que ceux des tableaux 3.6 et 3.7, les graphiques 3.8 et 3.9 ont été préparés. Il s'agit de graphiques du taux de croissance des levures en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu de culture. Ces graphiques montrent que le taux de croissance spécifique baisse substantiellement avec l'augmentation de la concentration en éthanol. Toutefois, le nombre de points de mesure est très limité. Sans compter que le dernier point de chaque courbe est incertain. En effet, lorsque la concentration en glucose est faible, la baisse du taux de croissance peut être due à l'épuisement du substrat. Pour ces raisons et à cause des approximations quant à la durée de la phase de latence, une autre série d'essais a été prévue afin de confirmer ces résultats (voir 3.1.4).



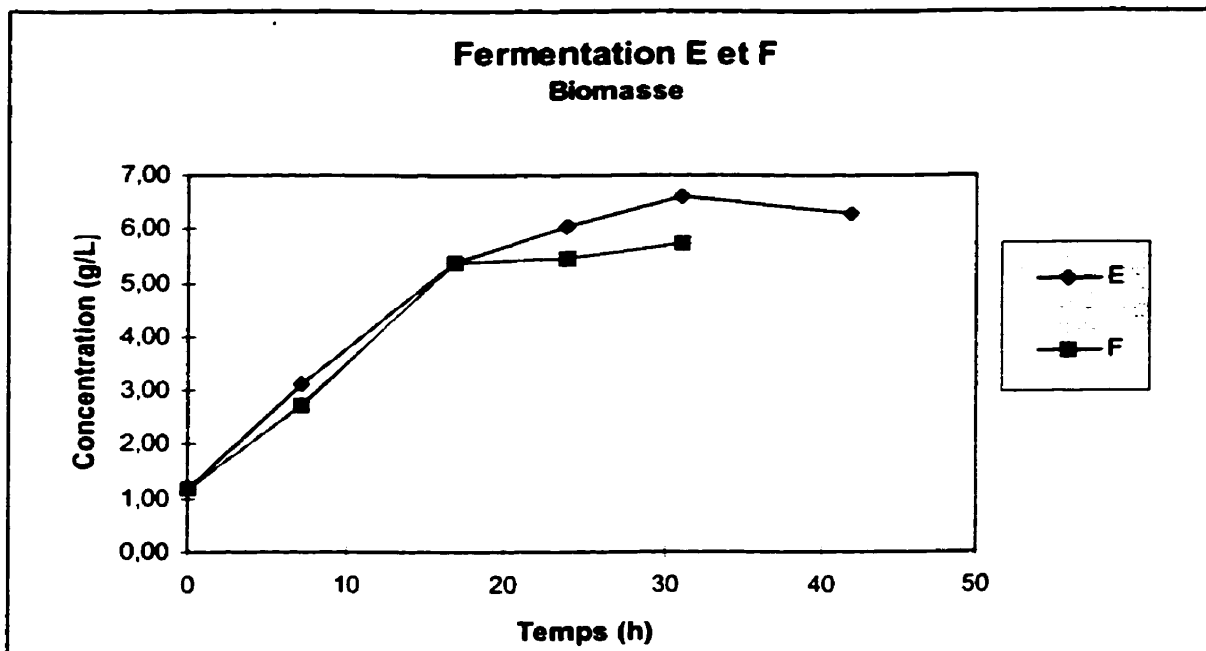
**Graphique 3.8:**  $\mu$  en fonction de [éthanol], fermentation E



**Graphique 3.9:**  $\mu$  en fonction de [éthanol], fermentation F



Il est à noter que l'ajout d'une forte concentration de glucose a eu pour effet de prolonger la durée de la première phase de la fermentation ; de 17 heures dans la fermentation E elle est passé à 24 heures dans la fermentation F. La concentration maximale en éthanol a aussi augmenté, de 12,8 g/L à 28,8 g/L. Une cassure à été constatée sur la courbe de croissance de la fermentation F. En effet, sur le graphique 3.10 où sont représentées les courbes de croissance des fermentations E et F, il y a une cassure après 17 heures. Toutefois, cette cassure n'a pas été confirmée par d'autres essais.



**Graphique 3.10:** Courbes de croissance, fermentations E et F

### 3.1.4 Fermentations avec dosages rapprochés

Dans cette série de fermentations les dosages ont été effectués à toutes les 3 heures plutôt qu'à toutes les 24 heures. Ceci permet de mieux définir la courbe de croissance et de déterminer la durée de la phase de latence. De plus, des concentrations initiales en glucose plutôt élevées ont permis d'allonger la durée de la première phase de la fermentation.

Quatre fermentations ont été réalisées avec des concentrations initiales en glucose de plus en plus fortes :

Fermentation G,	milieu non modifié:	8,8 g/L de glucose
Fermentation H,	milieu concentré:	28,9 g/L de glucose
Fermentation I,	milieu plus concentré:	46,2 g/L de glucose
Fermentation J,	milieu très concentré:	64,2 g/L de glucose

Les résultats des mesures de concentrations et les différentes courbes se retrouvent sur les tableaux 3.9 à 3.12 et graphiques 3.11 à 3.14.

**Tableau 3.9:** Dosages rapprochés, fermentation G (g/L)

Temps (h)	Glucose	Biomasse	Éthanol
0	8,8	2,11	2,5
3	7,9	2,35	2,7
6	6,6	3,19	3,2
9	2,4	4,45	6,1
12	0,4	5,61	9,8
15	0,0	6,01	9,1
18	0,0	6,48	9,9
21	0,0	6,90	9,8
24	0,0	7,14	8,7
28	0,0	7,19	9,0
36	0,0	7,98	8,4

**Tableau 3.10:** Dosages rapprochés, fermentation H (g/L)

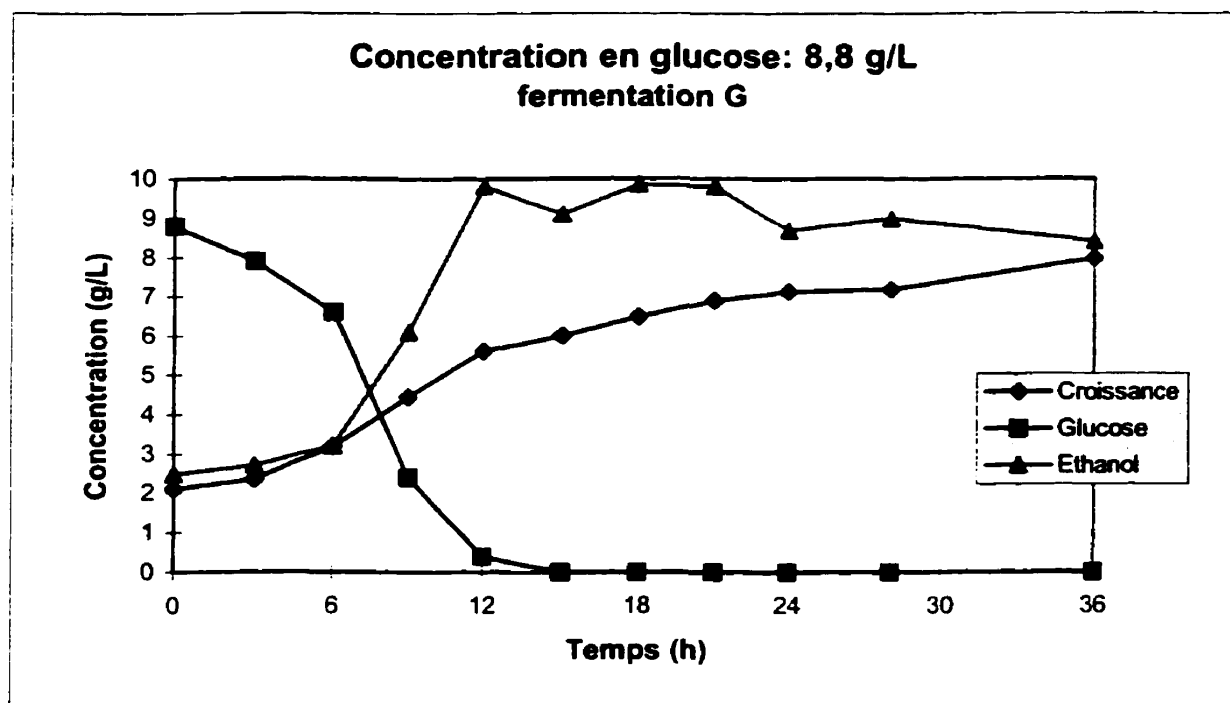
Temps (h)	Glucose	Biomasse	Éthanol
0	28,9	2,09	2,9
3	28,1	2,40	2,6
6	26,6	3,01	3,1
9	21,8	4,19	5,2
12	12,6	5,19	8,2
15	5,3	5,83	11,5
18	0,8	6,30	15,7
21	0,2	6,80	17,2
24	0,1	7,41	16,0
28	0,1	7,64	16,0
36	0,0	7,84	14,5

**Tableau 3.11:** Dosages rapprochés,  
fermentation I (g/L)

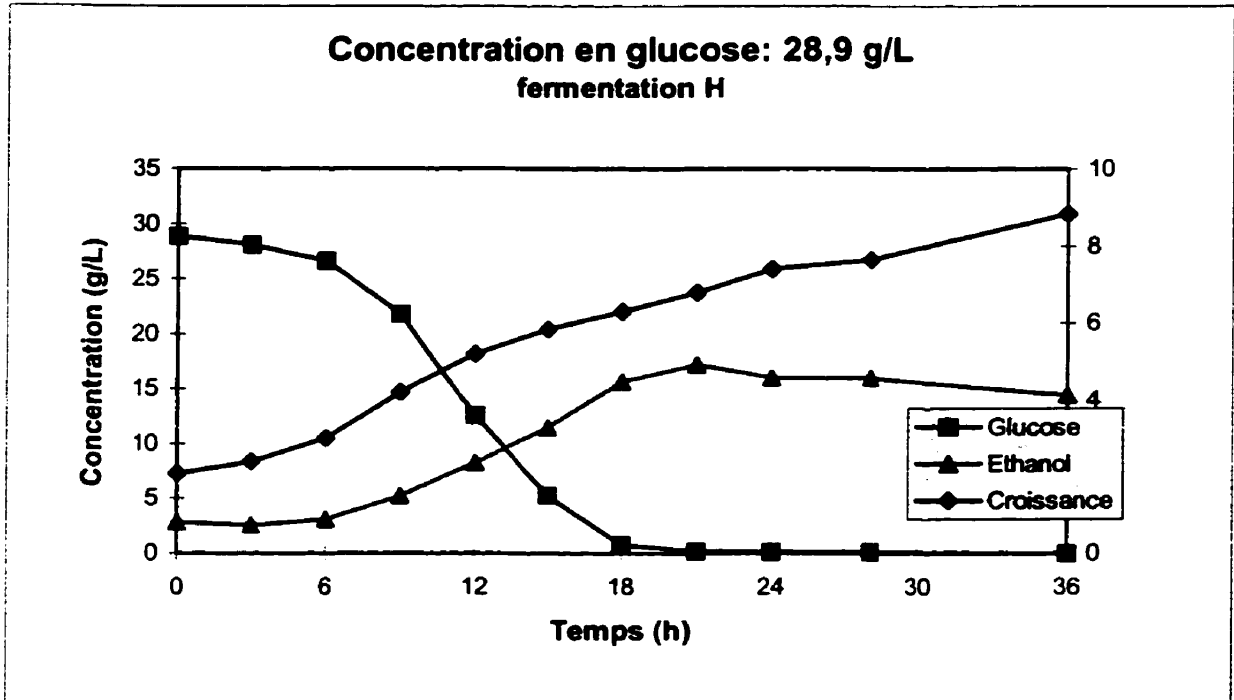
Temps (h)	Glucose	Biomasse	Éthanol
0	46,2	2,10	2,8
3	43,6	2,24	2,7
6	44,7	2,93	2,9
9	37,6	3,89	4,9
12	27,4	5,12	7,3
15	21,1	5,67	11,2
18	12,4	6,32	15,1
21	6,8	6,29	18,0
24	2,0	6,79	20,2
28	0,2	6,96	22,5
36	0,0	8,08	22,9

**Tableau 3.12:** Dosages rapprochés,  
fermentation J (g/L)

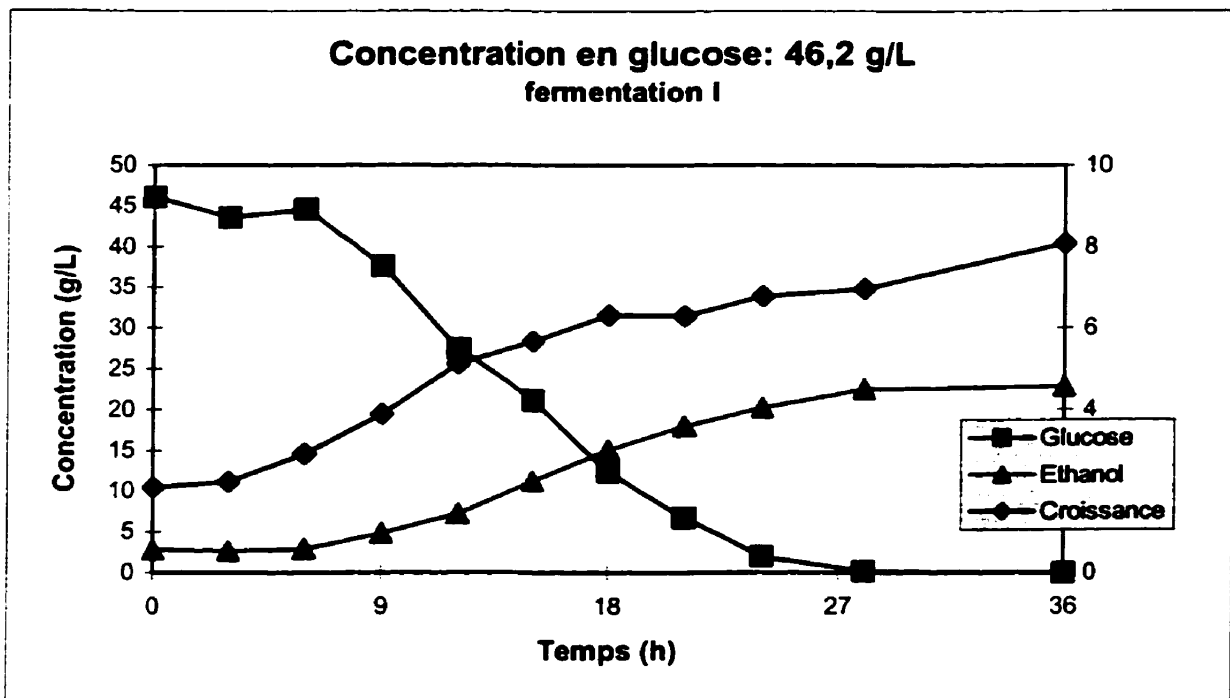
Temps (h)	Glucose	Biomasse	Éthanol
0	64,2	2,12	2,5
3	63,7	2,25	2,7
6	61,7	2,93	2,8
9	54,3	4,16	6,3
12	43,4	5,25	9,5
15	34,4	5,53	16,2
18	24,4	5,99	18,0
21	17,6	6,37	20,8
24	11,5	6,52	23,8
28	4,8	6,45	27,3
36	0,0	6,96	29,8



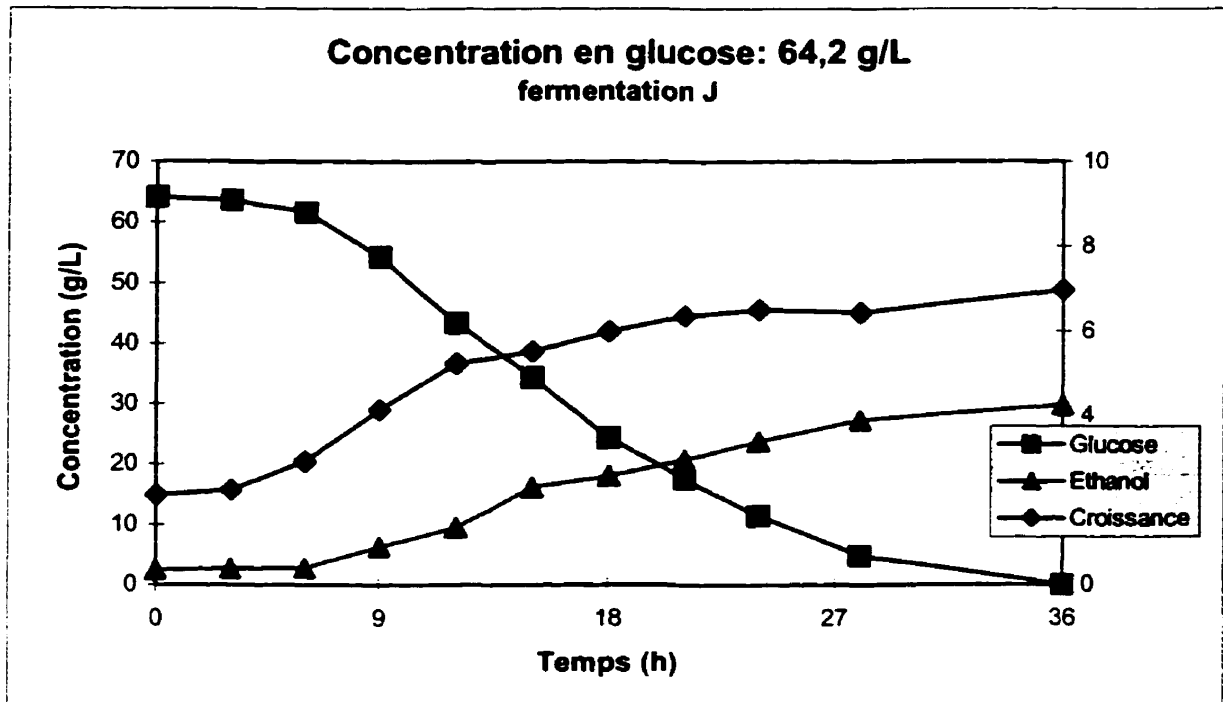
**Graphique 3.11:** Dosages rapprochés, fermentation G



**Graphique 3.12: Dosages rapprochés, fermentation H**



**Graphique 3.13: Dosages rapprochés, fermentation I**



**Graphique 3.14:** Dosages rapprochés, fermentation J

Il est bon de rappeler que le milieu de culture de cette série de fermentations n'était pas identique à celui des autres séries. En effet, le milieu des autres séries a été préparé avec du filtrat de la première préparation alors que celui de cette série a été préparé avec un mélange 50-50 des deux préparations (voir 2.2.1). Normalement, ces deux types de milieux auraient dû être semblables. Toutefois, les mesures de concentrations en glucose et en éthanol au temps zéro tel que présentées au tableau 3.9 indiquent le contraire. Le milieu de culture de cette série a une concentration initiale de 8,8 g/L de glucose et de 2,5 g/L d'éthanol par rapport à 4,6 g/L de glucose et 4,4 g/L d'éthanol pour la première préparation (tableau 3.1 et 3.3). Comme le filtrat utilisé dans cette série est un mélange des deux préparations, l'écart entre les concentrations de glucose et d'éthanol de ces deux préparations est donc forcément plus grand. À l'aide des résultats présentés ci-dessus, il est possible de calculer les concentrations de la deuxième préparation. Il y a environ 4 g/L d'éthanol de plus dans la première préparation et 8 g/L de glucose en moins. Sachant que la fermentation de 8 g de glucose produit à peu près 4 g d'éthanol, il semble y avoir eu une

pré-fermentation du filtrat pendant la première préparation. Il est à noter que cette préparation s'est échelonnée sur deux jours alors que la deuxième a été faite en une seule journée. Pour éviter ce genre d'inconvénient, les intrants avaient été conservés à 4°C pendant la nuit. Cette précaution ne semble pas avoir suffi. Il serait donc important, lors de travaux futurs, de faire les préparations dans un temps aussi court que possible. Une comparaison entre ces deux milieux de culture est présentée à l'annexe B.

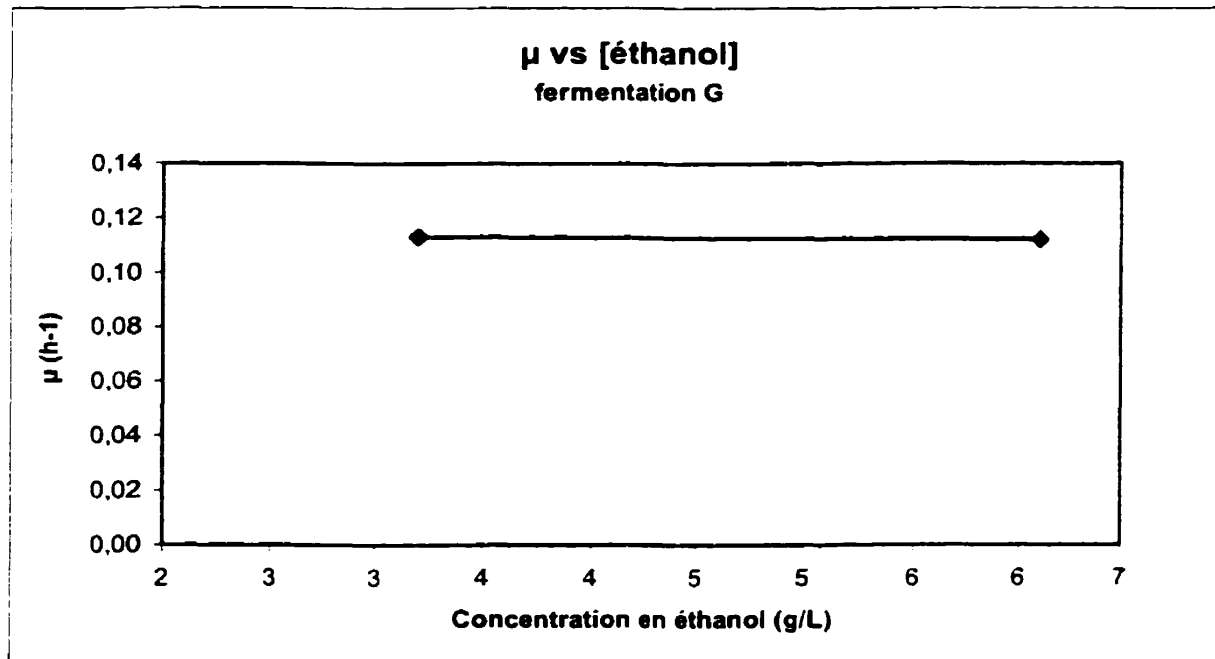
Les dosages réalisés pendant la première phase permettent de procéder aux calculs des taux de croissance spécifiques. La durée de la phase de latence ( $t_{lat}$ ) est déterminée à l'aide des graphiques 3.11 à 3.14. Elle est estimée à 3,3 heures pour les fermentations G et H, à 3,75 heures pour la fermentation I et à 3,9 heures pour la fermentation K. La concentration en biomasse mesurée après 3 heures de fermentation est utilisée, dans les calculs, comme approximation de la concentration en biomasse à la fin de la phase de latence ( $x_0$ ).

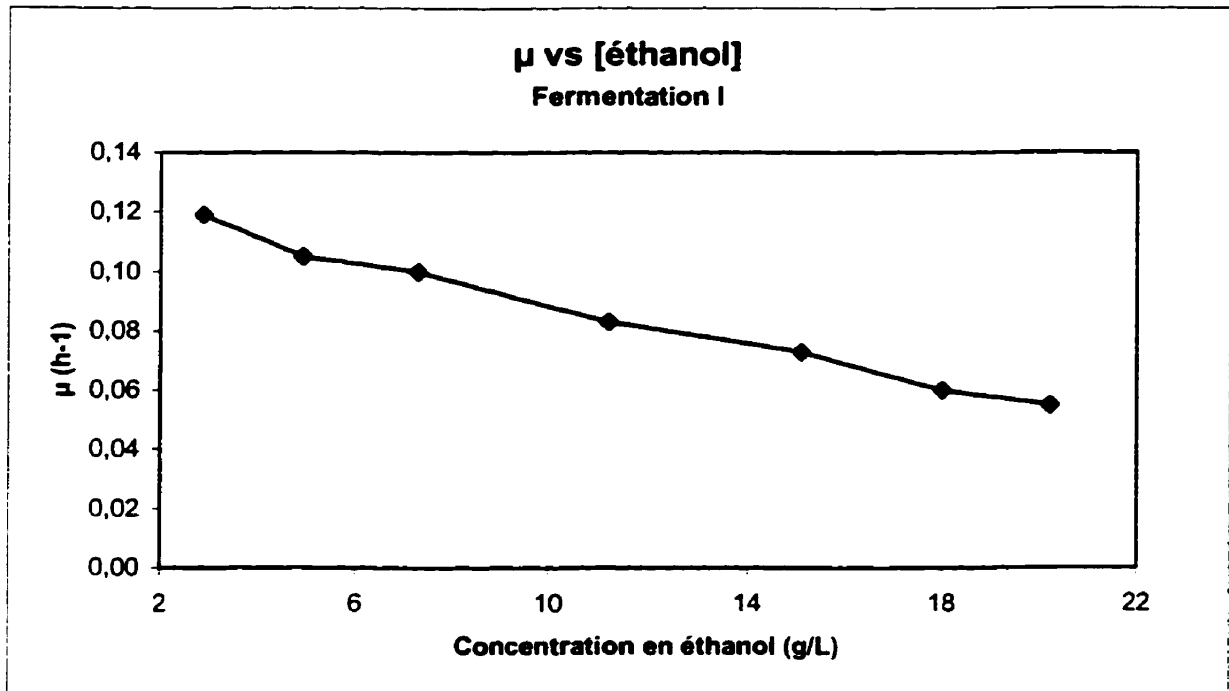
Les résultats des calculs du taux de croissance spécifique pour chacun des dosages réalisés avant épuisement du glucose, sont présentés sur le tableau 3.13. Ce tableau montre la baisse du taux de croissance au cours des fermentations. Tel qu'expliqué en 1.3.4, ceci implique un phénomène d'inhibition. En utilisant les données de concentrations en éthanol présentées dans les tableaux 3.9 à 3.12 ainsi que les résultats du tableau 3.13, des graphiques du taux de croissance en fonction de la concentration en éthanol ont été préparés.

**Tableau 3.13 : Taux de croissance spécifique en fonction du temps**

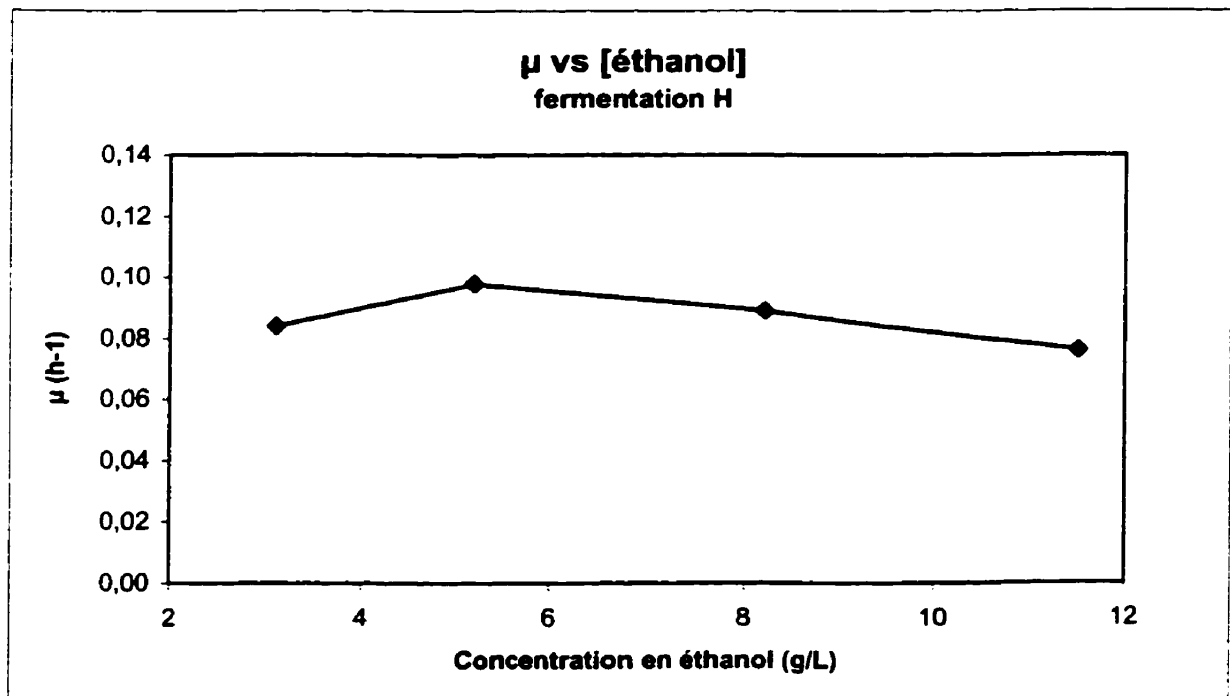
Temps (h)	G, $\mu(\text{h}^{-1})$	H, $\mu(\text{h}^{-1})$	I, $\mu(\text{h}^{-1})$	J, $\mu(\text{h}^{-1})$
6	0,113	0,084	0,119	0,126
9	0,112	0,098	0,105	0,121
12	0,100*	0,089	0,100	0,105
15	-	0,076	0,083	0,081
18	-	0,066*	0,073	0,069
21	-	-	0,060	0,061
24	-	-	0,055	0,053
28	-	-	-	0,044

\* La baisse du taux de croissance pour ces deux points peut être due à un manque de substrat. En effet, le glucose est presque épuisé à ce moment.

**Graphique 3.15 : Taux de croissance en fonction de [éthanol], fermentation G**

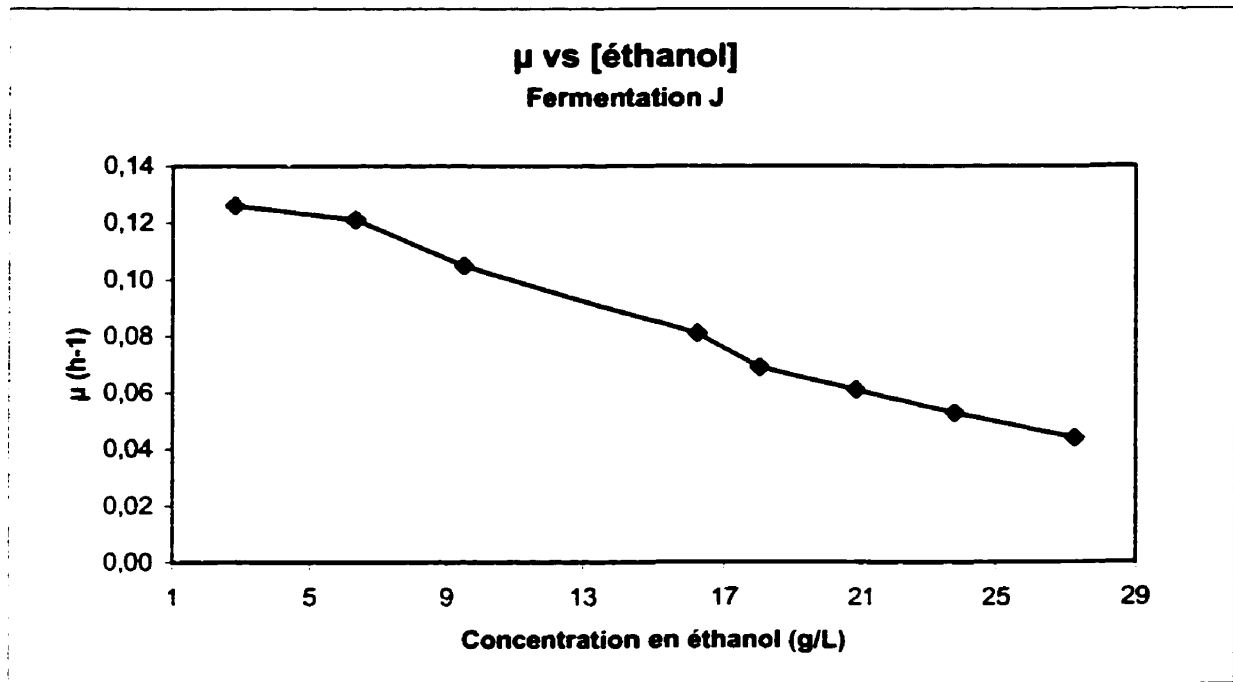


**Graphique 3.16:** Taux de croissance en fonction de [éthanol], fermentation H



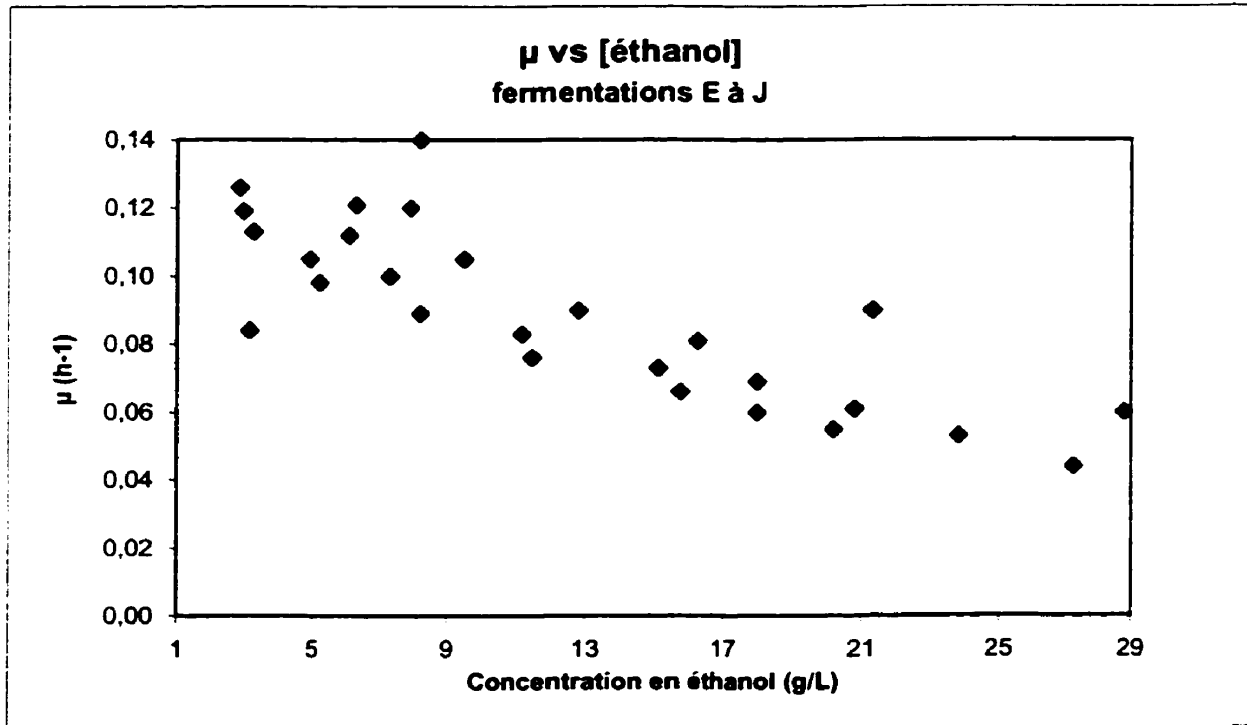
**Graphique 3.17:** Taux de croissance en fonction de [éthanol], fermentation I





**Graphique 3.18:** Taux de croissance en fonction de [éthanol], fermentation J

La baisse du taux de croissance avec l'augmentation de la concentration en éthanol est, encore une fois, évidente. Ces résultats viennent donc confirmer ceux des fermentations E et F et démontrent une inhibition de la croissance des levures par l'éthanol. Le graphique suivant (3.19) regroupe tous les points des graphiques 3.8, 3.9 et 3.15 à 3.18. La baisse du taux de croissance spécifique en fonction de l'augmentation de la concentration en éthanol est davantage mise en évidence.



**Graphique 3.19:** Taux de croissance en fonction de [éthanol], fermentation E à J

Un point à noter : la concentration en éthanol n'a jamais été suffisamment élevée, au cours de ces expérimentations, pour inhiber complètement la croissance des levures. L'éthanol n'a eu qu'un effet de ralentissement de la croissance.

### 3.2 VOIES MÉTABOLIQUES

Cette section est consacrée à la vérification de la deuxième hypothèse de recherche. Des essais ont été réalisés afin de déterminer si une baisse importante de la concentration en substrat dans le milieu de culture permet d'éliminer la voie métabolique fermentaire au profit de la voie oxydative. Les milieux de cultures ont été préparés avec des filtrats dilués :

Fermentation K, milieu très dilué: 0,6 g/L de glucose  
 Fermentation L, milieu dilué: 1,4 g/L de glucose

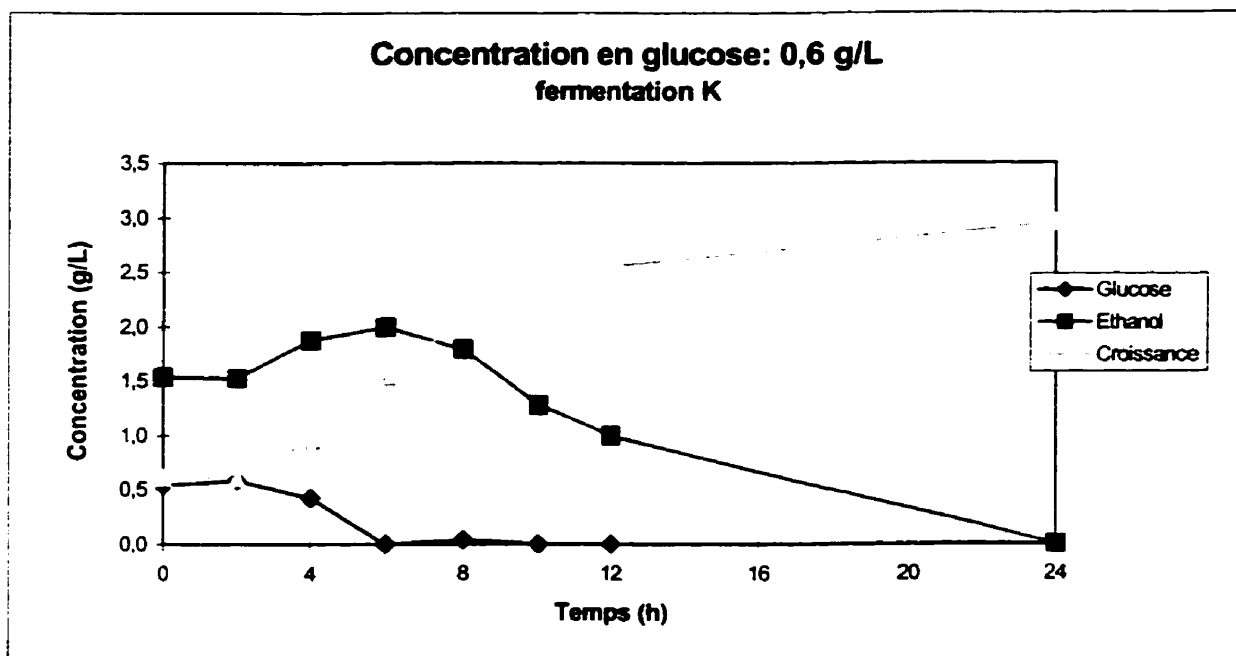
Comme la concentration en glucose au départ de ces fermentations est très faible, il est rapidement consommé par les levures. Pour cette raison, les dosages sont plus rapprochés pendant les douze premières heures et les fermentations sont arrêtées après 24 heures. Les résultats des mesures de concentrations ainsi que les différentes courbes sont présentés aux tableaux 3.14 et 3.15 et graphiques 3.20 et 3.21.

**Tableau 3.14:** Voies métaboliques, fermentation K (g/L)

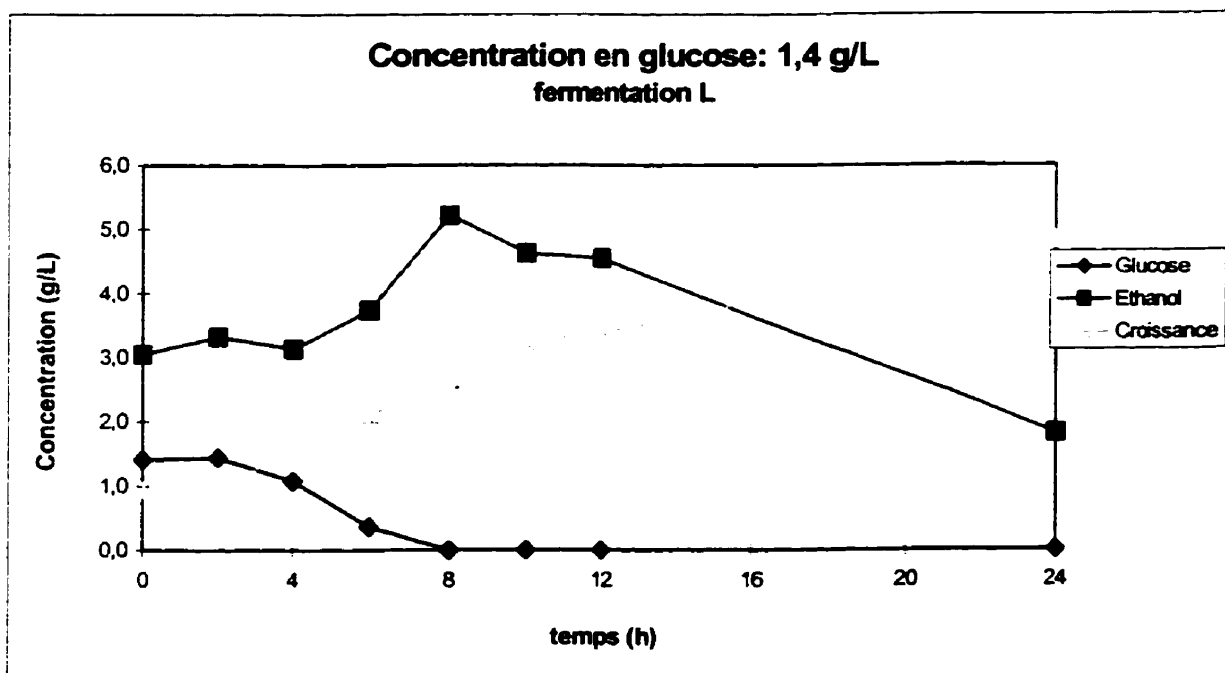
Temps (h)	Glucose	Biomasse	Éthanol
0	0,6	0,61	1,5
2	0,6	0,61	1,5
4	0,4	0,96	1,9
6	0,0	1,54	2,0
8	0,0	2,07	1,8
10	0,0	2,42	1,3
12	0,0	2,56	1,0
24	0,0	2,96	0,0

**Tableau 3.15:** Voies métaboliques, fermentation L (g/L)

Temps (h)	Glucose	Biomasse	Éthanol
0	1,4	0,95	3,1
2	1,4	1,06	3,3
4	1,1	1,46	3,1
6	0,4	2,11	3,7
8	0,0	2,66	5,2
10	0,0	3,25	4,6
12	0,0	3,38	4,5
24	0,0	4,83	1,8



**Graphique 3.20: Voies métaboliques, fermentation K**



**Graphique 3.21: Voies métaboliques, fermentation L**

Sur le graphique 3.21, contrairement à ce que les résultats de la fermentation A avaient pu laisser croire, on observe bien une croissance en deux phases, comme dans toutes les autres fermentations. La concentration en éthanol atteint son maximum après huit heures de fermentation pour redescendre par la suite. Comme il avait été constaté avec la fermentation A, la concentration en éthanol est plus faible après 24 heures qu'au départ. Cette production d'éthanol indique que le métabolisme fermentaire n'est pas éliminé.

En ce qui concerne la fermentation K, malgré une concentration initiale en glucose aussi faible que 0,6 g/L, celle-ci présente également une fermentation en deux phases avec production d'éthanol dans la première phase. Il n'a donc pas été possible d'éliminer le métabolisme fermentaire. Une recherche bibliographique plus approfondie a permis d'établir qu'avec des levures de type *Saccharomyces cerevisiae*, il n'a jamais été possible d'observer un métabolisme oxydatif avec le glucose comme substrat dans une culture en cuvée <sup>46</sup>. Seules des fermentations réalisées en mode continue ou « fedbatch » ont permis d'arriver à de tels résultats puisqu'avec ces modes d'opération, il est possible de fonctionner avec de très faibles concentrations en glucose et de maintenir ces concentrations sur une longue période de temps. En mode cuvée, le métabolisme oxydatif ne représente qu'un état transitoire à la fin de la première phase de croissance, lorsque le glucose est presque épuisé.

S'il n'a pas été possible d'éliminer la voie fermentaire, il est quand même intéressant de noter que la baisse de concentration en glucose permet de diminuer la production d'éthanol. En effet, dans la fermentation K, avec une concentration initiale de 0,6 g/L de glucose, il y a eu production de 0,5 g/L d'éthanol. Il s'agit d'une production de 0,83 gramme d'éthanol par gramme de glucose consommé. Dans la fermentation L, avec une concentration initiale de 1,4 g/L de glucose, la production d'éthanol était de 2,1 g/L soit 1,5 gramme par gramme. Ceci signifie qu'une moins grande proportion du glucose est métabolisée par la voie fermentaire dans la fermentation K et, par le fait même, une plus grande proportion est métabolisée par la voie oxydative. Donc, la dilution du milieu de culture permet de limiter la voie métabolique fermentaire au profit de la voie oxydative.

### 3.3 LE RENDEMENT

La rentabilité de la production de POU dépend du rendement des fermentations, il doit être aussi élevé que possible. Le rendement se définit comme le nombre de grammes de biomasse produits par gramme de substrat consommé. Comme il n'y a pas eu de caractérisation complète du milieu de culture, la nature du substrat n'est pas bien connue. Toutefois, comme il y a eu un suivi sur le glucose, on peut, en supposant que le glucose est la seule source de carbone pour les levures, définir le rendement comme le nombre de grammes de biomasse produits par gramme de glucose consommé. Le tableau 3.16 présente les rendements obtenus pour les différentes fermentations :

**TABLEAU 3.16 : Rendement des fermentations sur le glucose**

Fermentation	Glucose au départ (g/L)	Glucose Consommé (g/L)	Biomasse Produite (g/L)	Rendement (g/g)
K, très dilué	0,6	0,6	0,9	1,5
L, dilué	1,4	1,4	1,7	1,2
Prélim, non modifié	4,7	4,7	3,7*	0,8*
B, non modifié	4,5	4,5	4,3*	1,0*
G, non modifié	8,8	8,8	4,4	0,5
C, concentré	15,0	15,0	5,0*	0,3*
E, concentré	13,0	13,0	4,2	0,3
D, concentré	25,4	25,4	4,4	0,17
H, concentré	28,9	28,8	5,3	0,18
I, plus concentré	46,2	46,0	4,9	0,11
F, très concentré	54,3	54,0	4,3	0,08
J, très concentré	64,2	64,2	4,9	0,08

\* Comme ces valeurs proviennent de fermentations qui n'étaient dosées qu'une fois toutes les 24 heures, il y a de fortes chances pour qu'elles soient surestimées.

Selon ces résultats, il est certain que le glucose n'est pas la seule source de carbone pour les levures. En effet, les quatre premières fermentations présentent un rendement dépassant largement le maximum théorique de 0,5 (voir 1.4). Le glucose à lui seul ne peut générer autant de biomasse. Pour identifier les autres sources de carbones présentes dans le milieu de culture, une caractérisation qualitative du mélange de résidus organiques utilisé pour la préparation du filtrat a été entreprise. À partir des proportions relatives de chacun des éléments du mélange et de la composition de ces mêmes éléments, la composition du mélange a pu être estimée (Tableau 3.17) <sup>65</sup>:

**Tableau 3.17 : Composition du mélange de résidus (% massique)**

Hydrates de carbones	6,9	Fibres	0,4
Protéines	0,8	Cendres	0,4
Lipides	0,3	Eau	91

La composition présentée dans ce tableau est celle du mélange avant la filtration et la centrifugation. On remarque que les hydrates de carbone dominent largement sur les protéines et les lipides. Selon la littérature, ces hydrates de carbone seraient composés surtout de D-glucose, D-fructose, sucrose, en plus de quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose <sup>63</sup>. Comme les polysaccharides sont en grande partie éliminés lors de la filtration et la centrifugation, le fructose et le sucrose risquent fort d'être les sources de carbone additionnelles recherchées.

Un nouveau dosage des échantillons de quelques fermentations a été réalisé en mesurant cette fois le sucrose et le fructose (annexe C). Ceci a permis de constater que le sucrose n'est pas assimilé par les levures et que le fructose est rapidement métabolisé. Le fructose représente donc une source de carbone mais pas le sucrose. Il n'a pas été possible de refaire le dosage des échantillons de toutes les fermentations car certains d'entre eux avaient été altérés. De façon à refaire le calcul des rendements en tenant compte cette fois du fructose comme substrat, le dosage de deux échantillons pour chacune des préparations

de filtrat a été refait (annexe C). Le ratio entre le glucose et le fructose a été calculé pour chacun des deux filtrats, ce qui a permis de déterminer la quantité de fructose initiale dans chacune des fermentations à partir de la concentration initiale en glucose. Le tableau 3.18 présente les résultats obtenus. Les valeurs présentées pour le mélange 50-50 ne sont pas des valeurs mesurées mais plutôt la moyenne entre les valeurs de la préparation 1 et de la préparation 2.

**Tableau 3.18 : Rapport entre le fructose et le glucose**

	Glucose (g/L)	Fructose (g/L)	Ratio fruc./gluc.
Préparation 1	5,02	9,99	1,99
Préparation 2	19,71	23,22	-
Mélange 50-50	12,37	16,61	1,34

Il y a donc 1,99 fois plus de fructose que de glucose dans la préparation 1 et 1,34 fois plus dans le mélange 50-50. Comme les résultats indiquent que le fructose est consommé très rapidement et en totalité, comme le glucose, un rendement sur la somme du glucose et du fructose peut être calculé (Tableau 3.19).

Les rendements obtenus sont tous plus petits ou égaux au rendement maximum théorique de 0,5. Même s'il est difficile d'exclure la possibilité qu'il y ait une source de carbone autre que celles déjà identifiées, les probabilités sont faibles.

Il y a une baisse importante du rendement des fermentations à mesure qu'augmente la concentration initiale en glucose et en fructose dans le milieu de culture. Il est intéressant de noter que le rendement est inversement proportionnel à la concentration maximale d'éthanol atteinte au cours d'une fermentation (dernière colonne du tableau 3.19). Ceci semble confirmer l'inhibition par l'éthanol de la croissance des levures. Il a été démontré, dans la section 3.1, que l'éthanol a un effet de ralentissement sur la croissance des levures



mais rien ne prouve qu'il a un effet sur le rendement. La baisse de rendement pourrait tout aussi bien s'expliquer par les voies métaboliques. En effet, avec un métabolisme purement oxydatif, le rendement tel que rapporté dans la littérature serait de 0,5. Si par contre tout le glucose était métabolisé par voie fermentaire, le rendement tomberait à 0,1. Les rendements obtenus se situent entre ces deux valeurs. Le rendement de 0,52 de la fermentation K peut être dû à un métabolisme presque purement oxydatif alors que les rendements près de 0,1 des fermentations I, F et J peuvent s'expliquer par un métabolisme purement fermentaire. Il n'est donc pas possible, avec les résultats obtenus, de déterminer si l'éthanol joue un rôle actif dans la baisse de rendement.

**TABLEAU 3.19 : Rendement des fermentations sur le glucose et le fructose**

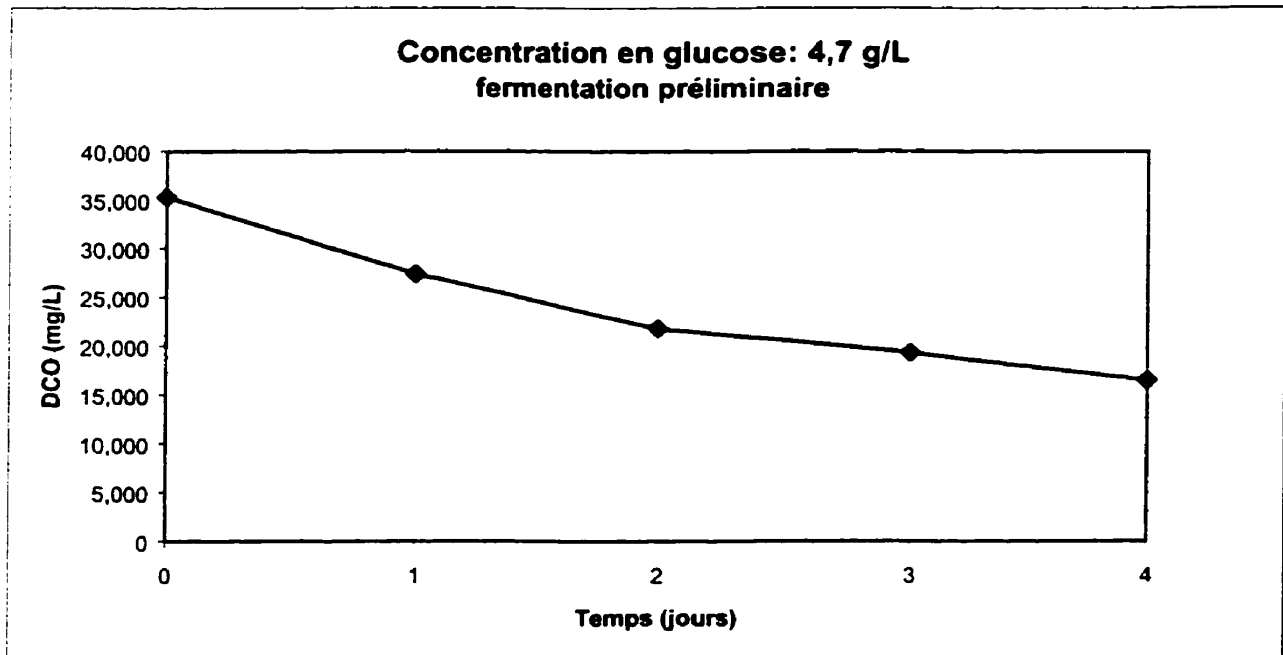
<b>Filtrat</b>	<b>Glucose+Fructose Consommé (g/L)</b>	<b>Biomasse Produite (g/L)</b>	<b>Rendement (g/g)</b>	<b>Max. Ethanol (g/L)</b>
K, très dilué	1,8	0,9	0,52	2,0
L, dilué	4,2	1,7	0,41	5,2
Prélim, non modifié	14,1	3,7*	0,26*	12,7
B, non modifié	13,5	4,3*	0,32*	5,9
G, non modifié	20,6	4,4	0,21	9,9
C, concentré	24,4	5,0*	0,21*	10,2
E, concentré	22,4	4,2	0,19	12,8
D, concentré	34,8	4,4	0,13	15,8
H, concentré	40,7	5,3	0,13	17,2
I, plus concentré	57,8	4,9	0,08	22,9
F, très concentré	63,4	4,3	0,07	28,8
J, très concentré	76,0	4,9	0,06	29,8

\* Comme ces valeurs proviennent de fermentations qui n'étaient dosées qu'une fois toutes les 24 heures, il y a de fortes chances pour qu'elles soient surestimées.

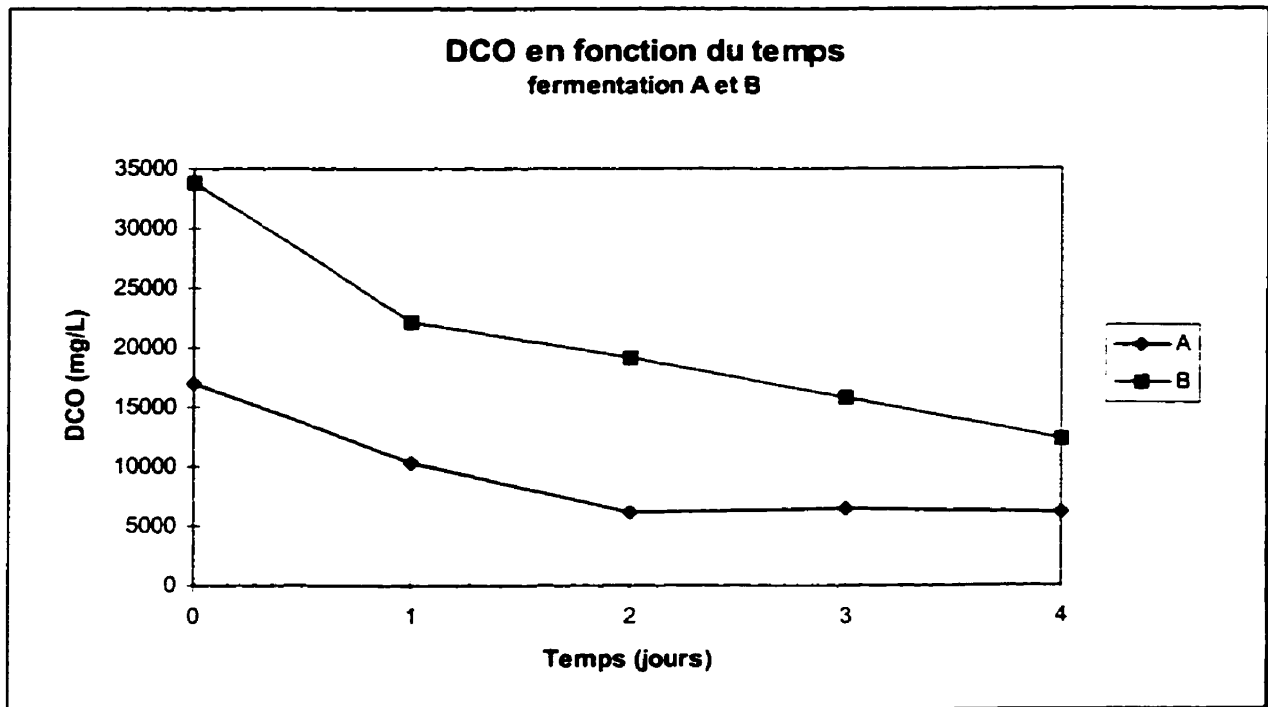
### 3.4 TRAITEMENT DES RÉSIDUS ORGANIQUES

Dans ce projet de recherche, les travaux ont été centrés sur la production de biomasse. Toutefois, il est important de ne pas perdre de vue que l'objectif premier dans ce genre de projet est l'élimination des résidus organiques. Cette section vise l'évaluation de l'efficacité du traitement des résidus par la fermentation.

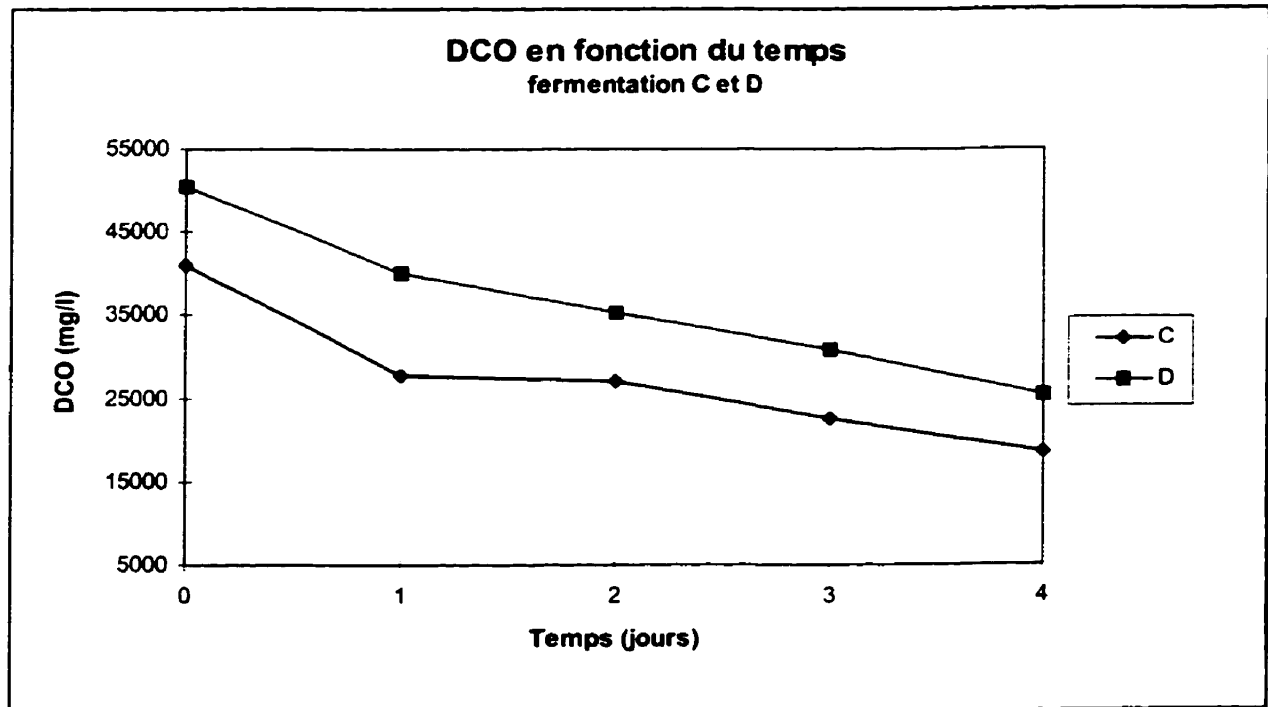
Pour évaluer l'efficacité du traitement, la mesure de la charge organique du milieu de culture au début de la fermentation est comparée à celle mesurée à la fin de la fermentation. Seules les cinq premières fermentations (préliminaire et A à D) sont considérées. Ces fermentations s'échelonnaient sur quatre jours alors que les autres ne duraient que de 24 à 42 heures. Les levures avaient donc plus de temps, dans les cinq premières fermentations, pour dégrader la matière organique. Les résultats des mesures de DCO sont présentés sur les graphiques 3.22, 3.23, 3.24 et sont résumés dans le tableau 3.20 :



**Graphique 3.22:** DCO en fonction du temps, fermentation préliminaire



**Graphique 3.23:** DCO en fonction du temps. fermentation A et B

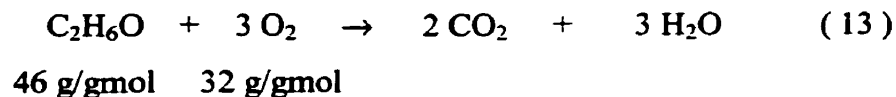


**Graphique 3.24:** DCO en fonction du temps. fermentation C et D

**Tableau 3.20 : DCO initiales et finales des fermentations**

DCO (mg/L)	FERMENTATIONS				
	Prélim.	A	B	C	D
t = 0	35 300	17 000	33 800	41 000	50 600
t = 4 j	16 500	6 153	12 300	18 500	25 400
Dégradation (%)	53,3	63,8	63,6	54,9	49,8

À la lumière des résultats obtenus, il est possible de constater qu'une partie importante de la matière organique n'est pas dégradée par les levures. En effet, entre le tiers et la moitié de la matière organique semble résister aux levures. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les fermentations A et B. Il s'agit des deux seules fermentations où l'éthanol a été complètement dégradé par les levures (voir graphiques 3.2 et 3.3). Dans la fermentation A, après deux jours de fermentation, lorsque l'éthanol est complètement dégradé, la croissance s'arrête et la DCO ne baisse plus. À ce moment, 36 % de la matière organique initiale est toujours présente dans le milieu. Dans la fermentation B, la même proportion de matière organique, soit 36 %, est encore dans le milieu de culture final mais après quatre jours de fermentation cette fois. Comme la fermentation a été arrêtée à ce moment, il est impossible de savoir s'il était encore possible pour les levures de dégrader de la matière organique. Selon les résultats de la fermentation A, il semble qu'il n'y ait plus aucune dégradation après épuisement de l'éthanol. Il y aurait donc un peu plus du tiers de la matière organique qui résiste aux levures dans ces deux fermentations. Dans les trois autres fermentations, la proportion de matière organique non dégradée est nettement supérieure à 36 %. Cet écart peut s'expliquer par la présence d'éthanol dans le milieu de culture final. En effet, ce produit est assimilable par les levures et une fermentation plus longue aurait permis d'éliminer cet l'éthanol. Selon l'équation suivante, il est possible de faire le calcul de la demande théorique en oxygène de cet éthanol résiduel :



Il faut donc  $3 * 32$  g d'oxygène pour oxyder 46 g d'éthanol soit  $2,09$  g  $O_2$  / g EtOH. Cette valeur est une bonne estimation de la DCO de l'éthanol résiduel. Le tableau 3.21 reprend les résultats du tableau 3.20 en tenant compte de cet éthanol résiduel. Dans le cas des fermentations C et D, il faut porter attention à la valeur de la DCO initiale. Dans ces deux fermentations, il y a eu du glucose ajouté au milieu de culture et ceci a eu pour effet d'augmenter substantiellement la valeur de la DCO initiale. Ce glucose ajouté est complètement dégradé et entraîne une plus grande production d'éthanol. Comme il est supposé, dans notre calcul, que tout l'éthanol a eu le temps d'être consommé par les levures, il ne reste plus de traces de cette DCO additionnelle à la fin des fermentations. La DCO apportée par l'ajout de glucose n'est donc pas considérée. En fin de compte, c'est la fraction de la matière organique du filtrat résistant aux levures qui est recherchée. Donc, la DCO de départ utilisée dans nos calculs pour les fermentations C et D sera la même que la DCO de départ de la fermentation B.

**Tableau 3.21: DCO corrigées des fermentations**

DCO (mg/L)	FERMENTATIONS				
	Prélim.	A	B	C	D
t = 0	35 300	17 000	33 800	33 800	33 800
t = 4 j	16 500	6 153	12 300	18 500	25 400
Ethanol	2 500	-	-	6 270	17 556
Dégradation (%)	60,3	63,8	63,6	63,8	76,8

Si l'hypothèse voulant que l'éthanol puisse être dégradé complètement par les levures est vraie, dans quatre fermentations sur cinq, la proportion de la matière organique qui n'est pas dégradée par les levures est de 37%. Le type de fermentation qui a été réalisé dans ce projet n'est donc pas un traitement très efficace pour éliminer les résidus organiques. Il serait nécessaire de procéder à une caractérisation plus poussée afin d'identifier la nature de la matière organique résistant aux levures. À moins de trouver un moyen pour augmenter l'efficacité des fermentations, un traitement additionnel devrait être envisagé.

## CONCLUSION

Ce projet de recherche a d'abord démontré que l'éthanol produit lors de la fermentation de résidus organiques, par une souche de *Candida utilis*, inhibe la croissance des levures. L'éthanol a eu un effet de ralentissement de la croissance; en aucun cas il n'y a eu arrêt complet de la croissance. Également, la diminution de la concentration en substrat dans le milieu de culture au départ de la fermentation n'a pas permis d'éliminer le métabolisme fermentaire qui génère l'éthanol. Toutefois, cette diminution a favorisé le métabolisme oxydatif au détriment du métabolisme fermentaire, ce qui a eu pour effet d'augmenter le rendement des fermentations, c'est à dire la quantité de biomasse produite (g) par gramme de substrat consommé. Une caractérisation qualitative du filtrat a aussi permis d'identifier le fructose comme étant une source importante de carbone pour les levures. Le calcul du rendement des fermentations en tenant compte de ce fructose confirme que le rendement est inversement proportionnel à la concentration en substrat dans le milieu et à la production d'éthanol. Il n'a toutefois pas été possible de dire si l'éthanol joue un rôle actif dans la baisse de rendement. Enfin, il y a eu une évaluation des fermentations comme méthode de traitement des résidus organiques. Plus du tiers de la matière organique résiste à la dégradation par les levures. Même s'il est plus que probable qu'une partie de cette matière soit non-biodégradable, il reste que, dans le cadre de cette étude, cette méthode de traitement ne s'est pas avérée très efficace.

Au cours de la réalisation de ce projet, l'importance des voies métaboliques dans la production de biomasse s'est précisée. Étant donné le rendement de trois à cinq fois supérieur du métabolisme oxydatif par rapport au métabolisme fermentaire, seules les fermentations utilisant ce premier métabolisme peuvent atteindre des rendements intéressants pour la production de biomasse ; ce point est déterminant pour la rentabilité de la production.

Les méthodes employées pour réaliser cette étude ont certaines limites. La revue de la littérature a permis d'identifier les deux paramètres les plus importants dans l'orientation des voies métaboliques, soit la concentration en glucose (substrat) dans le milieu de culture et l'apport en oxygène. Si le premier des deux a pu être bien étudié, le type de fermentation employé ne permettait pas de bien contrôler l'apport en oxygène. En effet, seule la vitesse d'agitation des fioles dans l'incubateur permettait d'avoir un contrôle sur l'aération. Cependant, comme la concentration en oxygène dans le milieu de culture pendant les fermentations n'était pas mesurée, il n'y avait pas moyen de s'assurer d'une oxygénation suffisante. Autre limite dans cette étude, la caractérisation incomplète du filtrat. Même si le glucose et le fructose comptent probablement pour la totalité des sources de carbone, il faudrait s'en assurer. Il serait encore plus important d'identifier la nature de la matière organique résistante aux levures. Ceci permettrait d'envisager des modifications afin d'augmenter l'efficacité du traitement des résidus par fermentation ou d'opter pour un traitement supplémentaire.

En ce qui concerne les méthodes d'analyses, une erreur sur les mesures découle d'un mauvais contrôle sur certains paramètres et des limites des méthodes employées. D'abord, il est impossible de reproduire deux filtrats identiques. En effet, les fruits et légumes qui entre dans la préparation du filtrat varient selon la saison. Les conditions de préparation du filtrat influencent également la concentration en sucre et en éthanol dans le filtrat. Ceci rend difficile la comparaison de résultats de fermentation qui n'ont pas été réalisés à partir d'une même préparation de filtrat. De plus, à l'intérieur d'une même préparation de filtrat, la présence de matières en suspension peu amener un problème d'homogénéité. En effet, même avec une bonne agitation pendant le remplissage des fioles, il reste toujours une petite différence au niveau de la matière en suspension d'une fiole à l'autre. L'effet de cette variation sur les résultats n'a pas été évalué au cours de l'étude mais il est jugé minime. Également, le démarrage d'une fermentation de plusieurs fioles (80 à 100), demande deux heures de manipulations. Même en tenant compte de ce délai, le temps de départ pour chaque fiole n'est pas très précis. L'erreur pourrait aller jusqu'à plus ou moins trente minutes. Même problème lorsque le dosage de plusieurs fioles doit être fait en peu de temps. Certaines d'entre elles seront dosées avec un décalage de 15 minutes. Il peut

donc y avoir jusqu'à 45 minutes d'erreur sur la durée d'une fermentation. Lorsque les dosages se font une fois toutes les 24 heures, ça n'a pas de conséquence. Cependant, lorsqu'ils se font une fois toutes les deux heures, l'erreur peut devenir grande. C'est pourquoi il est recommandé de faire des fermentations avec un moins grand nombre de fioles lorsque les dosages sont rapprochés. Enfin, l'absence d'un système de refroidissement dans les incubateurs a amené une augmentation de la température, de l'ordre de 2 à 3°C, au cours de certaines fermentations. L'effet de cette variation n'a pas été évalué.

La production de protéines d'origine unicellulaire à partir de résidus organiques est possible et elle permet d'éliminer en bonne partie ces résidus. Toutefois, l'optimisation du rendement des fermentations est nécessaire avant d'envisager une production économiquement rentable. Il semble, suite à cette étude et selon la littérature, que l'oxygène soit un paramètre important dans l'optimisation du rendement. Il est donc recommandé, dans les travaux futurs, d'utiliser des fermenteurs munis d'une sonde à oxygène. Cette sonde permettrait de connaître les besoins en oxygène des levures et de fournir une aération adéquate. Enfin, une solution devra être apportée quant à l'élimination des résidus résistant à la fermentation.



## BIBLIOGRAPHIE

1. Spencer, R.L., « Food waste composting in Canada : Source Separation », *Biocycle*, juin 1990, Emmaus, p. 30-32, 1990
2. Puniya, A.K., Singh, S., Kumar, C.G. and Singh, K., « Single cell protein: a promising dietary substitute », *Journal of Experimental Biology.*, Aug. 1995 pp. 545-551
3. Kihlberg, R., « The microbe as a source of food », *Annual review of microbiology*, vol. 26, 1972
4. Forage, A.J. and Righelato, R. C., « Biomass from carbohydrates », *Microbial Biomass*, Rose, A.H., Ed. Academic Press, London, 1979
5. Singhal, K.K. and Sharma, D.D., « Single cell protein for animal production », *Agric. Rev.*, 14 (2): 93-101. 1993
6. Halasz, A. & Lasztity, R., Use of yeast biomass in food production., Ed. by Raton Boca, CRC Press, 1991
7. Gray, P. and Berry, D.R., « The production off feedstuff biomass from liquid organique wastes by fermentation » in Handbook of organic waste conversion, New York, Van Nostrand Reinhold Co., 1980
8. Espinosa, R. et al, « Aerobic non-aseptic growth of *Verticillium* on coffee waste waters and blackstrap molasses at a pilot plant scale. », *Biotech. Bioeng. Symp.* No. 7. Gaden, E.G. and Humphrey, A.G. (Eds.) John Wiley & sons, New York, pp.35-44, 1977
9. Hang, Y.D., « Some factors affecting the treatment of sauerkraut waste with yeast. », *5<sup>th</sup> Inter. Ferment. Symp., Berlin.*, Dellweg (Ed.). p.350, 1976
10. Sinclair, C.G., « Microbial process kinetics », *Basic Biotechnology*, Bullock, J. and Kristiansen, B. (Eds.), Academic Press, London, 1987, 75
11. Kishore, P.V. and Karanth, N.G., « Critical influence of dissolved oxygen on glycerol synthesis by an osmophilic yeast *Pichia farinosa* », *Process Biochem.*, 21(5), 160, 1986
12. Nour-El Dien, H., « Cheese Whey as Substrate for Single-Cell Protein production (Yeast Biomass) », Ph.D. Thesis, Hungarian Academy of Science, Budapest, 1980
13. Niederberger, B.P., Eabi, M., and Hüter, R., « Influence of the general control of amino acid biosynthesis on cell growth and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae* », *J. Gen. Microbiol.*, 129, 2511, 1983

14. Hatch, R.T., « Fermentor design. », *Single Cell Protein II*. S. R. Tannenbaum and D.I.C. Wang (Eds), MIT Press, Cambridge, Massachusetts, pp 46-68, 1975
15. Mukhopadhyay, S.N. and Ghose, T.K., « Oxygen participation in fermentation, part I. Oxygen-microorganism interactions. », *Proc. Biochem.*, 11 :19-27, 1976
16. Fukuda, H., Sumino, Y. and Kanzaki, T., « Scale-up of fermentors. », *J. Ferment. Tech.*, 46: 829-837, 1968
17. Imrei, F. and Vlitose, A., « Production of fungal protein from carob » *Single Cell Protein II*, Tannenbaum, R. and Wang, I.C. (Eds.), MIT Press, Cambridge, 223, 1975
18. Research Institute of Hungarian Spirit Industry, « The yeast in food », Report No. 3, Budapest, 1987
19. Sergeev, V.A. et al, « Vergleichscharakteristik von Isolaten der Gesanteiwasse der Hefe in Abhängigkeit... », *Acta Biotechnol.*, 4(2), 105, 1984
20. Diezak, J.D., « Yeast and yeast derivatives: applications », *Food Technol.*, 41(2), 122, 1989
21. Guzman-Juarez, M., « Yeast protein », *Developments in Food Protein-2*, Hudson, B.J.F. (Ed), Applied Science Publishers, London, 263, 1983
22. CRIQ, « Fermentation des résidus organiques », Rapport interne, 1996
23. Prior, B.A., Botha, M., Custers, M., Casaleggio., « Fermentation of pineapple effluent by *Candida utilis* », *Adv. Biotechnol.*, 2: 337-342, 1981
24. Casey, G.P. and Ingledew, W.M., « Ethanol tolerance in yeast », *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 13, 219-280, 1986
25. Mota, M., Strehaiano, P., Goma, G., « Studies on conjugate effect of substrate (*glucose*) and product (*Ethanol*) on cell growth kinetics during fermentation of different yeast strains », *J. Inst. Brew.*, 90, 359-362, 1984
26. Jones, R.P. and Greenfield, P.F., « Specific and non-specific inhibitory effect of ethanol on yeast growth », *Enzyme Microb. Technol.*, vol.9, June 1987
27. Aiba, S., Shoda, M. and Nagatani, M., « Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation », *Biotechnol. Bioeng.*, 10, 845, 1968
28. Kalmokoff, M. and Ingledew, W.M., « Evaluation of ethanol tolerance in related *Saccharomyces* strains », *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 43(4), 189, 1985

29. Brown, S.W., Oliver, S.G., Harrison, D.E.F., Righelato, R.C., « Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation : differences in the magnitude and complexity of the effect », *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 151, 1981
30. Jones, R.P. and Greenfield, P.F., « Kinetics of apparent cell death in yeast induced by ethanol », *Biotechnol. Lett.*, 6, 471, 1984
31. Aiba, S. and Shoda, M., « Reassessment of the product inhibition of alcohol fermentation », *J. Ferment. Technol.*, 47, 790, 1969
32. Zines, D.O. and Rogers, P.L., « A chemostat study of ethanol inhibition », *Biotechnol. Bioeng.*, 13, 293, 1971
33. Day, A. et al, « Ethanol tolerance of brewing yeast », *Proc. 15<sup>th</sup> Conv. Eur. Brew. Cong.*, IRL Press, Oxford, 377, 1975
34. Nojiri, K. and Ouchii, K., « The fermenting ability of the sake yeast and its alcohol tolerance. I. The relationship between... », *J. Soc. Brew.(Japan)*, 57, 824, 1962
35. Hayashida, S. and Ohta, K., « Formation of high concentrations of alcohol by various yeast », *J. Inst. Brew.*, 87, 42, 1981
36. Monod, J., « The growth of bacterial cultures », *Ann. Rev. Microbiol.*, 3, 371, 1959
37. Holzberg, I. et al, « A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice », *Biotechnol. Bioeng.*, 9, 413, 1967
38. Novak, Strehaiano, P., Moreno, M., Goma, G., « Alcoholic fermentation : on the inhibitory effect of ethanol », *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 201, 1981
39. Cysewski, G.R. and Wilke, C.R., « Utilisation of cellulosic materials through enzymatic hydrolysis. I. Fermentation of hydrolysate to ethanol and single-cell protein », *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 1297, 1976
40. Guijarro, J.M. and Lagunas, R., « *Saccharomyces cerevisiae* does not accumulate ethanol against a concentration gradient », *J. Bacteriol.*, 160, 874, 1984
41. Loureiro, V. and Ferreira, H.G., « On the intracellular accumulation of ethanol in yeast », *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2263, 1983
42. Brown, S.W. et al, « Ethanol production and tolerance in grande and petite yeast », *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 34B, 116, 1984
43. Hoppe, G.K. and Hansford, G.S., « Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth », *Biotechnol. Lett.*, 4, 39, 1982

44. Thomas, D.S. et al, « Plasma membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* », *Arch. Microbiol.*, 117, 239, 1978
45. Thomas, D.S. and Rose, A.H., « Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma membrane lipid composition », *Arch. Microbiol.*, 122, 49, 1979
46. Bailey, J.E. and Ollis, D.F., Biochemical engineering fundamentals, McGraw-Hill chemical engineering series, second edition, p. 397, 1986
47. Käppeli, O., « Regulation of Carbon Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and Related Yeast », *Advances in Microbial Physiology*, 28, 181-209, 1986
48. Barnett, J.A., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 32, 125, 1976
49. Fiechter, A., Fuhrmann, G.F. and Käppeli, O., « Regulation of glucose Metabolism in Growing Yeast Cells », *Adv. Microbiol. Physiol.*, 22, 123, 1981
50. Rose, A.H. and Harrison, J.S. (Eds), The Yeast, vol.3. Academic Press, London, 1971
51. Pasteur, L., Étude sur la bière, ses maladies, causes qui les provoquent..., Gauthier-Villars (Eds), Paris, 1876
52. DeDeken, R.H., « The Crabtree Effect : A regulatory System in Yeast », *J. gen. Microbiol.*, 44, 149-156, 1966
53. Crabtree, H.G., « Observations on the carbohydrate metabolism of tumors », *Biochem. J.*, 23, 536, 1929
54. Beck, C. and von Meyenburg, H.K., *Journal of Bacteriology*, 124, 606, 1968
55. Meyenburg, K., von, « Katabolit-Repression und der Sprossungszyklus von *Saccharomyces cerevisiae* », Thesis No. 4279, ETH Zürich, 1969
56. Meyenburg, K., von, *Archiv. Microbiologie*, 66, 289, 1969
57. Barford, J.P. and Hall, R.J., « Investigation of the significance of carbon and redox balance to the measurement of gaseous metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* », *Biotechnology and Bioengineering*, 21(4), 609-26, 1979
58. CRIQ, « Méthode: MA4058-M, Analyse: DCO-Eaux usées », Rapport interne, 1996
59. CRIQ, « Méthode: MA4050-M, Analyse: DBO<sub>5</sub> et DBO<sub>5</sub> soluble », Rapport interne, 1996
60. CRIQ, « Méthode: MA4049-M, NKT Eaux usées », Rapport interne, 1996

61. CRIQ, « Méthode: MA4054-M, Analyse: P.t.- Eaux usées », Rapport interne, 1996
62. CRIQ, « Méthode: MA4029, Analyse: MIC - Quantitatif », Rapport interne, 1995
63. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, « Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater », 19<sup>e</sup> édition, 1995
64. MAPAQ Méthode F0-1, « Mise en solution des tissus végétaux », mai 1988
65. Fennema, O.R., « Principles of food science ; part 1: Food chemistry », Edited by Owen R. Fennema, New York, 1976

## ANNEXE A

## VOLATILISATION DE L'ÉTHANOL

Dans le but de mesurer la volatilisation de l'éthanol pendant les fermentations, deux essais ont été réalisés : un avec du filtrat non-modifié et un avec du filtrat dans lequel 10 g/L de glucose ont été ajouté. Après 24 heures de fermentation, lorsque la concentration en éthanol est élevée, les levures sont tuées avec 0,1 % de HgCl<sub>2</sub>. La concentration en éthanol est alors mesurée en fonction du temps (tableau A1):

Temps (h)	Filtrat non-modifié		Filtrat (10 g/L de glucose)	
	Normal	HgCl <sub>2</sub>	Normal	HgCl <sub>2</sub>
24	5,86	5,86	11,90	11,90
48	3,26	5,81	10,33	-
72	0,74	5,09	7,0	11,67

Avec le filtrat non-modifié, 87 % de l'éthanol disparaît entre la 24<sup>ième</sup> et la 72<sup>ième</sup> heure de fermentation. Lorsque les levures sont tuées seulement 9 % de l'éthanol disparaît du milieu. Lorsque 10 g/L de glucose sont ajoutés dans le filtrat, 59 % de l'éthanol disparaît pendant la même période de temps alors que seulement 2 % de l'éthanol disparaît lorsque les levures sont tuées.

Selon ces résultats, la volatilisation de l'éthanol se situe entre 2 et 9 % en 48 heures.

## ANNEXE B

## COMPARAISON ENTRE LES DEUX MILIEUX DE CULTURES

Il n'est pas possible de comparer les deux types de milieu de culture (première préparation de filtrat et mélange des deux préparations) sur l'ensemble des fermentations. En effet, les fermentations avaient des durées variables et les quantités de glucose ajoutées au milieu n'étaient pas toujours les mêmes. La fermentation préliminaire et la fermentation B seront comparées à la fermentation G car il n'y a pas eu d'ajout de glucose dans aucune d'entre elles. Aussi, la fermentation D sera comparée à la fermentation H car la même quantité de glucose a été ajoutée dans leur milieu de culture soit 20 g/L. Comme les fermentations G et H s'arrêtaient après 36 heures, seule la première moitié des autres fermentations a été considérée pour faire les comparaisons (tableaux B1, B2 et B3) :

**Tableau B1:** Comparaison des milieux de culture, filtrat seul

Temps (h)	Préparation 1		Mélange 1 et 2
	Prelim., Biomasse (g/L)	B, Biomasse (g/L)	G, Biomasse (g/L)
24	3,7	4,3	5,0
36	-	-	5,9
48	5,4	5,1	-

**Tableau B2 :** comparaison des milieux de culture, filtrat + 20 g/L de glucose

Temps (h)	Préparation 1	Mélange 1 et 2
	D, Biomasse (g/L)	H, Biomasse (g/L)
24	4,5	5,3
36	-	6,7
48	5,6	-

**Tableau B3 : Augmentation de la production de biomasse en utilisant le mélange des deux préparations plutôt que le filtrat 1**

Temps (h)	Filtrat seul (%)	Filtrat + 20 g/L glucose (%)
24	25	18
36 vs 48	12	20

Ce tableau montre que l'utilisation du mélange des deux filtrats permet une production de biomasse 20 % plus grande par rapport à l'utilisation du premier filtrat seulement. Même après seulement 36 heures de fermentation avec le mélange, la production de biomasse est déjà plus grande qu'après 48 heures avec le filtrat de la première préparation. Ces résultats ne sont pas surprenants puisqu'une quantité importante de glucose s'était perdue au cours de la préparation du filtrat 1. Sans compter qu'une plus grande quantité d'éthanol présent dans le filtrat affecte la croissance des levures. Il est donc important d'éviter la fermentation pendant la préparation du filtrat en réduisant le temps de préparation à quelques heures tout au plus.



## ANNEXE C

## RÉSULTATS DES DOSAGES INCLUANT SUCROSE ET FRUCTOSE

Tableau C1

Échantillon	Sucrose (g/L)	Glucose (g/L)	Fructose (g/L)	Éthanol (g/L)
Ferm. E, t = 0	3,02	12,33	8,85	4,55
Ferm. E, t = 7 h	3,13	6,99	7,11	8,64
Ferm. E, t = 17 h	3,12	0,70	0,52	9,46
Ferm. E, t = 24 h	2,60	0,76	0,60	6,97
Ferm. E, t = 31 h	2,87	0,82	0,55	-
Ferm. E, t = 42 h	2,95	0,80	0,53	6,64
Ferm.G, t = 0	3,40	12,81	15,40	3,31
Ferm.G, t = 6 h	3,47	10,50	13,44	2,95
Ferm.G, t = 12 h	-	-	0,98	5,87
Ferm.G, t = 18 h	3,07	-	0,80	3,91
Ferm. K, t = 0	2,08	2,91	4,51	2,66
Ferm. K, t = 4 h	2,41	2,46	4,33	2,55
Ferm. K, t = 8 h	2,08	-	0,53	3,18
Ferm. K, t = 12 h	2,13	-	0,42	3,10
Préparation 1 #1	2,57	4,59	9,55	6,40
Préparation 1 #2	3,20	5,45	10,42	7,02
Préparation 2 #1	3,19	19,69	23,28	1,76
Préparation 2 #2	3,15	19,73	23,15	1,68